SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

PROYECTO DE NORMA MEXICANA
PROY-NMX-AA-102-SCFI-2013

CALIDAD DEL AGUA -DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES, ORGANISMOS COLIFORMES TERMOTOLERANTES *Y Escherichia coli* PRESUNTIVA MÉTODO DE FILTRACION EN MEMBRANA (CANCELARÁ A LA NMX-AA-102-SCFI-2006)

WATER QUALITY- DETECTION AND ENUMERATION OF COLIFORM ORGANISMS, THERMOTOLERANT COLIFORM ORGANISMS AND PRESUMPTIVE *Escherichia coli* BY THE MEMBRANE FILTRATION METHOD

SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

PREFACIO

En la elaboración del presente proyecto de norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ANALYZE LABS, S.C.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN AMBIENTAL
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S.A. DE C.V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- FASIQ INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- INDEX-LAB
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INTERTEK TESTING DE SERVICES DE MÉXICO, S.A. DE C.V. Laboratorio Ciudad de México-Ambiental

SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

- LABORATORIO DE ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL AGUA Y DEL MEDIO AMBIENTE, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE SERVICIOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO SERVICIOS AMBIENTALES
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO Y ASESORÍA EN CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, I.P.D.
  Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- SISTEMA DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO DE LEÓN (SAPAL)

SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL

- SISTEMAS DE INGENIERÍA AMBIENTAL, S.A. DE C.V.

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA,
  UNIDAD IZTAPALAPA
  División de Ciencias Biológicas y de la Salud
  Ciencia y Tecnología Ambiental
  Depto. Biotecnología

  UNIDAD AZCAPOTZALCO
  División de Ciencias Básicas e Ingeniería
  Depto. de Ciencias Básicas
  Área de Química

- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
  UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos

- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
  Facultad de Química
  Instituto de Ingeniería

SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	2
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION	2
2	REFERENCIAS	2
3	PRINCIPIO	3
4	DEFINICIONES	3
5	DILUYENTE, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	6
6	EQUIPOS Y MATERIALES	12
7	RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	13
8	CONTROL DE CALIDAD	14
9	CALIBRACIÓN	14
10	PROCEDIMIENTO	14
11	CÁLCULOS	18
12	INTERFERENCIAS	20
13	SEGURIDAD	20
14	MANEJO DE RESIDUOS	20
15	VIGENCIA	21
16	BIBLIOGRAFÍA	21
17	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	22

SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

PROYECTO DE NORMA MEXICANA
PROY-NMX-AA-102-SCFI-2013

CALIDAD DEL AGUA -DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES, ORGANISMOS COLIFORMES TERMOTOLERANTES *Y Escherichia coli* PRESUNTIVA MÉTODO DE FILTRACIÓN EN MEMBRANA (CANCELARÁ A LA NMX-AA-102-SCFI-2006)

WATER QUALITY- DETECTION AND ENUMERATION OF COLIFORM ORGANISMS, THERMOTOLERANT COLIFORM ORGANISMS AND PRESUMPTIVE *Escherichia coli* BY THE MEMBRANE FILTRATION METHOD

0 INTRODUCCIÓN

La presencia y extensión de la contaminación fecal es un factor importante en la determinación de la calidad de un cuerpo de agua. El análisis de muestras de agua para determinar la presencia de miembros del grupo coliforme, que habitan normalmente en el intestino del hombre y otros animales de sangre caliente, da una indicación sensible de dicho tipo de contaminación. Dado que la capacidad de algunos miembros del grupo coliforme para sobrevivir en agua es limitada, sus números pueden emplearse también para estimar el grado de contaminación fecal.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

Este proyecto de norma mexicana describe un método para la detección y enumeración de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* presuntiva (E. coli) en agua, después de una filtración a través de una membrana de celulosa, su subsecuente cultivo en un medio diferencial lactosado y el cálculo de sus números en la muestra.

Este método es aplicable a todo tipo de agua, exceptuando aguas salinas con altos contenidos de diatomeas o cuando números grandes de otros organismos puedan interferir con el crecimiento.

La selección de las pruebas empleadas en la detección y confirmación de los grupos de organismos coliformes, incluyendo E. coli puede verse como parte de una secuencia continua. El grado de confirmación en una muestra en particular depende parcialmente de la naturaleza del agua y de las razones para llevar a cabo el examen. En la práctica, la detección en agua de E. coli presuntiva como se define en el capítulo 3 de este proyecto de norma da usualmente una indicación satisfactoria de contaminación fecal.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de este proyecto de norma mexicana se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

NMX-AA-089/1-SCFI-2010 Protección al ambiente- Calidad del agua- Vocabulario - Parte 1. (Cancela a la NMX-AA-

	089/1-1986), publicado en el Diario Oficial de la Federación el 3 de marzo del 2011.
NMX-AA-089/2-1992	Protección al ambiente- Calidad del agua – Vocabulario - Parte 2, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 24 de marzo del 1992.

3 PRINCIPIO

El método se basa en la filtración de una muestra directa o una alícuota de la muestra a través de una membrana de celulosa que retiene los organismos, colocando la membrana ya sea en un medio de cultivo selectivo de agar lactosado o en un cojinete absorbente saturado con un medio líquido lactosado.

La membrana se incuba durante 24 h ± 2 h a 36 °C ± 1 °C para la detección de organismos coliformes, o alternativamente a 44 °C ± 1 °C para la presencia de organismos coliformes termotolerantes.

Se lleva a cabo la cuenta directa de las colonias características desarrolladas sobre la membrana, y algunas de estas colonias se resiembran para pruebas confirmativas para producción de gas e indol. Finalmente se hace el cálculo del número de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* presuntiva que pueden estar presentes en 100 mL de la muestra.

4 DEFINICIONES

Para los propósitos de este proyecto de norma mexicana, aplican los términos y definiciones contenidos en las normas mexicanas NMX-AA-089/1-SCFI y NMX-AA-089/2 y se establecen las siguientes:

4.1 Aguas naturales:

Agua cruda, subterránea, de lluvia, de tormenta, de tormenta residual y superficial.

4.2 Aguas residuales:

Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticos y similares, así como la mezcla de ellas.

4.3 Bitácora:

Cuaderno de laboratorio debidamente foliado e identificado, en el cual los analistas anotan todos los datos de los procedimientos que siguen en el análisis de una muestra, así como todas las informaciones pertinentes y relevantes a su trabajo en el laboratorio. Es a partir de dichas bitácoras que los inspectores pueden reconstruir el proceso de análisis de una muestra tiempo después de que se llevó a cabo.

4.4 Blanco analítico o de reactivos:

Agua reactivo o matriz equivalente que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analíto o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos disolventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra problema.

4.5 Descarga:

Acción de verter, infiltrar, depositar o inyectar aguas residuales a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita, cuando éste es un bien del dominio público de la Nación.

4.6 Escherichia coli: presuntiva (E. coli):

Bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo no esporulado que se caracteriza por poseer la enzima beta-galactosidasa, se desarrolla a 44 °C ± 1°C, fermenta la lactosa y el manitol produciendo ácido y gas, produce indol a partir del triptófano, es oxidasa negativo y no hidroliza la urea.

4.7 Fermentación:

Oxidación aeróbica - anaeróbica de compuestos por la acción enzimática de los microorganismos.

4.8 Filtro de membrana:

Técnica que se utiliza para determinar la cantidad de organismos presentes en un volumen de muestra determinado.

4.9 Medio selectivo:

Medio de cultivo sólido - líquido que contiene sustancias químicas específicas que permite el desarrollo de un grupo de organismos específicos, inhibiendo al mismo tiempo el desarrollo de otros.

4.10 Medios diferenciales:

Medio de cultivo sólido - líquido que contiene sustancias químicas específicas que permiten al observador diferenciar distintos tipos de organismos.

4.11 Muestra:

La que se tome en el punto de interés, de manera continua, en día normal de operación que refleje cuantitativa y cualitativamente el o los procesos más representativos de las actividades que generan la descarga, durante el tiempo necesario para completar cuando menos, un volumen suficiente para que se lleven a cabo los análisis necesarios para conocer su composición, aforando el caudal descargado en el sitio y en el momento de muestreo.

4.12 Organismo aerobio:

Organismo que requiere de oxígeno molecular para su desarrollo.

4.13 Organismo anaerobio:

Organismo que se desarrolla en ausencia de oxígeno molecular.

4.14 Organismo anaerobio facultativo:

Organismo que se desarrolla tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

4.15 Organismos coliformes:

Comprende todos los bacilos aerobios o anaerobios facultativos Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa a 36 °C ± 1 °C con producción de gas y ácido en un periodo de 24 h a 48 h.

4.16 Organismos coliformes fecales (termotolerantes):

Comprende todos los bacilos aerobios o anaerobios facultativos, Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 44 °C ± 1 ºC en un plazo de 24 h.

5 DILUYENTE, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa.

Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características:

a)	conductividad: µS/cm a 25 ºC	5,0 Máx., y
b)	pH:	5,0 a 8,0.

En caso de utilizar medios deshidratados, seguir las recomendaciones del fabricante para su preparación y uso.

5.1 Diluyente.

5.1.1 Diluyente de peptona (0,1 %):

a)	peptona	1,0 g, y
b)	agua para llevar a	1 000 mL.

Disolver la peptona en aproximadamente 950 mL de agua.

Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L ó ácido clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización sea de 7,0 ± 0,1. Aforar a 1 000 mL con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 121 °C ± 1 °C durante 15 min a una presión manométrica de 0,098 066 MPa (1 Kg/cm^2).

5.1.2 Solución salina de peptona:

a)	peptona	1,0 g;

b)	cloruro de sodio (NaCl)	8,5 g, y
c)	agua para llevar a	1 000 mL.

Disolver los componentes hirviéndolos en aproximadamente 950 mL de agua. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L o ácido clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización sea de 7,0 ± 0,1 pH. Llevar a 1 000 mL con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 121 °C ± 1 °C durante 15 min a una presión manométrica de 0,098 066 MPa (1 Kg/cm^2).

5.1.3 Solución amortiguadora de fosfato:

5.1.3.1 Solución de fosfato:

Disolver 34 g de fosfato en 500 mL de agua. Ajustar a pH 7,2 ± 0,5 con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L y aforar a 1 000 mL con agua.

5.1.3.2 Solución de cloruro de magnesio:

Disolver 38 g de cloruro de magnesio anhidro en 1 000 mL de agua.

Para usarla, añadir 1,25 mL de solución de fosfato (véase 5.1.3.1) y 5,0 mL de solución de cloruro de magnesio (véase 5.1.3.2) a 1 000 mL de agua. Distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 121 °C ± 1 °C durante 15 min a una presión de 0,098 066 MPa (1 Kg/cm^2).

a)	fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	42,5 mg;
b)	cloruro de magnesio ($MgCl_2$)	190,0 mg, y
c)	agua para llevar a	1 000 mL.

5.2 Medios de aislamiento

Utilizar uno o más de los siguientes medios de cultivo ya sea en forma sólida como agar o bien como caldo para saturar cojinetes absorbentes:

5.2.1 Medio Endo para membrana

a)	triptosa	10,0 g;

b)	tiopeptona	5,0 g;
c)	tripticasa (casitona)	5,0 g;
d)	extracto de levadura	1,5 g;
e)	lactosa	12,5 g;
f)	cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g;
g)	fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	4,375 g;
h)	fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	1,375 g;
i)	lauril sulfato de sodio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)	0,05 g;
j)	desoxicolato de sodio	0,1 g;
k)	sulfito de sodio (Na_2SO_3)	2,1 g;
l)	fucsina básica	1,05 g, y
m)	agua para llevar a	1 000 mL.

Disolver los componentes en agua conteniendo 20 mL de etanol 95 % (v/v). Calentar a ebullición, quitar inmediatamente y enfriar a 45 °C. No colocar en autoclave. El pH final debe ser de 7,1 a 7,3. Almacenar el medio a 4 °C en la oscuridad y desechar el medio que no se haya usado después de 4 días.

NOTA 1: Este medio puede solidificarse adicionando de 1,2 a 1,5 % (m/m) de agar antes de hervirlo.

5.2.2 Agar LES Endo

a)	extracto de levadura	1,2 g;
b)	tripticasa (casitona)	3,7 g;
c)	tiopeptona	3,7 g;
d)	triptosa	7,5 g;
e)	lactosa	9,4 g;
f)	fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	3,3 g;
g)	fosfato monobásico de potasio ($KH_2 PO_4$)	1,0g;
h)	cloruro de sodio (NaCl)	3,7 g;
i)	desoxicolato de sodio	0,1 g;

j)	lauril sulfato de sodio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)	0,05 g;
k)	fucsina básica	0,8 g;
l)	agar	15,0 g, y
m)	agua para llevar a	1 000 mL.

Disolver los componentes en agua conteniendo 20 mL de etanol 95 % (v/v). Calentar a ebullición, enfriar y distribuir en volúmenes convenientes en cajas de Petri. No colocar en autoclave, almacenar el medio a 4 °C en la oscuridad y desechar el medio que no se haya usado después de 2 semanas.

5.2.3 Medio MFC

a)	triptosa	10,0 g;
b)	peptona proteosa No. 3 o polipeptona	5,0 g;
c)	extracto de levadura	3,0 g;
d)	cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g;
e)	lactosa	12,5 g;
f)	sales biliares No. 3 ó mezcla de sales biliares	1,5g;
g)	azul anilina	0,1 g, y
h)	agua para llevar a	1 000 mL.

Rehidratar en agua conteniendo 10 mL de ácido rosólico (aurina) ($C_{19}H_{14}O_3$) al 1 % en NaOH 0,2 N. Calentar el medio hasta su punto de ebullición, quitar inmediatamente del calor enfriar y distribuir en volúmenes convenientes en cajas de Petri. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser 7,4.

El medio debe almacenarse entre 2 °C y 10 °C y cualquier porción no utilizada debe desecharse después de 96 h.

NOTA 2: Este medio puede solidificarse mediante la adición de 1,2 % al 5 % de agar (m/m) antes de la ebullición.

NOTA 3: El reactivo de ácido rosólico ($C_{19}H_{14}O_3$) se descompondrá si se esteriliza en autoclave. La solución patrón debe almacenarse en la oscuridad entre 2 °C y 10 °C y debe desecharse después de 2 semanas, o antes si su color cambia de rojo oscuro o café oscuro.

5.3 Medios confirmativos.

Utilizar uno o más de los siguientes:

5.3.1 Medio para la producción de gas.

Agua de lactosa peptona.

a)	peptona	10,0 g;
b)	cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g;
c)	lactosa	10,0 g;
d)	rojo de fenol (0,4 % m/m en solución acuosa)	2,5 mL;
e)	(o indicador de Andrade)	(10 mL), y
f)	agua para llevar a	1 000 mL.

Disolver los componentes en agua y ajustar a pH 7,5. Añadir el indicador de rojo de fenol y distribuir en volúmenes de 5 mL en tubos conteniendo tubos de fermentación invertidos (Durham). Alternativamente, ajustar el pH entre 6,8 y 7,0 y añadir el indicador de Andrade. Colocar en autoclave a 110 °C durante 10 min o poner a vapor durante 20 min diarios por 3 días sucesivos. Probar la esterilidad por incubación a 37 °C durante 24 h.

5.3.2 Medio para la producción de indol

Agua de triptona.

Algunas peptonas que dan resultados satisfactorios a 37°C no son satisfactorias para la prueba de indol a 44 °C. Se ha encontrado que la triptona es satisfactoria y por lo tanto se recomienda.

a)	triptona	20,0 g;
b)	cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g, y
c)	agua para llevar a	1 000 mL.

Disolver los componentes en agua y ajustar a pH 7,5. Distribuir en volúmenes de 5 mL y colocar en autoclave a 115 °C durante 10 min.

5.3.3 Medio del tubo único tanto para la producción de gas como de indol.

Caldo lauril triptosa manitol con triptófano.

a)	triptosa	20,0 g;
b)	manitol	5,0 g;
c)	cloruro de sodio (NaCI)	5,0 g;
d)	fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	2,75 g;
e)	fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	2,75 g;
f)	lauril sulfato de sodio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)	0,1 g;
g)	L (-) triptófano	0,2 g, y
h)	agua	1 000 mL.

Añadir la triptosa, el cloruro de sodio, el manitol, los fosfatos y el triptófano al agua y calentar para disolver. Añadir el lauril sulfato de sodio y mezclar suavemente para evitar la formación de espuma. Ajustar a pH 6,8 ± 0,2. Distribuir en volúmenes de 5 mL en tubos conteniendo un tubo de fermentación invertido (Durham). Colocar en autoclave a 115 °C durante 10 min (en caso de utilizar medio de cultivo comercial siga las instrucciones del fabricante).

5.4 Reactivos

5.4.1 Reactivo de Kovacs para indol

Paradimetilaminobenzaldehído

a)	$((CH_3)_2NC_6H_4CHO)$	5,0 g;
b)	alcohol amílico ($CH_3(CH_2)_4OH$) (libre de bases orgánicas)	75 mL;
c)	ácido clorhídrico (HCI) (d = 1,18 g/mL)	25 mL, y
d)	ácido clorhídrico (HCI) (d = 1,18 g/mL)	25 mL.

Disolver el aldehído en el alcohol. Añadir con cuidado el ácido concentrado. Proteger de la luz y almacenar a 4 °C.

NOTA 4: El reactivo debe tener un color de amarillo claro a café claro; algunas muestras de alcohol amílico no son satisfactorias y dan un color oscuro con el aldehído.

NOTA 5: También se puede utilizar reactivo de Erlich comercial para la determinación de Indol.

5.4.2 Reactivo de oxidasa para la prueba de oxidasa

a)	clorhidratado de tetrametil-p-fenilendiamina	0,1 g, y
b)	agua para llevar a	1 000 mL.

Este reactivo no es estable y por consiguiente debe prepararse para utilizarlo en pequeñas cantidades cada vez que se necesite.

6 EQUIPOS Y MATERIALES

6.1 Equipos

Aparte de los equipos que se suministran estériles, el material de vidrio y el resto del equipo deben esterilizarse.

6.1.1. Horno de aire caliente para esterilización con calor seco.

6.1.2. Autoclave.

6.1.3. Incubador o baño de agua, controlado termostáticamente entre 36 °C ± 1 °C.

6.1.4. Incubador o baño de agua, controlado termostáticamente a 44 °C ± 1 °C.

6.1.5. Medidor de pH.

6.1.6. Campana de Flujo Laminar (opcional).

6.1.7. Equipo para filtración con membrana.

6.1.8. Bomba o sistema de vacío.

6.2 Materiales

6.2.1 Membranas filtrantes estériles de aproximadamente 47 mm de diámetro, con características de filtración equivalentes a un tamaño de diámetro nominal de poro de 0,45 µm.

6.2.2 Pinzas de bordes lisos, para manejar las membranas.

6.2.3 Frascos muestreadores, de vidrio resistente o cristal refractario de 125 mL ó 250 mL, con tapón de cristal esmerilado o tapa de rosca de baquelita, frascos de plástico desechables con tapón de rosca estériles o bolsa de recolección de plástico estériles.

6.2.4 Material común de laboratorio.

6.2.5 Tubos de fermentación (tipo Durham).

6.2.6 Asas de inoculación.

6.2.7 Cajas Petri.

6.2.8 Cojinetes absorbente estéril.

7 RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Si las muestras contienen cloro la toma de muestra es en recipientes con tiosulfato de sodio. Colocar en el material de muestreo, previo a la esterilización, 0,1 mL de solución de tiosulfato de sodio al 10% en el caso de agua residual tratada con el propósito de inhibir la acción del cloro que puede contener la muestra.

El análisis bacteriológico de la muestra debe practicarse inmediatamente después de su recolección, es por ello que se recomienda que de no efectuarse así el análisis se incide dentro de las seis horas próximas a la recolección de la muestra y en ningún caso, este lapso debe exceder de 24 h.

Durante el periodo que transcurre del muestreo al análisis, se debe conservar la muestra a 4 °C. Con objeto de inhibir la reproducción bacteriana.

8 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio que utilice este método está obligado a operar un programa de control de calidad (CC) formal.

8.1 Es obligatorio para el laboratorio mantener los siguientes registros:

- Los nombres, títulos, direcciones y número de teléfono de los analistas que ejecutaron los análisis y el encargado de control de calidad que verificó los análisis.

- El laboratorio debe mantener la información original reportada por los equipos en forma electrónica o en otros respaldos de información, de tal forma que permita a un evaluador externo reconstruir cada determinación mediante el seguimiento de la información desde la recepción de la muestra hasta el resultado final.

9 CALIBRACIÓN

Se debe contar con la calibración de los equipos y materiales siguientes:

a) Balanza granataria y/o analítica;

b) termómetros;

c) potenciómetro;

d) manómetro o termómetro de máximas, y

e) marco de pesas.

10 PROCEDIMIENTO

10.1 Selección del volumen de muestra

Seleccionar un volumen de muestra tal o una dilución del mismo que dé menos de aproximadamente 100 colonias en una membrana de 47 mm de diámetro. Para trabajo rutinario se recomienda una muestra de 100 mL. Cuando se espere un contenido alto de bacterias, puede tomarse una muestra más pequeña (20 mL); pero se recomienda poner en el embudo previamente 50 mL del diluyente estéril.

10.2 Filtración

Colocar las bases en la unidad filtrante y en ambiente estéril, colocar la membrana con ayuda de las pinzas estériles. La cuadrícula de la membrana debe quedar visible.

Colocar el embudo con cuidado y sujetarlo.

Agitar vigorosamente la muestra, verter en el embudo y filtrar con ayuda de vacío. Enjuagar con el diluyente estéril.

10.3 Transferencia de la membrana

Después del último enjuague y terminada la filtración, quitar el embudo y con ayuda de la pinza estéril, levantar la membrana y sobreponerla, ya sea en:

a) Una caja Petri con medio de agar, y

b) un cojinete absorbente estéril saturado previamente con medio líquido en una caja Petri.

Asegúrese que no hay burbujas de aire atrapado entre la membrana y el medio. Para diferentes volúmenes de la misma muestra, puede reutilizarse el equipo de filtración sin desinfectarlo, siempre y cuando se filtren primero las diluciones más altas. Para filtrar otra muestra, usar otro tipo equipo de filtración o bien desinfectar el equipo.

10.4 Incubación

Invertir las cajas Petri y colocarlas en una incubadora o baño de agua según sea el caso. Las cajas que contienen membranas en cojinetes absorbentes

deben colocarse siempre en recipientes herméticos para evitar la desecación del medio.

Para aislar los organismos Coliformes Totales. Incubar una membrana a 36 °C ± 1 °C de 18 h a 24 h; para aislar los organismos termotolerantes; incubar la otra membrana a 44 °C ± 1 °C de 18 h a 24 h.

El mismo tipo de medio generalmente puede usarse para ambas membranas, pero utilizar el medio MFC solamente a 44 °C ± 1 °C y los medios Endo y LES Endo a 36 °C ± 1 °C y/o 44 °C ± 1 °C.

10.5 Examen de las membranas

Después de la incubación, las cajas o membranas deben examinarse inmediatamente. Si esto no es posible, almacenarse entre 4 °C a 5 °C durante períodos cortos, siempre y cuando esto no afecte la apariencia de las colonias.

10.5.1 Organismos coliformes

Examinar las membranas y contar como organismos coliformes presuntivos todas las colonias, independientemente del tamaño que muestren, que tengan las siguientes características después de su incubación a 36 °C ± 1 °C:

- En caldo o agar Endo (véase 5.2.1): Un color rojo obscuro con brillo metálico verde - dorado.

- En agar LES Endo (véase 5.2.2): Un color rojo obscuro con brillo metálico verde - dorado.

10.5.2 Considerar como organismos coliformes termotolerantes presuntivos todas las colonias que muestren, después de incubación a 44 °C ± 1 °C, las mismas características coloniales que se describen anteriormente (véase 10.5.1). Si se usa medio MFC (véase 5.2.3), las colonias serán de color azul.

10.6 Es importante hacer notar que las cuentas de colonias en membranas a 36 °C ± 1 °C y a 44 °C ± 1 °C son solamente resultados de coliformes presuntivos. Dado que no se detecta la producción de gas, hay también un supuesto adicional de que los organismos que forman las colonias pueden producir gas. Para el análisis de agua cruda o parcialmente tratada, esto puede ser

suficiente, pero para agua potable es importante llevar a cabo las pruebas confirmativas.

10.6.1 Resembrado, incubación y examen.

Para confirmar los resultados de la membrana, resembrar cada colonia (véase 10.5.1) o un número representativo de ellas (una por tubo de fermentación) en agua lactosa Peptona (véase 5.3.1) e incubar a 36 °C ± 1 °C de 24 h a 48 h: la producción de gas durante este período confirma la presencia de organismos coliformes.

Para organismos coliformes termotolerantes y E. coli presuntiva en membranas, ya sea que hayan sido incubadas a 44 °C ± 1 °C ó 36 °C ± 1 °C, resembrar cada colonia (véase 10.5.1) o un número representativo de ellas (una por tubo), en agua lactosa peptona y agua triptona e incubarlos a 44 °C ± 1 °C de 18 h a 24 h. La producción de gas en agua lactosa peptona confirma la presencia de organismos coliformes termotolerantes y el desarrollo de un color rojo en la superficie del cultivo en agua de triptona después de la adición de 0,2 mL a 0,3 mL de reactivo de Kovacs (véase 5.4.1) confirma la presencia de E. coli presuntiva.

NOTA 6: El uso de caldo de lauril triptosa manitol con triptofano permite analizar tanto la producción de gas como de indol en un solo tubo.

NOTA 7: La detección de E. coli presuntiva se considera una evidencia satisfactoria de contaminación fecal. Sin embargo, pueden llevarse a cabo mayores pruebas para la confirmación de E. coli si se considera necesario.

NOTA 8: El uso de caldo EC (con tubo de fermentación) se puede utilizar como prueba confirmaiva para E. Coli

10.7 Prueba de oxidasa

Las bacterias encontradas en el agua pueden cumplir con algunas características bioquímicas de organismos coliformes en muchos aspectos, pero pueden producir gas a partir de lactosa solamente a temperaturas inferiores a 37 °C. Por consiguiente, dar resultados negativos en las pruebas confirmativas estándar para organismos coliformes y su presencia en agua usualmente no se considera significativa. Las especies de Aeromonas, que se encuentran naturalmente en el agua, tienen una temperatura óptima de

crecimiento en el rango de 30 °C a 35 °C pero a pesar de ello pueden producir ácido y gas a partir de lactosa a 37 °C. Tienen poco significado como indicadores de contaminación fecal y se distinguen del grupo coliforme por una reacción de oxidasa positiva.

10.7.1 Llevar a cabo la prueba de oxidasa con subcultivos puros de organismos fermentadores de lactosa, crecidos en medio nutriente de agar, como sigue:

- Colocar de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa (véase 5.4.2), recientemente preparado, en un papel filtro en una caja Petri (o en su caso utilizar reactivo comercial).

- Con una varilla de vidrio o una asa de inoculación de platino (no de nicromel), transferir un poco del crecimiento al papel filtro preparado.

- Considerar la aparición de un color azul obscuro purpúreo dentro de un período de 10 s como una reacción positiva.

NOTA 9: En cada ocasión en la que se utilice el reactivo de oxidasa, llevar a cabo pruebas de control con cultivos de organismos que den una reacción positiva (Pseudomona aeruginosa) y uno que dé una reacción negativa (E. coli).

11 CÁLCULOS

A partir del número de colonias características contadas en las membranas y tomando en cuenta los resultados de las pruebas confirmativas, calcular el número de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y Escherichia coli presuntiva presentes en 100 mL de la muestra, expresando el resultado como unidades formadoras de colonias en un volumen de referencia especificado en la muestra (generalmente 100 mL) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{Colonias\ coliformes\ totales}{Volumen\ de\ referencia} = \frac{Colonias\ coliformes\ contadas \times volumen\ de\ referencia}{Volumen\ filtrado\ de\ muestra}$$

Que puede expresarse como:

$$C_s = \frac{\sum N_i}{(n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2) + \ldots + (n_n V_n F_n)} V_s$$

Donde:

Cs es el número de unidades formadoras de colonias en el volumen de referencia Vs de la muestra.

ΣN_i es la suma de las colonias en todas las cajas o membranas contadas filtradas/siembras de dilución F_i.

n_1 es el número de cajas contadas para una dilución particular F_1.

V_1 es el volumen de dilución de la muestra F_1 en la placa i.

F_1 es la dilución usada para la porción de muestra V_1.

Vs es el volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración de los microorganismos en la muestra.

NOTA 10: El valor de F_1, F_2, F_n, depende del factor de dilución que se haya utilizado, el valor es 1 si la muestra no está diluida y será de 0,1 para una dilución a 10 veces.

NOTA 11: La cuenta final así obtenida es el promedio ponderado de las cuentas de cada una de las placas.

11.1 Reporte de la prueba

El reporte de la prueba debe hacer referencia a este proyecto de norma y dar toda la información relevante, incluyendo:

a) Todos los detalles necesarios para la identificación completa de la muestra;

b) la técnica y medios de cultivo empleados;

c) el tiempo, temperatura y condiciones de incubación;

d) los resultados, expresados de acuerdo con lo establecido en el punto 10, y

e) cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis y cualquier operación no especificada en el método o considerada opcional que pueda haber influido en los resultados.

12 INTERFERENCIAS

Colocar en el material de muestreo, previo a la esterilización, 0,1 mL de solución de tiosulfato de sodio al 10 % en el caso de agua residual con el propósito de inhibir la acción del cloro que puede contener la muestra.

13 SEGURIDAD

13.1 Este método puede no mencionar todas las precauciones de seguridad asociadas con su uso. El laboratorio es responsable de mantener un ambiente seguro y un archivo de las normas de seguridad respecto a la exposición y manejo seguro de las substancias químicas y cepas utilizadas en éste método. Debe tenerse un archivo de referencia de las hojas de información de seguridad el cual debe estar disponible a todo el personal involucrado en estos análisis.

13.2 Los ácidos y bases concentradas empleadas en este método pueden causar severas quemaduras e irritaciones en la piel, por lo que debe utilizarse ropa protectora tal como batas, guantes y lentes de seguridad cuando se manejan estos compuestos químicos, por lo que deben prepararse en campana de extracción.

13.3 Para la preparación de los medios adicionalmente usar, mascarilla para polvos.

13.4 En el área de análisis hacer uso de cofia y cubrebocas.

14 MANEJO DE RESIDUOS

14.1 Cada laboratorio debe contemplar dentro de su programa de Control de Calidad el destino final de los residuos generados durante la determinación.

14.2 Los desechos ácidos se deben neutralizar para su posterior desecho.

15 VIGENCIA

El presente proyecto de norma mexicana, una vez que concluya su período de consulta pública, entrará en vigor 60 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el **Diario Oficial de la Federación**.

16 BIBLIOGRAFÍA

- NOM-001-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997.

- NOM-008-SCFI-2002 Sistema General de Unidades de Medida, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.

- NMX-AA-003-1980 Aguas residuales muestreo, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.

- NMX-AA-008-SCFI-2000 Análisis de agua - Determinación del pH - Método de prueba, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 18 de diciembre de 2000.

- NMX-AA-116-SCFI-2001 Análisis de agua - Guía de solicitud para la presentación de métodos alternos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.

- ISO 9308/1:1990 Water quality - Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli -- Part 1 Membrane filtration method

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22nd edition, 2012.

17 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

El presente proyecto de norma mexicana no coincide con ninguna Norma Internacional, no es posible concordar con el concepto internacional por razones particulares del país.

México D.F., a 18 de septiembre de 2014

ALBERTO ULISES ESTEBAN MARINA

DIRECTOR GENERAL DE NORMAS