

Nota: Esta Norma fue modificada de Norma Oficial Mexicana a Norma Mexicana, de acuerdo al Decreto publicado en el Diario Oficial de la Federación de fecha 6 de Noviembre de 1992.

NORMA MEXICANA NMX-AA-102-1987.

CALIDAD DEL AGUA - DETECCION Y ENUMERACION DE ORGANISMOS COLIFORMES, ORGANISMOS COLIFORMES TERMOTOLERANTES Y ESCHERICHIA COLI PRESUNTIVA - METODO DE FILTRACION EN MEMBRANA

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron las siguientes instituciones:

- SECRETARIA DE DESARROLLO URBANO Y ECOLOGIA.
Instituto SEDUE.
- SECRETARIA DE SALUD.
- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS.
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- SECRETARIA DE MARINA.
Dirección General de Oceanografía Naval.
- SECRETARIA DE PROGRAMACION Y PRESUPUESTO.
Dirección General de Geografía.
- DEPARTAMENTO DEL DISTRITO FEDERAL.
Dirección General de Reorganización Urbana y Protección Ecológica.
Laboratorio Central de Control.
- UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO.
Facultad de Química.
- PETROLEOS MEXICANOS.
- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DEL HIERRO Y EL ACERO.
- ASOCIACION MEXICANA CONTRA LA CONTAMINACION DEL AGUA Y EL AMBIENTE.
- CELANESE MEXICANA, S.A.
- MERCK MEXICO, S.A.

0.- INTRODUCCION

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

Esta norma oficial 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 celulósica, 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 parcialmente 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 punto 3.3 de esta norma da usualmente una indicación satisfactoria de contaminación fecal.

2.- REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

NOM-Z-1 Sistema Internacional de Unidades (SI).

NMX-BB-14 Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en laboratorios.

3.- DEFINICIONES

Para propósitos de esta Norma Mexicana, se aplican las siguientes definiciones:

3.1 Organismos coliformes.

Son organismos capaces de formar aeróbicamente colonias ya sea a $308 \pm 1\text{K}$ ($35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) ó $310 \pm 1\text{ K}$ ($37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) en un medio de cultivo lactosado selectivo y diferencial, con producción de ácido y aldehído dentro de un período de 24h.

3.2 Organismos coliformes termotolerantes.

Organismos coliformes como se describe en 3.1 que tienen las mismas propiedades fermentativas a $317 \pm 0.5\text{ K}$ ($44 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Nota: Dado que la producción de gas no es detectable en membranas, los organismos obtenidos por filtración en membrana no son necesariamente los mismos que los detectados mediante el método de tubos múltiples (NMP).

3.3 Escherichia coli (*E. coli*) presuntiva.

Organismos coliformes termotolerantes como se describe en 3.2 que también producen gas a partir de lactosa e indol a partir de triptofano a $317 \pm 0.5\text{ K}$ ($44 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.- PRINCIPIO

El método se basa en la filtración de una alícuota de la muestra a través de una membrana compuesta por esterres 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 ya sea a 308 ó 310 K (35 ó $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) para la detección de organismos coliformes, o alternativamente a 317 K (44°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 cm^3 de la muestra.

5.- APARATOS Y EQUIPO

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

5.1 Horno de aire caliente para esterilización con calor seco.

5.2 Autoclave.

5.3 Incubador o baño de agua, controlado termostáticamente a $308 \pm 1 \text{ K}$ ($35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) ó $310 \pm 1 \text{ K}$ ($37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

5.4 Incubador o baño de agua, controlado termostáticamente a $317 \pm 0.5 \text{ K}$ ($44 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

5.5 Medidor de pH.

5.6 Equipo para filtración con membrana.

5.7 Membranas filtrantes estériles de aproximadamente 47 mm de diámetro, con características de filtración equivalentes a un tamaño de diámetro nominal de poro de $0.45 \text{ }\mu\text{m}$. Si no pueden conseguirse estériles, deben esterilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.8 Pinzas de punta redondeada, para manejar las membranas.

5.9 Frascos para toma de muestras, de vidrio resistente o cristal refractario de 250 cm^3 de boca ancha, con tapón de cristal esmerilado, o bolsas de plástico estériles de volumen equivalente.

5.10 Material común de laboratorio.

6.- REACTIVOS

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se especifique el uso de agua se debe entender agua destilada in vitro o agua desionizada libre de sustancias que pueden inhibir el crecimiento bacteriano en las condiciones de la prueba.

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

6.1 Diluyente.

6.1.1 Diluyente de peptona (0.1%):

Peptona	1g
Agua para llevar a	1000 cm^3

Disolver la peptona en aproximadamente 950 cm^3 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 1000 cm^3 con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a $394 \pm 1 \text{ K}$ ($121 \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 15 min a una presión manométrica de 0.098066 MPa (1 Kg / cm^2).

6.1.2 Solución salina de peptona:

Peptona	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua para llevar a	1000 cm^3

Disolver los componentes hirviéndolos en aproximadamente 950 cm³ 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 . Llevar a 1000 cm³ con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 394 ± 1 K ($121 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 minutos a una presión manométrica de 0.098066 MPa (1 Kg/L cm²).

6.1.3 Solución de Ringer:

Cloruro de sodio (NaCl)	2.25 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.105 g
Cloruro de calcio anhidro (CaCl ₂)	0.12 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0.05 g
Agua para llevar a	1000 cm ³

Disolver los componentes y distribuirlos en volúmenes convenientes. Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 15 minutos a una presión manométrica de 0.098066 MPa (1 Kg/cm²).

6.1.4 Solución amortiguadora de fosfato:

Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	42.5 mg
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	190.0 mg
Agua para llevar a	1000 cm ³

6.1.4.1 Solución de fosfato:

Disolver 34 g de fosfato en 500 cm³ de agua. Ajustar a pH 7.2 ± 0.5 con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L y aforar a 1000 cm³ con agua.

6.1.4.2 Solución de cloruro de magnesio:

Disolver 38 g de cloruro de magnesio en 1000 cm³ de agua.

Para usarla, añadir 1.25 cm³ de solución de fosfato (6.1.4.1) y 5.0 cm³ de solución de cloruro de magnesio (6.1.4.2) a 1000 cm³ de agua. Distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 394 ± 1 K ($121 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 minutos a una presión manométrica de 0.098066 MPa (1 Kg/cm²).

6.2 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:

6.2.1 Agar Lactosa TTC con Tergitol 7.

6.2.1.1 Medio basal.

Lactosa	20.0 g
Peptona	10.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Extracto de carne	5.0 g

Azul de bromotimo	1 0.05 g
Agar (en forma de polvo o escamas)	16.0g a 25.0 g
Agua	1000 cm ³

Disolver los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea de 7.2 ± 0.1 a 293 K (20°C).

Distribuir el medio en matraces en volúmenes de 100 cm³ y esterilizar en autoclave a 394 ± 1 K ($121 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 min a una presión manométrica de 0.098066 MPa (1 Kg / cm²).

* Dependiendo del poder gelante del agar.

6.2.1.2 Solución TTC.

Cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio (TTC)	0.05 g
Agua para llevar a	100 cm ³

Disolver el TTC en parte del agua y aforar a 100 cm³. Esterilizar por filtración con membrana (ver 5.7).

6.2.1.3 Solución de tergitol 7.

Tergitol 7	0.2 g
Agua para llevar a	100 cm ³

Disolver el tergitol en parte del agua y aforar a 100 cm³. Esterilizar en autoclave a 394 ± 1 K ($121 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 min a una presión manométrica de 0.098066 MPa 1 Kg / cm²).

6.2.1.4 Medio completo.

Medio basal (6.2.1.1)	100 cm ³
Solución TTC (6.2.1.2)	5 cm ³
Solución de Tergitol 7 (6.2.1.3)	5 cm ³

Fundir el medio basal (6.2.1.1) y enfriar a 317 ± 2 K ($44 \pm 2^\circ\text{C}$). Añadir las soluciones TTC y de tergitol asépticamente, mezclando perfectamente pero evitando la formación de burbujas después de cada adición. Distribuir en cajas de Petri a una profundidad de aproximadamente 5 mm. Si no se van a usar inmediatamente, almacenar a 277 K (4°C) en la oscuridad por un período no mayor a 10 días.

6.2.2 Agar Lactosa con Tergitol 7.

Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Tergitol 7	0.1 cm ³
Azul de bromotimol	0.025 g

Agar	15.0 g
------	--------

Agua para llevar a	1000 cm ³
--------------------	----------------------

Disolver los componentes en agua. Distribuir en matraces en volúmenes de 100 cm³ y esterilizar en autoclave a 394 ± 1 K (121 ± 1 °C) durante 15 min a una presión manométrica de 0.098066 MPa (1 Kg/cm²). Para utilizarlo, fundir y distribuir en cajas de Petri a una profundidad de aproximadamente 5 mm, almacenar a 277 K (4°C) por no más de 10 días.

6.2.3 Caldo Lauril sulfato para membrana.

Peptona	40.0 g
---------	--------

Extracto de levadura	6.0 g
----------------------	-------

Lactosa	30.0 g
---------	--------

Rojo de fenol (0.4% m/m en solución acuosa)	50.0 cm ³
---	----------------------

Lauril sulfato de sodio (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	1.0 g
--	-------

Agua para llevar a	1000 cm ³
--------------------	----------------------

Añadir los componentes al agua y mezclar suavemente para evitar la formación de espuma. El pH final del medio debe ser de 7.4 a 7.5 y puede ser necesario ajustarlo a aproximadamente 7.6 antes de la esterilización para lograrlo. Distribuir en matraces con tapón de rosca y colocar en autoclave a 388 K (115 °C) durante 10 min.

6.2.4 Medio Endo para membrana.

Triptosa	10.0 g
----------	--------

Tiopeptona	5.0 g
------------	-------

Tripticasa (casitona)	5.0 g
-----------------------	-------

Extracto de levadura	1.5 g
----------------------	-------

Lactosa	12.5 g
---------	--------

Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
-------------------------	-------

Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄)	4.375 g
--	---------

Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	1.375 g
--	---------

Lauril sulfato de sodio (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	0.05 g
--	--------

Desoxicolato de sodio	0.1 g
-----------------------	-------

Sulfito de sodio (Na ₂ SO ₃)	2.1 g
---	-------

Fucsina básica	1.05 g
----------------	--------

Agua para llevar a	1000 cm ³
--------------------	----------------------

Disolver los componentes en agua conteniendo 20 cm³ de etanol 95% (v/v). Calentar a ebullición, quitar inmediatamente y enfriar a 318 K (45°C). No colocar en autoclave. El pH final debe ser de 7.1 a 7.3. Almacenar el medio a 277 K (4°C) en la obscuridad y desechar el medio que no se haya usado después de 4 días.

Nota: Este medio puede solidificarse adicionando de 1.2 a 1.5% (m/m) de agar antes de hervirlo.

6.2.5 Agar LES Endo.

Extracto de levadura	1.2 g
----------------------	-------

Tripticasa (casitona)	3.7 g
-----------------------	-------

Tiopeptona	3.7 g
Triptosa	7.5 g
Lactosa	9.4 g
Fosfato dibásico de potasio ($K_2 HPO_4$)	3.3 g
Fosfato monobásico de potasio ($KH_2 PO_4$)	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	3.7 g
Desoxicolato de sodio	0.1 g
Lauril sulfato de sodio ($NaC_{12} H_{25} SO_4$)	0.05 g
Fucsina básica	0.8 g
Agar	15.0 g
Agua para llevar a	1000 cm ³

Disolver los componentes en agua conteniendo 20 cm³ de etanol 95% (v/v). Calentar a ebullición, enfriar a entre 318 y 323 K (45 y 50°C) y distribuir en volúmenes de 4 cm³ en cajas de Petri pequeñas (60 mm de diámetro), Almacenar las cajas a 277 K (4°C) en la obscuridad y desechar el medio que no se haya utilizado después de 2 semanas. No exponer a luz solar directa.

6.2.6 Medio MFC.

Triptosa	10.0 g
Peptona proteosa No. 3 o polipeptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Lactosa	12.5 g
Sales biliares No. 3 ó mezcla de sales biliares	1.5 g
Azul anilina	0.1 g
Agua para llevar a	1000 cm ³

Rehidratar en agua conteniendo 10 cm³ 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 y enfriar a una temperatura menor a 318 K (45°C). No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser 7.4. El medio debe almacenarse entre 275 y 283 K (2 y 10°C) y cualquier porción no utilizada debe desecharse después de 96 h.

Notas:

1. Este medio puede solidificarse mediante la adición de 1.2 al 5% de agar (m/m) antes de la ebullición.

2. 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 obscuridad entre 275 y 283 K (2 y 10°C) y debe desecharse después de 2 semanas, o antes si su color cambia de rojo oscuro o café oscuro.

6.3 Medios confirmativos.

Utilizar uno o más de los siguientes:

6.3.1 Medio para la producción de gas.

Agua de lactosa peptona.

Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g

Lactosa	10.0 g
Rojo de fenol (0.4% m/m en solución acuosa)	2.5 cm ³
(o indicador de Andrade)	(10 cm ³)
Agua para llevar a	1000 cm ³

Disolver los componentes en agua y ajustar a pH 7.5. Añadir el indicador de rojo de fenol y distribuir en volúmenes de 5 cm³ 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 383 K(110°C) durante 10 min o poner a vapor durante 20 min diarios por 3 días sucesivos. Probar la esterilidad por incubación a 310 K (37°C) durante 24h.

Indicador de Andrade.

Se prepara disolviendo 0.5 g de fucsina ácida en 100 cm³ de agua. Añadir 17 cm³ de solución de hidróxido de sodio (1 mol/L) dejar a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución debe tener un color amarillo paja a la mañana siguiente. Si tiene un tinte café, añadir un poco más de solución de hidróxido de sodio y dejarlo reposar. Esta solución es fuertemente alcalina, y por consiguiente, el medio al que se añada debe ajustarse previamente a un pH aproximado de 6.8.

6.3.2 Medio para la producción de indol.

Agua de triptona.

Algunas peptonas que dan resultados satisfactorios a 310 K (37°C) no son satisfactorias para la prueba de indol a 378 K (44°C). Se ha encontrado que la triptona es satisfactoria y por lo tanto se recomienda.

Triptona	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agua para llevar a	1000 cm ³

Disolver los componentes en agua y ajustar a pH 7.5. Distribuir en volúmenes de 5 cm³ y colocar en autoclave a 38 K (115°C) durante 10 min.

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

Caldo lauril triptosa manitol con triptofano.

Triptosa	20.0 g
Manitol	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄)	2.75 g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	2.75 g
Lauril sulfato de sodio (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	0.1 g
L (-) triptofano	0.2 g
Agua	1000 cm ³

Añadir la triptosa, el cloruro de sodio, el manitol, los fosfatos y el triptofano al agua y calentar para disolver. Añadir el lauril sulfato de sodio y mezclar suavemente para evitar la formación de espuma. Ajustar a pH6.8 ± 0.2. Distribuir en volúmenes de 5 cm³ en tubos conteniendo un tubo de fermentación invertido (Durham). Colocar en autoclave a 378 K (115°C) durante 10 min.

6.4 Reactivos.

6.4.1 Reactivo de Kovacs para indol.

Paradimetilaminobenzaldehído

 $((\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CHO})$ 5.0 gAlcohol amílico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{OH}$)(libre de bases orgánicas) 75 cm^3 Acido clorhídrico (HCl) ($d = 1.18 \text{ g / cm}^3$) 25 cm^3

Disolver el aldehído en el alcohol. Añadir con cuidado el ácido concentrado. Proteger de la luz y almacenar a 277 K (4°C).

Nota: 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.

6.4.2 Reactivo de oxidasa para la prueba de oxidasa.

Clorhidratado de tetrametil-p-fenilendiamina 0.1 g

Agua para llevar a 1000 cm^3

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

7.- MUESTREO

El procedimiento para la recolección de las muestras de agua para el análisis bacteriológico, depende del tipo de agua.

Las muestras para el análisis bacteriológico, se deben tomar en frascos que se hayan lavado con extremo cuidado y esterilizado. En su interior colocar, previo a la esterilización, 0.1 cm^3 de solución de tiosulfato de sodio al 10% con el propósito de inhibir la acción del cloro que pueda contener la muestra, cubriendo además el tapón del frasco hasta el cuello con el papel aluminio.

7.1 Muestreo en cuerpos receptores.

7.1.1 Siempre que sea posible, llenar el frasco a 2/3 partes de su capacidad; una cantidad menor sería insuficiente, si fuera mayor, disminuiría el espacio de aire disponible, necesario para homogeneizar la muestra. Las muestras deben ser representativas del agua en estudio y asimismo no deben contaminarse en forma alguna.

7.1.2 El frasco donde se colecta la muestra no se debe destapar sino hasta el momento en el que se efectúe el muestreo. Se debe evitar que el cuello del frasco se ponga en contacto con los dedos o cualquier otro material contaminante.

7.1.3 El examen de la muestra colectada debe realizarse lo más pronto posible, para evitar proliferación o muerte de las bacterias.

Cuando el examen se practica dos horas después de tomar la muestra, los resultados empiezan a ser inciertos.

7.1.4 EL volumen de muestra suficiente para efectuar el análisis bacteriológico, de preferencia debe ser aproximadamente 200 cm^3 . Es importante que todas las muestras estén acompañadas de datos completos y exactos de identificación y descripción.

7.1.5 El mecanismo de muestreo superficial es el siguiente:

7.1.5.1 Quitar el papel aluminio del cuello del frasco; introducir el frasco aproximadamente 30 cm bajo la superficie del agua.

7.1.5.2 Destapar el frasco dentro del agua. La boca del envase debe quedar en sentido contrario al flujo de la corriente. Si no existe corriente, como en los embalses, crearla empujando el frasco horizontalmente, en dirección opuesta al movimiento de la mano.

7.1.5.3 Una vez que la muestra ocupe el volumen correspondiente del frasco (2/3 partes), tapar sin sacarlo del agua teniendo cuidado de que el papel aluminio vuelva a cubrir el cuello de la botella.

7.1.5.4 Si no es posible la recolección de muestras en las condiciones antes enunciadas, fijar un lastre al frasco, al que se hace descender en el agua.

7.1.6 Para tomar muestras profundas en lagos o embalses, usar aparatos especiales que permitan destapar y tapar mecánicamente el frasco debajo de la superficie.

7.2 Muestreo en pozos y grifos.

7.2.1 Si el pozo está provisto de bomba de mano, bombear durante 5 min para que el agua fluya libremente, antes de tomar la muestra.

7.2.2 Si el pozo está dotado de bomba mecánica, tomar la muestra en una llave previamente flameada de la descarga, dejando que fluya el agua libremente 5 min, antes de tomar la muestra.

7.2.3 Al efectuar este muestreo, se debe evitar que el agua escurra fuera del frasco, además se deben flamear los bordes del frasco y tapón durante el tiempo que dura la toma de muestra. Esto se hace con objeto de mantener al máximo las condiciones de asepsia.

7.2.4 Si no se cuenta con equipo de bombeo, tomar la muestra directamente del pozo por medio de un frasco estéril con lastre. En este caso se debe evitar la contaminación de la muestra por las natas superficiales.

7.2.5 Si se trata de tomar una muestra de un grifo del sistema de servicio, flamear el grifo y abrirlo completamente, dejando que el agua fluya por 2 ó 3 min o el tiempo suficiente para permitir la purga de la línea.

7.2.6 En el momento de tomar la muestra, restringir el flujo de la llave para que se pueda llenar el frasco sin salpicaduras.

7.2.7 Las condiciones de asepsia deben ser las mismas que las enunciadas en el punto 7.2.3.

8.- PRESERVACION Y ALMACENAMIENTO

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 inicie dentro de las dos horas próximas a la recolección de la muestra y en ningún caso, este lapso debe exceder de 24 h para agua potable y de 6 h para otros tipos de agua para que sea válido el resultado del análisis. Durante el período que transcurre del muestreo al análisis, se debe conservar la muestra a 277 K (4°C), con objeto de inhibir la actividad bacteriana para no obtener resultados falsos o dudosos.

9.- PROCEDIMIENTO

9.1 Pretratamiento de la muestra.

Para muestras con alto contenido de materia en suspensión, filtrar utilizando un prefiltro de 0.8 a 1 µm.

9.2 Selección del volumen de muestra.

El volumen máximo de la porción de prueba depende de la filtrabilidad de la muestra de agua y de las membranas utilizadas. Seleccionar un volumen de muestra tal o una dilución del mismo que dé menos de aproximadamente 100 colonias en una membrana de 47 ó 50 mm de diámetro. Para trabajo rutinario se recomienda una muestra de 200 cm³. Cuando se espere un contenido alto de bacterias, puede tomarse una muestra más pequeña (20 cm³); pero se recomienda poner en el embudo previamente 50 cm³ de agua de dilución estéril.

9.3 Filtración.

Colocar las bases en la unidad filtrante y en ambiente estéril (mecheros) encendidos). Colocar la membrana estéril con ayuda de las pinzas de punta redondeada. La cuadrícula de la membrana debe quedar visible. Colocar el embudo con cuidado y sujetarlo.

Agitar vigorosamente la muestra, verter 100 cm³ en el embudo y filtrar con ayuda del vacío. Enjuagar el embudo con la membrana todavía en su lugar con 3 porciones de 20 a 30 cm³ de agua de dilución estéril.

Filtrar un volumen similar de la muestra, o una dilución de ella, a través de dos membranas separadas.

9.4 Transferencia de la membrana.

Después del último enjuague y terminada la filtración, quitar el embudo y con ayuda de la pinza de punta redondeada flamante; levantar la membrana y sobreponerla, ya sea en

a) Una caja de Petri con medio de agar.

b) Un cojinete absorbente estéril saturado previamente con medio líquido en una caja de Petri. Para evitar cualquier crecimiento confluyente, verter cualquier exceso de medio antes o después de colocar la membrana en el cojinete.

c) Un medio de agar fundido a 318 K (45°C), vertido sobre una base de agar al 1.5% en una caja de Petri.

Asegurarse de 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 los volúmenes más pequeños. Para filtrar otra muestra, usar otro equipo de filtración o bien desinfectar el equipo, por ejemplo, por inmersión en agua hirviendo durante cuando menos un minuto. Alternativamente, seguir las instrucciones del fabricante para la desinfección. Durante la filtración de una serie de muestras, si es necesario desinfectar la base del filtro a menos que se contamine o que se dañe la membrana.

No alternar la filtración de muestras contaminadas con muestras de agua tratada en el mismo equipo. Primero filtrar todas las muestras de agua clorada y aquellas de las que se esperan resultados negativos y después las muestras contaminadas. Alternativamente, puede utilizarse un equipo de filtración para todas las muestras cloradas y otro para las muestras contaminadas.

9.5 Incubación.

Invertir las cajas de Petri y colocarlas en una incubadora. Las cajas que contienen membranas en cojinetes absorbentes deben colocarse siempre en recipientes herméticos para evitar la desecación del medio.

Incubar una membrana ya sea 308 ± 0.5 K (35 ± 0.5°C) ó 310 ± 0.5 K (37 ± 0.5°C) entre 18 y 24 h para aislar los organismos coliformes; incubar la otra membrana a 317 ± 0.5 K (44 ± 0.5°C) entre 18 y 24 h para organismos coliformes termotolerantes.

El mismo tipo de medio generalmente puede usarse para ambas membranas, pero utilizar el medio MFC solamente a 317 K (44°C) y los medios Endo y LES Endo a 308 ó 310 K (35 ó 37°C).

Nota: Se recomienda un período preliminar de incubación a menor temperatura, como por ejemplo a 303 K (30°C) durante las primeras 4 h de incubación para reactivar organismos, especialmente en el análisis de agua potable. El cambio puede efectuarse ya sea por transferencia a otra incubadora o utilizando un aparato en el que la

temperatura cambia automáticamente después de un período dado. Idealmente, todas las cajas deben colocarse en la incubadora al mismo tiempo. Alternativamente, las membranas pueden incubarse durante un período limitado (2 a 4 h) en un medio de reactivación y después transferirse a otro medio, usualmente selectivo, para proseguir la incubación.

9.6 Examen de las membranas.

Después de la incubación, las cajas o membranas deben examinarse inmediatamente. Si esto no es posible, pueden almacenarse entre 277 y 278 K (4 y 5°C) durante períodos cortos, siempre y cuando esto no afecte la apariencia de las colonias.

9.6.1 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 308 ó 310 K (35 ó 37°C):

- En agar lactosa TTC con tergitol 7 (6.2.1): Un halo central amarillo en el medio bajo la membrana.

En agar lactosa con Tergitol 7 (6.2.2): Una coloración amarilla, naranja o rojo ladrillo con un halo central amarillo en el medio bajo la membrana.

- En membrana con caldo lauril sulfato (6.2.3): Un color amarillo extendiéndose hacia la membrana.

- En caldo o agar Endo (6.2.4): Un color rojo oscuro con brillo metálico verde - dorado.

- En agar LES Endo (6.2.5): Un color rojo oscuro con brillo metálico verde - dorado.

9.6.2 Considerar como organismos coliformes termotolerantes presuntivos todas las colonias que muestren, después de incubación a 317 K (44°C), las mismas características coloniales que se describen anteriormente (9.6.1). Si se usa medio MFC (6.2.6), las colonias serán de color azul.

9.7 Es importante hacer notar que las cuentas de colonias en membranas a 310 K (37°C) y a 317 K (44°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 y otras circunstancias, es importante llevar a cabo las pruebas confirmativas.

9.7.1 Resembrado, incubación y examen.

Para confirmar los resultados de la membrana, resembrar cada colonia (9.6.1) o un número representativo de ellas (una por tubo) en agua lactosa Peptona (6.3.1) e incubar a 308 K (35°C) ó 310 K (37°C) durante 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 317 K (44°C) ó 308 ó 310 K (35 ó 37°C), resembrar cada colonia (9.6.2) o un número representativo de ellas (una por tubo), en agua lactosa peptona y agua triptona e incubarlos a 317 K (44°C) durante 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 a 0.3 cm³ de reactivo de Kovacs (6.4.1) confirma la presencia de E. coli presuntiva.

Notas:

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

2. 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.

9.8 Prueba de oxidasa.

Algunas bacterias encontradas en el agua pueden conformarse a la definición de organismos coliformes en muchos aspectos, pero pueden producir gas a partir de lactosa solamente a temperaturas inferiores a 310 K (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 303 a 308 K (30 a 35°C) pero a pesar de ello pueden producir ácido y gas a partir de lactosa a 310 K (37°C). Tienen poco significado como indicadores de contaminación fecal y se distinguen del grupo coliforme por una reacción de oxidasa positiva.

9.8.1 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 (6.4.2), recientemente preparado, en un papel filtro en una caja de Petri.

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 oscuro púrpureo dentro de un período de 10 seg como una reacción positiva.

Nota: En cada ocasión en la que se utilice el reactivo de oxidasa, llevar a cabo pruebas de control con cultivos de organismos que se sepa dan una reacción positiva (*Pseudomonas aeruginosa*) y uno que dé una reacción negativa (*E. coli*).

10.- EXPRESION DE RESULTADOS

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 1100 cm³ de la muestra, expresando el resultado como unidades formadoras de colonias en un volumen de referencia especificado en la muestra (generalmente 100 cm³ ó 1 cm³) de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

que puede expresarse como:

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

donde:

Cs = Numero de unidades formadoras de colonias en el volumen de referencia Vs de la muestra.

∑ N1 = Suma de las colonias en todas las cajas o membranas contadas filtradas / siembras de dilución F1 .

n1 = Número de cajas contadas para una dilución particular F1 .

V1 = Volumen de dilución de la muestra F1 en la placa y.

F1 = Dilución usada para la porción de muestra V1 (F = 1 una muestra no diluida, F = 0.1 para una dilución a 10 veces, etc.).

V_s = Volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración de los microorganismos en la muestra.

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

11.- REPORTE DE LA PRUEBA

El reporte de la prueba debe hacer referencia a esta 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.
- 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.- BIBLIOGRAFIA

- a) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 15a edición, 1980.

13.- CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta Norma concuerda parcialmente con el anteproyecto de norma ISO 9308/1. Water quality - Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* by the membrane filtration method.