



SECRETARÍA DE ECONOMÍA
DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS
PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-102-SCFI-2018

**CALIDAD DEL AGUA - ENUMERACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* Y
BACTERIAS COLIFORMES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR
MEMBRANA**

*WATER QUALITY- ENUMERATION *ESCHERICHIA COLI* AND COLIFORM
BACTERIA BY THE MEMBRANE FILTRATION METHOD*

**(CANCELA AL PROY-NMX-AA-102-SCFI-2013 Y CANCELARÁ A LA
NMX-AA-102-SCFI-2006).**



PREFACIO

El Comité Técnico de Normalización Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales (COTEMARNAT) es el responsable de la elaboración del presente Proyecto de Norma Mexicana; una vez que se publique la Declaratoria de Vigencia, cancelará a la NMX-AA-102-SCFI-2006.

En la elaboración del presente Proyecto de Norma Mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- AB Sciex S.A. de C.V.
- Análisis de agua, S.A. de C.V.
- Analyze Labs, S.C.
- Araceli Sánchez Martínez
- Arva, laboratorio de análisis industriales, S.A. de C.V.
- Centro de Servicios Químicos
- Centro Nacional de Metrología
- Cesar Clemente Alvarado García
- Comisión Estatal del Agua de Jalisco
- 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.
- Equipos para Diagnóstico Analítico, S.A. de C.V.
- Hach Company
- IDECA, S.A. de C.V.
- Index-Lab
- Ingeniería en los Sistemas de Tratamientos de Aguas, S.A. de C.V.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
- Instituto Mexicano del Petróleo



- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
- Instituto Politécnico Nacional
- Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.
Laboratorio Ciudad de México-Ambiental
- Lab Plus QA S.C.
- 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 del Grupo Microanálisis, S. A. de C.V.
- Laboratorio y Asesoría en Control de la Contaminación S.A. de C.V
- Laboratorios ABC Química, Investigación y Análisis, S.A. de C.V.
- Laquin MR, S.A. de C.V.
- MÁS Instrumentos, S.A. De C.V.
- Mercury Lab, S.A. de C.V.
- Mónica Orozco Márquez
- Pemex Petroquímica Complejo Petroquímico Cangrejera
- Pemex Etileno Complejo Petroquímico Morelos
- Perkin Elmer de México, 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
- Servicios Especializados y Productos Para Tratamiento de Aguas, S.A. de C.V.
- Sistema de Aguas de la Ciudad de México del Gobierno de la Ciudad de México



- Sistemas de Ingeniería Ambiental, S.A. de C.V.
- SPIN, S.A. de C.V.
- Universidad Autónoma Metropolitana
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

Índice

0	Introducción	1
1	Objetivo y campo de aplicación.....	2
2	Referencias normativas.....	2
3	Principio	2
4	Términos y definiciones.....	3
5	Diluyente, medios de cultivo y reactivos	3
6	Equipos y materiales.....	7
7	Recolección, preservación y almacenamiento de muestras	8
8	Muestreo.....	9
9	Procedimiento.....	10
10	Expresión de Resultados.....	11
11	Información Requerida de la Prueba.....	12
12	Concordancia con Normas Internacionales.....	12
13	Vigencia	14
14	Bibliografía.....	16
	Apéndice A (Informativo) Información microbiológica adicional sobre bacterias coliformes.....	15



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-102-SCFI-2018

CALIDAD DEL AGUA - ENUMERACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* Y
BACTERIAS COLIFORMES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

WATER QUALITY- ENUMERATION *ESCHERICHIA COLI* AND COLIFORM
BACTERIA BY THE MEMBRANE FILTRATION METHOD

0 Introducción

El 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), fue publicado el día 18 de septiembre de 2014 en el Diario Oficial de la Federación para consulta pública. En el año 2018 el Comité Técnico de Normalización Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales decidió volver a publicarlo, dado que cambió sustancialmente su contenido inicial ya que el presente proyecto de Norma Mexicana se basó en la norma internacional ISO 9308-1-2014 la que tiene cambios sustanciales respecto a versiones anteriores. La norma internacional tiene su fundamento en un método enzimático utilizando un medio cromogénico; además de que también cambia las temperaturas de incubación y procedimiento específico para su desarrollo, entre lo más importante.

La presencia de contaminación fecal es un factor importante en el aseguramiento de la calidad del agua y en el riesgo de infección para la salud humana. El análisis de muestras de agua para determinar la presencia de *Escherichia coli* (*E. coli*) que normalmente habita en el intestino del hombre y de otros animales de sangre caliente, indica dicha contaminación. El análisis de bacterias coliformes puede ser más difícil de interpretar debido a que algunas bacterias coliformes viven en el suelo y aguas superficiales y no siempre son intestinales. Por lo tanto, la presencia de bacterias coliformes, aunque no es prueba de contaminación fecal, puede indicar falla en el tratamiento, almacenamiento o distribución del agua.

1 Objetivo y campo de aplicación

Este Proyecto de Norma Mexicana especifica el método para la enumeración de bacterias coliformes y *Escherichia coli* (*E. coli*). Este método se basa en la filtración por membrana y cultivo en un medio de agar cromogénico, para coliformes y el cálculo del número de microorganismos presentes en la muestra. Este método no aplica para todo tipo de agua. Este Proyecto de Norma Mexicana es aplicable para aguas de abastecimiento con baja carga bacteriana que puede contener menos de 100 colonias totales en agar cromogénico para coliformes (CCA).

Algunas cepas *E. coli* que son β D-Glucuronidasa negativas, tales como *E. coli* O157 no son detectadas por este método, solo las que son glucuronidasa positiva, estas se aprecian como bacterias coliformes en este agar cromogénico.

2 Referencias normativas

Para la correcta aplicación de este Proyecto de Norma Mexicana se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

2.1 NMX-AA-089/1-SCFI-2010 Protección al ambiente –Calidad del agua – Vocabulario – Parte 1. (Cancela a la NMX-AA-089/1-1986). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2011-03-03.

2.2 NMX-AA-089/2-SCFI-2010 Protección al ambiente – Calidad del agua – Vocabulario – Parte 2. (Cancela a la NMX-AA-089/2-1992). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2013-08-29.

3 Principio

Consiste en filtrar una porción de la muestra a través de un filtro de membrana, que retiene los microorganismos y se coloca sobre la caja Petri la cual contiene agar cromogénico para coliformes, se incuba la caja con el filtro a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en un periodo de $21 \pm 3 \text{ h}$.

Contar las colonias β D-galactosidasa positivas (de color rosas a rojas) como bacterias coliformes presuntivas que no son *E. coli*. Para evitar resultados falsos positivos por bacterias oxidasa positiva por ejemplo *Aeromonas spp*, las colonias presuntivas se deben confirmar por una reacción negativa de oxidasa.

Contar todas las colonias que dan reacción positiva de β D-galactosidasa y β D-glucuronidasa las cuales son *E.coli* (de color azul oscuro a violeta).

El total de las bacterias coliformes son la suma de colonias de color rosa a rojo (que den una reacción de oxidasa negativa) y todas las colonias de color azul oscuro a violeta.

4 Términos y 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-2010 y NMX-AA-089/2-SCFI-2010 (ver 2.1 y 2.2, respectivamente) y se establecen las siguientes:

4.1

escherichia coli (E. coli)

miembros de la familia Enterobacteriaceae los cuales expresan la enzima β D-Galactosidasa y β D-Glucuronidasa (ver Apéndice A).

4.2

organismos coliformes totales

miembros de la familia Enterobacteriaceae los cuales expresan la enzima β D-Galactosidasa.

5 Diluyente, medios de cultivo y reactivos

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

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

- | | |
|--------------------------------------|------------|
| a) conductividad: μ S/cm a 25 °C | 5,0 Máx. |
| b) pH: a 25 °C | 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 Agua peptonada (0,1 %)

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

Disolver la peptona en aproximadamente 950 mL de agua.

Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L o ácido clorhídrico 1 mol/L. Llevar a 1 000 mL con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave de $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min. El pH final debe estar entre 6,8 y 7,2

5.1.2 Agua peptonada isotónica

a) peptona	1,0 g
b) cloruro de sodio (NaCl)	8,5 g
c) agua	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 ó ácido clorhídrico 1 mol/L. Llevar a 1 000 mL con agua, distribuir en volúmenes convenientes de acuerdo a con las diluciones a realizar y esterilizar en autoclave de $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min. El pH final debe estar entre 6,9 y 7,1.

5.1.3 Disolución amortiguadora de fosfato

5.1.3.1 Disolución de fosfato



Disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua. Ajustar el pH entre 6,7 y 7,7 con una disolución de hidróxido de sodio 1 mol/L y llevar al aforo de 1 000 mL con agua.

5.1.3.2 Disolución de cloruro de magnesio

Disolver 38 g de cloruro de magnesio anhidro u 81 g de cloruro de magnesio hexahidratado en 1 000 mL de agua.

5.1.3.3 Preparación de la disolución amortiguadora de fosfato

Adicionar 1,25 mL de disolución de fosfato y 5,0 mL de disolución de cloruro de magnesio y disolver en 1 000 mL de agua. Distribuir en volúmenes convenientes de acuerdo con las diluciones a realizar y esterilizar en autoclave de $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min. El pH final debe estar entre 7,1 y 7,3.

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 Agar cromogénico para coliformes (CCA)

a) Digerido enzimático de caseína	1,0 g
b) Extracto de levadura	2,0 g
c) Cloruro de sodio	5,0 g
d) Dihidrogenofosfato sódico x 2H ₂ O	2,2 g
e) Hidrogenofosfato di-sódico	2,7 g
f) Piruvato sódico	1,0 g
g) Sorbitol	1,0 g
h) Triptofano	1,0g
i) Tensoactivo de etiloxilato de alcohol secundario (CAS N° 68131-40-8)	0,15g
j) 6 - cloro - 3 - indoxil - β - d - galactopiranósido (Salmon - β - D - galactósido), (CAS No. 138182 - 21 - 5) Ácido 5 - bromo - 4 - cloro - 3 - indoxil - β - D - glucurónico, monohidrato de sal de	0,2g

ciclohexilamonio (sal CHX de X - β - G - glucurónido) N° CAS 11462 - 64 - 0)	0,1 g
l) Isopropil- β D-tiogalactopiranosido (IPTG) (CASNo. 367-93-1)	0,1 g
m)	Agar bacteriológico (en polvo o en hojuelas) 9 g a 18 g ^a
n) Agua	1000 mL

^a dependiendo del poder gelificante del agar

NOTA: Número CAS / Número de Registro CAS es un identificador numérico único del Chemical Abstracts Service (CAS) para elementos químicos, compuestos, polímeros, secuencias biológicas, mezclas y aleaciones.

Suspender los ingredientes en agua calentando en un baño de agua hirviendo con agitación frecuente hasta que se disuelva completamente (aproximadamente 35 minutos). Si es necesario, ajustar el pH para que después la disolución tenga un valor correspondiente a $6,8 \pm 0,2$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. No esterilizar en autoclave, no sobrecalentar, vaciar en placas Petri a no menos de 4 mm de grosor. Si no es para uso inmediato, las placas pueden ser almacenadas a $5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ en la oscuridad y protegidas contra la evaporación durante al menos un mes. No debe haber humedad visible en las placas antes de su uso. Cuando la humedad está presente, las placas se deben secar por el tiempo mínimo requerido para quitar la humedad visible.

5.2.2. Agar Soya Trypticaseina (TSA)

a) Triptona	15,0 g
b) Soya peptona	5,0 g
c) Cloruro de sodio	5,0 g
d) Agar (en polvo o en hojuelas)	15 g a 25 g ^a
e) Agua	1000 mL

^a dependiendo del poder gelificante del agar

Suspender los ingredientes en agua calentando en un baño de agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH de modo que después del autoclave tenga un valor correspondiente a $7.2 \pm 0,1$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esterilizar en autoclave de $(121 \pm 3)^{\circ}$. Dejar enfriar aproximadamente a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y vaciar en cajas Petri a no menos de 4 mm de grosor. Si no es para uso inmediato, las placas pueden ser almacenadas a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad y protegidas contra la evaporación hasta ocho semanas.

NOTA: Cualquier otro agar no selectivo puede utilizarse para el subcultivo antes de la prueba de oxidasa, siempre y cuando no interfiera con esta prueba.

5.2.3 Reactivo para la prueba de oxidasa

a) clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina	0,1 g
b) agua	10 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

Además de los equipos que se suministran estériles, el material de vidrio y el resto del equipo se debe esterilizar.

6.1.1 Horno para esterilización por calor seco con temperatura de $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h ó $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h.

6.1.2 Autoclave que alcance y mantenga una temperatura de al menos $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ o una presión manométrica de 103 kPa, durante 15 min.

6.1.3 Incubadora con termostato controlado de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.4 Medidor de pH con una precisión de $\pm 0,1$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.5 Campana de Flujo Laminar (opcional).



- 6.1.6** Equipo para filtración por membrana.
- 6.1.7** Bomba o sistema de vacío.
- 6.1.8** Balanza granataria verificada
- 6.1.9** Balanza analítica calibrada y verificada
- 6.1.10** Termómetros calibrados y/o verificados
- 6.1.11** Manómetro o termómetro de máximas calibrado.
- 6.1.12** Marco de pesas calibrado.
- 6.2** Materiales
 - 6.2.1** Membranas filtrantes estériles de aproximadamente 47 mm o 50 mm de diámetro, con características de filtración equivalentes a un tamaño de poro de 0,47 μm preferentemente cuadrículado.
 - 6.2.2** Pinzas de bordes lisos, para manejar los filtros de membrana.
 - 6.2.3** Frascos muestreadores de vidrio resistente 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 bolsas de recolección de plástico estériles, este tipo de material debe contener 0,1 mL de tiosulfato de sodio al 10 %(para muestras que contienen cloro).
 - 6.2.4** Material común de laboratorio.
 - 6.2.5** Caja Petri de 60 mm de diámetro.
 - 6.2.6** Cojinetes absorbentes estériles (opcional).
- 7** **Recolección, preservación y almacenamiento de muestras**

7.1 Las muestras se deben recolectar en recipientes estériles con un volumen mínimo de muestra de 100 mL. Para muestras que contengan cloro libre,

colocar en su interior, previo a la esterilización, 0,1 mL de disolución de tiosulfato de sodio al 10 %; si son bolsas estériles comerciales, estas deben contener el tiosulfato de sodio.

7.2 Para su traslado las muestras deben de mantenerse a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.3 Conservar dentro del laboratorio en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Atemperar la muestra antes del análisis sin exceder en todo el proceso las 24 h después de la recolección. Se puede analizar la muestra hasta 48 h después de su recolección conservándola a $2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8 Muestreo

Durante el muestreo se debe utilizar guantes de látex.

8.1 Muestreo en pozos, tanques, cisternas de agua de abastecimiento

8.1.1 Si el punto de muestreo, está provisto de bomba de mano, bombear durante 5 minutos para que el agua fluya libremente antes de tomar la muestra.

8.1.2 Si el punto de muestreo está dotado de bomba mecánica, tomar la muestra en una llave previamente sanitizada de la descarga dejando que fluya el agua libremente durante 5 minutos antes de tomar la muestra.

8.1.3 Si no se cuenta con equipo de bombeo, tomar la muestra directamente del punto de muestreo por medio de un frasco estéril o con algún otro dispositivo adecuado previamente sanitizado.

8.2 Muestreo en grifos

8.2.1. Para la toma de muestra de un grifo, sanitizar y abrir completamente dejando que el agua fluya de 2 a 3 minutos o el tiempo suficiente para permitir la purga de la línea. Controlar el flujo de la llave para que se pueda llenar el frasco o bolsa sin salpicaduras.

8.3 Una vez recolectada la muestra, transportar al laboratorio (ver 7.2)



9 Procedimiento

9.1 Selección del volumen

Seleccionar un volumen tal de la muestra o una dilución del mismo que contenga, para coliformes totales, máximo 80 colonias y para *E. coli*, máximo 60 colonias, en una membrana de 47 mm o 50 mm de diámetro. Para trabajo rutinario se recomienda una muestra de 100 mL. Cuando se espere un contenido alto de bacterias, realizar las diluciones correspondientes.

9.2 Filtración

Homogeneizar la muestra antes de filtrar 100 mL, usando un filtro de membrana, el volumen mínimo de muestra o de diluciones de la misma, para la filtración, puede ser de 10 mL, para asegurar una distribución uniforme de las bacterias en el filtro de membrana.

9.3 Incubación y diferenciación

Después de la filtración, colocar la membrana sobre el agar cromogénico para coliformes, evitando la formación de burbujas, invertir la caja Petri e incubar a $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, durante $21\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Seleccionar colonias aisladas y realizar la prueba de oxidasa.

Examinar la membrana y contar todas las colonias que dan positiva la reacción β D-galactosidasa (de color rosa a rojo) como bacterias coliformes presuntivas, que no son *E. coli*.

Contar todas las colonias que dan reacción positiva de β D-galactosidasa y β D-glucuronidasa (de color azul oscuro a violeta) como *E. coli*.

Como prueba confirmativa de las bacterias coliformes presuntivas que no son *E. coli*, se debe realizar una prueba de oxidasa.

Para la reacción de oxidasa probar preferentemente todas o al menos 10 colonias de color rosa a rojo. Se pueden usar productos comerciales para prueba de oxidasa y seguir las instrucciones del fabricante:

- a) Si no se utilizan estos productos, adicionar de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa, recientemente preparado, a una tira de papel filtro, colocada dentro de una caja Petri.
- b) Con una varilla de vidrio, palillo o un asa de inoculación de punta redondeada (no de nicromel), dispersar una pequeña porción de la colonia sobre el papel filtro preparado con reactivo de oxidasa.
- c) Considerar la aparición de un color azul oscuro purpúreo dentro de un período de 30 s como una reacción positiva.
- d) En cada ocasión en la que se utilice el reactivo de oxidasa, llevar a cabo pruebas de control con cultivos de organismos que den reacción positiva (*Pseudomonas aeruginosa*) y reacción negativa (*E. coli*).

NOTA: Cuando se presente crecimiento bacteriano conglomerado, es necesario realizar un subcultivo de las colonias presuntivas, en agar de soya tripticaseína e incubar durante 21 h \pm 3 h a una temperatura de 36 °C \pm 2 °C. Seleccionar colonias aisladas y realizar la prueba de oxidasa.

9.4 Control de calidad

Se deben realizar todas las actividades previas de aseguramiento de calidad en microbiología para la preparación de medios y materiales, sus controles positivos y negativos, así como la documentación requerida para demostrar las actividades.

Para la identificación de colonias de color rosa a rojo, se usa como control positivo *Enterobacter aerogenes* (se puede utilizar otra bacteria coliforme diferente a *Enterobacter aerogenes*).

Para identificación de colonias de color azul oscuro a violeta, se usa como control positivo *Escherichia coli*.

Como testigo negativo se utiliza *Enterococcus faecalis* u otro organismo que sea Gram positivo que no fermente la lactosa.

10 Expresión de Resultados

A partir del número de colonias confirmadas contadas en el filtro de membrana, calcular los números de *E. coli* y bacterias coliformes presentes en 100 mL de la muestra (u otro volumen filtrado).

El conteo de bacterias coliformes es la suma de las colonias de color rosa a rojo (oxidasa negativa) y las colonias de color azul oscuro a violeta. El conteo de bacterias de *E.coli* corresponde a las colonias de color azul oscuro a violeta.

Expresión de resultados = UFC/100 mL de muestra

NOTA: Tomar en cuenta el factor de dilución cuando se realicen diluciones

11 Información Requerida de la Prueba

Se debe contar con la siguiente información:

- a) todos los detalles necesarios para la identificación de la muestra;
- b) los resultados expresados de acuerdo con el capítulo 10;
- c) cualquier otra información relevante al método.

12 Concordancia con Normas Internacionales

El presente Proyecto de Norma Mexicana es modificada (MOD) con respecto a la Norma Internacional, ISO 9308-1:2014 Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora, y difiere en los siguientes puntos:

Capítulo/Inciso	Modificaciones
5 Diluyente, medios de cultivo y reactivos	Se incluyó: 5.1 Diluyente. 5.1.1 Agua peptonada (0,1 %): 5.1.2 Agua peptonada isotónica: 5.1.3 Disolución amortiguadora de fosfato: 5.1.3.1 Disolución de fosfato: 5.1.3.2 Disolución de cloruro de magnesio:

	<p>5.1.3.3 Preparación de la disolución amortiguadora de fosfato</p>
<p>Explicación: Los diluyentes que se adicionan son los que se ocupan en microbiología para realizar diluciones de muestra, son varios y es opcional el que ocupe cada laboratorio, no incluidos en la norma ISO 9308-1:2014, que nos ocupa.</p>	
<p>6 Equipos y Materiales</p>	<p>6 Equipos y Materiales</p> <p>6.1 Equipos</p> <p>6.1.1 Horno para esterilización por calor seco con temperatura de 170 °C a 175 °C durante 2 h ó 180 °C durante 1 h.</p> <p>6.1.5 Campana de Flujo Laminar (opcional).</p> <p>6.1.7 Bomba o sistema de vacío.</p> <p>1.8 Balanza granataria verificada</p> <p>6.1.9 Balanza analítica calibrada y verificada</p> <p>6.1.10 Termómetros calibrados y/o verificados</p> <p>6.1.11 Manómetro o termómetro de máximas calibrado.</p> <p>6.1.12 Marco de pesas calibrado.</p> <p>6.2.3 Frascos muestreadores de vidrio resistente 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 bolsas de recolección de plástico estériles, este tipo de material debe contener 0,1 mL de tiosulfato de sodio al 10 %(para muestras que contienen cloro).</p>
<p>Explicación: Los equipos y materiales adicionados a esta norma ISO 9308-1, que nos ocupa , son los que usualmente se tienen y manejan en el laboratorio del área de microbiología para el método.</p>	

7 Recolección, preservación y almacenamiento de muestras	Se adicionó el capítulo 7 Recolección, preservación y almacenamiento de muestras
<p>Explicación: Este es un capítulo que se adiciona en el cuerpo de las Normas Mexicanas NMX-AA del tema análisis de agua, importante para la recolección y almacenamiento y consideraciones para la muestra.</p>	
8 Muestreo	<p>8 Muestreo</p> <p>8.1 Muestreo en pozos, tanques, cisternas de agua de abastecimiento</p> <p>8.2 Muestreo en grifos</p> <p>8.3 Una vez recolectada la muestra, ...</p>
<p>Explicación: Este es un capítulo que se adiciona en el cuerpo de normas mexicanas NMX-AA de análisis de agua, en microbiología , considerando que actualmente no existe ninguna norma mexicana de muestreo en microbiología es por ello que en las publicaciones de estas normas en microbiología se adiciona el capitulo 8 .</p>	
9 Procedimiento	9.1 Selección del volumen
<p>Explicación: Esta es una información con sustento técnico de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd edition, 2017. Que se adiciona para tener el criterio de cuando se requiere tener diluciones en la muestra, hacer conteos establecidos en ISO para mejor interpretación de resultados.</p>	

13 Vigencia

El presente proyecto de norma mexicana entrará en vigor, una vez que concluya su período de consulta pública, a los 120 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el Diario Oficial de la Federación.

Apéndice A (Informativo)

Información microbiológica adicional sobre bacterias coliformes.

Además de expresar β D-galactosidasa, las bacterias coliformes son Gram-negativas no esporuladas, oxidasa negativa, en forma de bastón, con crecimiento aeróbico y anaeróbico facultativo en la presencia de sales biliares u otros agentes tensoactivos con propiedades similares inhibitoras del crecimiento y que normalmente son capaces de fermentar la lactosa con la producción de ácido y aldehído dentro de las 48 h cuando son incubadas a una temperatura de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Además de expresar β D-glucuronidasa, *E. coli* son bacterias coliformes que son capaces de producir indol con el triptófano a $44,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un periodo de $21\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Por lo tanto, en caso de duda sobre las colonias de *E. coli* en el medio de agar primario, puede utilizarse la prueba de indol como confirmación adicional. *E. coli* también da resultados positivos en la prueba de rojo de metilo y pueden descarboxilar el ácido l-glutámico pero no son capaces de producir Acetil metil carbinol y utiliza citrato como única fuente de carbono, o crecer en caldo Moeller-KCN.

14 Bibliografía

- 14.1** Ley Federal sobre Metrología y Normalización, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1992-07-01 y sus reformas.
- 14.2** Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 1999-01-14, última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2012-11-28.
- 14.3** NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1997-01-06.
- 14.4** NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2002-11-27.
- 14.5** NMX-AA-003-1980, Aguas residuales muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1980-03-25.
- 14.6** NMX-Z-013-SCFI-2015, Guía para la estructuración y redacción de Normas (Cancela a la NMX-Z-013/1-1977). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2015-11-18.
- 14.7** ISO 9308/1:2014 Water quality -- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- 14.8** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd edition, 2017.

Ciudad de México, a 13 de junio de 2019

Lic. Alfonso Guati Rojo Sánchez, El Director General de Normas