

PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005

CALIDAD DEL AGUA.-DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y *Escherichia coli* PRESUNTIVA (CANCELARÁ A LA NMX-AA-042-1987)

WATER QUALITY- DETERMINATION OF THE MOST PROBABLE NUMBER (NMP) OF TOTAL COLIFORMS, FECAL COLIFORMS (THERMAL TOLERANTS), AND *Escherichia coli* PRESUMPTIVE

P R E F A C I O

En la elaboración de este Anteproyecto de Norma Mexicana participaron las siguientes asociaciones, cámaras, dependencias, laboratorios privados, instituciones de educación superior e institutos de investigación:

Arva, Laboratorio de Análisis Industriales, S.A. de C.V.

Centro de Investigación y Asesoría Tecnológica en Cuero y Calzado, A.C. (Ciatec)

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C.
Departamento de Análisis Químico

Centro de Servicios Químicos. Carlos Gerardo Zavala Porto y Copropietarios

Centro Nacional de Metrología

Comisión del Agua del Estado de México

Comisión Nacional del Agua

Comisión Federal de Electricidad Gerencia de Centrales Nucleolétricas de la Central Laguna Verde. Jefatura de Ingeniería Ambiental

Control Químico Novamann Internacional, S.A. de C.V.

Earth Tech México, S.A. de C.V.

Eccaciv, S.A. de C.V.

Gobierno del Distrito Federal D.G.C.O.H. Dirección Técnica

Gobierno del Distrito Federal. Secretaría de Obras y Servicios. Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica

Gobierno del Distrito Federal. Secretaría del Medio Ambiente. Dirección General de Regulación y Vigilancia Ambiental

Instituto de Estudios Superiores de Tamaulipas, A.C. Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental. (CITSA)

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua

Instituto Mexicano del Petróleo. Sección de Análisis Físicoquímicos de Aguas.

Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Central de Instrumentación

Intema, S.A. de C.V.

Intertek Testing de Services de México, S.A. de C.V. Laboratorio Ciudad de México-Ambiental

Laboratorio de Calidad Química Veracruzana, S.C.

Laboratorio de Química del Medio e Industrial, S.A. de C.V.

Laboratorio del Grupo Microanálisis, S.A. de C.V.

Laboratorio Fermi, S.A. de C.V.

Laboratorio IDECA, S.A. DE C.V.

Laboratorio Químico Industrial / Jorge Enrique Santoyo Martínez

Laboratorios ABC, Química, Investigación y Análisis, S.A. de C.V.

Mercury Lab, S.A. de C.V.

Mónica Orozco Márquez

Pemex Refinación Refinería Ing. Héctor R. Lara Sosa. Superintendencia de Química. Laboratorio Central

Perkin Elmer de México, S.A.

Petroquímica Cangrejera, S.A. de C.V. Laboratorio de Control Ambiental

Petroquímica Cosoleacaque, S.A. de C.V. Superintendencia de Control Químico

Petroquímica Morelos, S.A. DE C.V. Laboratorio de Ecología

Petroquímica Pajaritos, S.A. de C.V. Laboratorio de Ecología

Protección Ambiental y Ecología, S.A. de C.V.

Refinería "Ing. Antonio Dovalí Jaime". Superintendencia de Química.

Secretaría de Salud. Dirección General de Promoción de la Salud

Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey, S.A. de C.V. Laboratorio Central de Calidad de Aguas

Servicios de Ingeniería y Consultoría Ambiental (Sica)

Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Química

Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco. División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Coordinación de la Licenciatura de Química

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Laboratorio de Hidrobiología

Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería

Varian, S. de R.L. de C.V

NMX-AA-042-SCFI-2005

CALIDAD DEL AGUA.-DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALIS (TERMOTOLERANTES) Y Escherichia coli PRESUNTIVA.

WATER QUALITY- DETERMINATION OF THE MOST PROBABLE NUMBER (NMP) OF TOTAL COLIFORMS, FECAL COLIFORMS (THERMAL TOLERANTS), AND Escherichia coli PRESUMPTIVE

ÍNDICE

0. Introducción
1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Principio del método
4. Definiciones
5. Reactivos y patrones
6. Equipo y materiales
7. Recolección, preservación y almacenamiento de muestras
8. Control de calidad
9. Calibración
10. Procedimiento
11. Cálculos
12. Interferencias
13. Seguridad
14. Manejo de residuos
15. Bibliografía
16. Concordancia con normas internacionales

0 INTRODUCCIÓN

La presencia y extensión de contaminación fecal es un factor importante en la determinación de la calidad de un cuerpo de agua. Las heces contienen una variedad de microorganismos y formas de resistencia de los mismos, involucrando organismos patógenos, los cuales son un riesgo para la salud pública al estar en contacto con el ser humano. El examen de muestras de agua para determinar la presencia de microorganismos del grupo coliforme que habitan normalmente en el intestino humano y de otros animales de sangre caliente, da una indicación sensible de dicho tipo de contaminación fecal. Dada la limitada capacidad de algunos miembros del grupo de organismos coliformes para sobrevivir en agua; sus números también pueden emplearse para estimar el grado de contaminación fecal.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Mexicana establece un método para la detección y enumeración en agua de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva (*E. coli*) mediante el cultivo de un medio líquido en tubos múltiples y el cálculo de sus números más probables (NMP) en la muestra.

Este método es aplicable en todo tipo de agua, incluyendo aquellos que contienen una cantidad apreciable de materia en suspensión.

La selección de las pruebas usadas en la detección y confirmación del grupo de organismos coliformes, incluyendo *E. coli*, puede verse como una parte de la secuencia continua. El grado de confirmación con una muestra en particular depende parcialmente de la naturaleza del agua y de las razones para realizar el examen. En la práctica la detección de *E. coli* presuntiva, como se define en el punto 4.8 de esta norma da usualmente una indicación satisfactoria de la contaminación fecal.

2. REFERENCIAS

No aplica.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método se basa en la inoculación de alicuotas de la muestra diluida o sin diluir, en una serie de tubos de un medio de cultivo líquido conteniendo lactosa.

Los tubos se examinan a las 24 y 48 horas de incubación ya sea a 35 a- 37°C. Cada uno de los que muestren turbidez con producción de gas se resiembró en un medio selectivo para confirmación.

Se lleva a cabo la incubación de estos medios selectivos hasta por 48 horas a 35 - 37 °C para la detección de organismos coliformes y por 24 horas a 44.0 ± 1 °C para organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *E. coli*.

Mediante tablas estadísticas, se lleva a cabo el cálculo del número más probable (NMP) de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *E. coli* que puedan estar presentes en 100 mL de muestra a partir del número de tubos que den resultados confirmativos positivos

4. DEFINICIONES

Para los efectos de esta Norma Mexicana, se establecen las siguientes definiciones:

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 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.

4.5 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 44.0 ± 1 °C, fermenta la lactosa y el manitol produciendo ácido y gas, produce indol a partir del triptofano, es oxidasa negativo y no hidroliza la urea.

4.6 Fermentación

Oxidación aeróbica-anaeróbica de compuestos por la acción enzimática de los microorganismo

4.7 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.

4.8 Medios diferenciales

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

4.9 Muestra

La que se tome en el punto de descarga, 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.

4.10 Número Más Probable (NMP)

Expresión estadística que se utiliza para estimar la cantidad de bacterias coliformes presentes en un volumen de muestra determinado.

4.11 Organismo aerobio

Organismo que requiere de oxígeno molecular para su desarrollo.

4.12 Organismo anaerobio

Organismo que se desarrolla en ausencia de oxígeno molecular.

4.13 Organismo Anaerobio facultativo

Organismo que se desarrolla tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

4.14 Organismos coliformes

Comprende todos los bacilos aerobios o anaerobios facultativos Gram negativos , no esporulados que fermentan la lactosa a 35 a 37 ° C con producción de gas y ácido en un periodo de 24 a 48 horas.

4.15 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 (44.0 ± 1 °C) en un plazo de 24 horas.

4.16 Parámetro

Variable que se utiliza como referencia para determinar la calidad del agua.

5. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

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

Para la preparación de los reactivos, las condiciones de esterilización deben de ser 121°C durante 15 minutos. Los tubos de fermentación (tipo Durham) no deben contener burbujas después de la esterilización.

En caso de utilizar medios deshidratados, seguir las recomendaciones del fabricante para su preparación o en su caso utilizar uno de los siguientes medios de cultivo:

5.1 Medios de cultivo presuntivos.

5.1.1 Caldo lauril triptosa

Medio de doble concentración:

Triptosa	40.0g
Lactosa	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0g
Fosfato Monobásico de potasio (KH_2PO_4)	5.5 g
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	55 g
Lauril sulfato de sodio.	0.2 g
Agua para llevar a	1000 mL

Añadir la triptosa y el cloruro de sodio al agua, calentar para disolver y añadir el lauril sulfato de sodio. Disolver el resto de los componentes por separado y agregarlos a los anteriores mezclándolos suavemente para evitar la formación de espuma. Ajustar a pH 6.8. Preparar el medio de simple concentración diluyendo el medio de doble concentración con un volumen igual de agua.

Distribuir el medio de simple concentración en volúmenes de 5 mL y el medio de doble concentración en volumen de 10 y 50 mL. Cada tubo o matraz debe contener un tubo de fermentación invertido (tipo Durham). Colocar en autoclave a 121°C durante 15 min.

5.1.2 Caldo Lactosa.

Medio doble de concentración:

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Extracto de carne	6.0 g
Agua para llevar a	1000 mL

Disolver los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH de modo que al terminar la esterilización sea de 6.7. Preparar el medio de simple concentración diluyendo el medio de doble concentración con un volumen igual de agua.

Distribuir el medio de simple concentración en volúmenes de 5 mL y el de doble concentración en volúmenes de 10 y 50 mL. Cada tubo o matraz debe contener un tubo

de fermentación invertido (tipo Durham). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Nota 1: Estos medios son de uso común en numerosos países. La selectividad del CLT depende respectivamente de la presencia de sales Biliares y del agente de superficie activo, el Lauril sulfato. El caldo lactosa no es un medio selectivo.

5.2 Utilizar uno o más de los siguientes medios de cultivo confirmativos:

5.2.1 Medios para la producción de gas:

5.2.1.1 Caldo bilis lactosa verde brillante:

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Bilis de buey (deshidratada)	20.0 g
Verde brillante (0.1% m/vol. en solución)	13.0 mL
Agua para llevar a	1000 mL

Disolver la peptona en 500 mL de agua. Añadir los 20 g de bilis de buey deshidratada disueltos en 200 mL de agua; la solución debe tener un pH entre 7.0 y 7.5 disolver con agua hasta un volumen aproximado de 975 mL. Agregar la lactosa y ajustar el pH a 7.4 con solución de Hidróxido de Sodio 1N o ácido clorhídrico 1N. Añadir la solución de verde brillante y aforar a 1000 mL con agua.

Distribuir en tubos de ensaye con suficiente medio para que el tubo invertido quede cubierto y colocar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.2.1.2 Medio EC:

Triptosa o tripticasa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄)	4.0 g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agua para llevar a	1000 mL

Disolver los componentes por separado y agregarlos agitando suavemente. El pH debe ser de 6.9 + 0.2, distribuir en tubos de fermentación con suficiente medio para que el tubo invertido quede cubierto después de la esterilización.

Como medio confirmativo para coliformes totales, el mas generalizado es el caldo de bilis lactosa verde brillante (BLVB). Para confirmar la presencia de coliformes fecales (termotolerantes) se utiliza el caldo EC.

5.2.2 Medio para la producción de indol

5.2.2.1 Agua de triptona:

Triptona	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCL)	5.0 g
Agua para llevar a	1000 mL

Disolver los componentes en agua y ajustar el pH a 7.5 distribuir en volúmenes de 5 mL y colocar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Nota 2: La adición de 0.1% (m/v) de L ó DL-triptofano puede mejorar el funcionamiento del medio.

5.3 Reactivo de Kovacs para Indol:

1,4 dimetilaminobenzaldehído (C ₆ H ₄ [H(CH ₃) ₂] CHO)	5.0 g
Alcohol amílico (CH ₃ (CH ₂) ₄ CH) libre de bases orgánicas	75 mL
Acido clorhídrico concentrado (HCL)	25 mL

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

Nota 3: El reactivo debe tener una coloración entre amarillo claro y café claro; algunas muestras de Alcohol Amílico son insatisfactorias y dan una coloración oscura con el Aldehído

5.4 Reactivo para la prueba de Oxidasa:

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina	0.1 g
Agua	10 mL

Este reactivo no es estable y debe prepararse para usarse en pequeñas cantidades cada vez que sea necesario.

5.5 Diluyentes

5.5.1 Diluyentes de peptona (0.1 %).

Peptona	1.0 g
Agua para llevar a	1000 mL

Disolver la peptona en aproximadamente 950 mL de agua. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1N de modo que después de la esterilización sea de 7.0 ± 0.1. Aforar a 1000 mL con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

5.5.2 Solución amortiguadora de Fosfato (Solución Madre)

Fosfato monobásico de Potasio (KH ₂ PO ₄)	42.5 mg
Cloruro de Magnesio (MgCL ₂)	190.0 mL

5.5.2.1 Solución de Fosfato

Disolver 34 g de Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4) en 500 mL de agua. Ajustar el pH 7.2 ± 0.5 con la solución de Hidróxido de Sodio 1 N y aforar a 1000 mL con agua.

5.5.2.2 Disolución de Cloruro de Magnesio

Disolver 38 g de Cloruro de Magnesio anhidro o 81 g de Cloruro de Magnesio hexahidratado en 1000 mL de agua.

Para usarla, añadir 1.25 mL de solución de Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4)(5.5.2.1) y 5.0 mL de solución de Cloruro de Magnesio (5.5.2.2) a 1000 mL de agua. Distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6. EQUIPOS Y MATERIALES

Sólo se mencionan los equipos y materiales que son de relevancia para el presente método.

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

6.1 Incubadora capaz de mantener una temperatura de $(35-37^\circ\text{C})$.

6.2 Incubadora para coliformes fecales (termotolerantes) o baño maría capaz de mantener una temperatura de $44.0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

6.3 Estufa capaz de mantener una temperatura de $170-200^\circ\text{C}$.

6.4 Autoclave u olla de presión con manómetro.

6.5 pHmetro con precisión de 0.1 unidades en escala de pH

6.6 Balanza granataria con exactitud de ± 0.1 g y/o balanza analítica con exactitud de ± 0.01 g.

6.7 Pipetas graduadas

6.8 Pipeteros de aluminio o acero inoxidable, se puede sustituir por papel aluminio o papel Kraft.

6.9 Tubos de ensaye de cristal, refractario de volumen adecuado con tapón de baquelita, (preferentemente) aluminio o algodón (este no debe ser utilizado más de una ocasión).

6.10 Frascos muestradores de vidrio resistente o cristal refractario de 125 mL, con tapón de cristal esmerilado o tapa de rosca o bolsa de recolección de plástico estéril o frascos de plástico estériles desechables.

6.11 Tubos de fermentación (tipo Durham)

6.12 Asas de inoculación

6.13 Material de uso común en laboratorio

7. RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

7.1 El muestreo se realiza de acuerdo a las Normas de muestreo vigentes.

El análisis bacteriológico de la muestra debe practicarse antes de que hayan transcurrido 24 horas.

Durante el período que transcurre del muestreo al análisis, se debe conservar la muestra a $4 \pm 1^\circ \text{C}$, con objeto de inhibir la actividad bacteriana.

8. CONTROL DE CALIDAD

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

8.2 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.

- Las bitácoras manuscritas del analista y del equipo en los que se contengan los siguientes datos:

- a) Identificación de la muestra

- b) Fecha del análisis

- c) Procedimiento cronológico utilizado

- d) Cantidad de muestra utilizada

- e) Número de muestras de control de calidad analizadas

- f) Trazabilidad de las calibraciones de los instrumentos de medición

- g) Evidencia de la aceptación o rechazo de los resultados

- h) Además el laboratorio debe mantener la información original reportada por los equipos en disquetes 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:

9.1 Balanza analítica.

9.2 pHmetro: La verificación de este equipo debe hacerse antes de iniciar cualquier análisis.

10. PROCEDIMIENTO

10.1 Pruebas presuntivas

10.1.1 Preparación de la muestra e inoculación del medio.

Antes del examen, mezclar perfectamente la muestra agitándola vigorosamente para lograr una distribución uniforme de los microorganismos y, dependiendo de la naturaleza del agua y el contenido bacteriano esperado, hacer todas las diluciones necesarias en esta etapa.

Utilizar series que consten de por lo menos tres diluciones por ejemplo:

10 mL, 1.0 mL y 0.1 mL o bien 1.0 mL, 0.1 mL y 0.01 mL o las que se consideren necesarias.

Por cada dilución debe haber 3 ó 5 tubos.

Para diluciones a 10 veces, poner 90 ó 9 mL del diluyente en matraces o tubos de dilución esterilizados. Alternativamente, usar volúmenes de diluyente preesterilizado en matraces con tapón de rosca o algodón. Hacer una o más diluciones a 10 veces transfiriendo un volumen de la muestra de agua a 9 volúmenes del diluyente. Repetir estos pasos cuantas veces sea necesario. Preparar suficiente cantidad de cada dilución para todas las pruebas que se vayan a llevar a cabo con la muestra. Para diluciones diferentes a 10 veces ajustar el volumen de diluyente a la porción de prueba. Inocular los tubos conteniendo medios de aislamiento de doble concentración con porciones de prueba de un volumen mínimo de 5 mL.

10.1.2 Incubación de los tubos

Incubar los tubos inoculados a 35°C -37 °C durante 48 h.

10.1.3 Examen de los tubos

Examinar los cultivos de los tubos después de un periodo de incubación de 18 a 24 horas y considerar como resultados positivos aquellos que muestren turbidez debido al crecimiento bacteriano y formación de gas en los tubos internos invertidos (Tipo Durham) junto con producción de ácido si el medio de aislamiento contiene un indicador de pH. Reincubar aquellos tubos que no muestren alguno o todos estos cambios y examinarlos nuevamente para detectar reacciones positivas a las 48 horas.

10.2 Pruebas confirmativas.

10.2.1 Inoculación del medio.

Resembrar a partir de cada tubo de medio de aislamiento que muestre un resultado positivo en uno o más tubos de medio confirmativo (6.2) para detectar la producción de gas e indol.

Nota 4.- Si se usa el medio de caldo lactosa para aislar, resembrar en alguno de los medios confirmativos, caldo Bilis lactosa Verde Brillante o caldo EC para efectuar la confirmación.

10.2.2 Incubación y examen.

Para confirmar la presencia de organismos coliformes, incubar un tubo de caldo Bilis Lactosa Verde Brillante a 37 °C y examinarlo para ver si hay producción de gas dentro de un periodo de 48 horas.

Para confirmar la presencia de organismos coliformes fecales (termotolerantes), incubar otro tubo de caldo EC a 44.0°C ± 1 °C durante 24 h para ver si hay producción de gas.

Para confirmar la presencia de *E. coli* presuntiva, incubar un tubo de agua de triptona para detectar la formación de indol a 44.0°C ± 1 °C durante 24 h. Después añadir de 0.2 a 0.3 mL de reactivo de kovacs (6.3) al tubo de agua de triptona; el desarrollo de un anillo de color rojo después de agitar suavemente denota la presencia de indol.

Nota 5.- La detección de *E. coli* presuntiva se considera una evidencia satisfactoria de contaminación fecal. Sin embargo, pueden efectuarse mayores pruebas para la confirmación de *E. coli* si se considera necesario.

10.3 Prueba de oxidasa

Algunas bacterias existentes en el agua pueden conformarse a la definición de organismos coliformes en muchos aspectos, pero son capaces de producir gas a partir de lactosa solamente a temperaturas inferiores a 37°C. Por consiguientes, dan 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, tiene una temperatura optima de crecimiento en el rango de 30 a 35°C, pero a pesar de ello son capaces de producir ácido y gas a partir de lactosa a 37°C. Tienen poco significado para afectos sanitarios y se distinguen del grupo de los coliformes por una reacción de oxidasa positiva.

10.3.1 Llevar a cabo la prueba con subcultivos puros de los organismos fermentadores de lactosa, crecidos en medios nutrientes de agar como sigue:

a) Colocar de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa recientemente preparada (6.4) en un papel filtro en una caja petri.

b) Con una barra de vidrio o asa de alambre de platino (no de nicromel) o palillo estéril de madera, colocar parte del cultivo en papel filtro preparado.

c) Considerar la aparición de un color azul marino púrpuro en un lapso de 10 segundos como una reacción positiva.

Nota 6.- En cada ocasión que se use 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 de una reacción negativa (*E. coli*) en 100 mL de la muestra.

11. CÁLCULOS.

A partir del número de tubos que dan reacciones positivas en los medios presuntivos y confirmativos, calcular por referencia a las tablas estadísticas (ver tabla) el número más probable de organismos coliformes, organismos coliformes fecales (termotolerante) y *E. coli* presuntiva en 100 mL de la muestra. Cuando se emplean diluciones, el resultado final deberá multiplicarse por el factor de dilución para hacerlo equivalente.

En el caso de no encontrar en las tablas la combinación de tubos adecuada, emplear para los cálculos la siguiente ecuación:

$$\text{NMP/100 ml} = \sqrt{\frac{\text{No. de tubos positivos} \times 100}{\frac{\text{ml de muestra en tubos negativos}}{\text{ml de muestra en todos los tubos}}}}$$

Tabla 1

Índice del NMP y límite confiable de 95 % para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 5 tubos con porciones de 10 mL , 5 porciones de 1 mL y 5 porciones de 0.1 mL

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%		No. De tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%	
5 tubos con 10 ml	5 tubos con 1ml	5 tubos con 0.1 ml		Inferior	Superior	5 tubos con 10ml	5 tubos con 1ml	5 tubos con 0.1ml		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-	4	2	1	26	12	65
0	0	1	2	1.0	10	4	3	0	27	12	67
0	1	0	2	1.0	10	4	3	1	33	15	77
0	2	0	4	1.0	13	4	4	0	34	16	80
1	0	0	2	1.0	11	5	0	0	23	9.0	86
1	0	1	4	1.0	15	5	0	1	30	10	110
1	1	0	4	1.0	15	5	0	2	40	20	140
1	1	1	6	2.0	18	5	1	0	30	10	120
1	2	0	6	2.0	18	5	1	1	50	20	150
						5	1	2	60	30	180
2	0	0	4	1.0	17						
2	0	1	7	2.0	20	5	2	0	50	20	170
2	1	0	7	2.0	21	5	2	1	70	30	210
2	1	1	9	3.0	24	5	2	2	90	40	250
2	2	0	9	3.0	25	5	3	0	80	30	250
2	3	0	12	5.0	29	5	3	1	110	40	300
				1		5	3	2	140	60	360
3	0	0	8	3.0	24						
3	0	1	11	4.0	29	5	3	3	170	80	410
3	1	0	11	4.0	29	5	4	0	130	50	390
3	1	1	14	6.0	35	5	4	1	170	70	480
3	2	0	14	6.0	35	5	4	2	220	100	580
3	2	1	17	7.0	40	5	4	3	280	120	690
						5	4	4	350	160	820
4	0	0	13	5.0	38	5	5	0	240	100	940
4	0	1	17	7.0	45	5	5	1	300	100	1300
4	1	0	17	7.0	46	5	5	2	500	200	2000
4	1	1	21	9.0	55	5	5	3	900	300	2900
4	1	2	26	12	63	5	5	4	1600	600	5300
4	2	0	22	9.0	56	5	5	5	>=1600		

Tabla 2

Índice del NMP y límite confiable de 95 % para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 1 tubo con porciones de 50 ml , 5 tubos con porciones de 10 ml y 5 tubos con porciones de 1 ml.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%		No. De tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%	
1 tubos con 50 ml	5 tubos con 10 ml	5 tubos con 1ml		Inferior	Superior	1 tubos con 50ml	5 tubos con 10ml	5 tubos con 1ml		Inferior	Superior
0	0	0	<1	-	-	1	2	1	7	1	17
0	0	1	1	<0.5	4	1	2	2	10	3	23
0	0	2	2	<0.5	6	1	2	3	12	3	28
0	1	0	1	<0.5	4	1	3	0	8	2	19
0	1	1	2	<0.5	6	1	3	1	11	3	26
0	1	2	3	<0.5	8						
						1	3	2	14	4	34
0	2	0	2	<0.5	6	1	3	3	18	5	53
0	2	1	3	<0.5	8	1	3	4	21	6	66
0	2	2	4	<0.5	11	1	4	0	13	4	31
0	3	0	3	<0.5	8	1	4	1	17	5	47
0	3	1	5	<0.5	13						
0	4	0	5	<0.5	13	1	4	2	22	7	69
						1	4	3	28	9	85
1	0	0	1	<0.5	4	1	4	4	35	12	100
1	0	1	3	<0.5	8	1	4	5	43	15	120
1	0	2	4	<0.5	11	1	5	0	24	8	75
1	0	3	6	<0.5	15						
1	1	0	3	<0.5	8	1	5	1	35	12	100
						1	5	2	54	18	140
1	1	1	5	<0.5	13	1	5	3	92	27	220
1	1	2	7	1	17	1	5	4	160	39	450
1	1	3	9	2	21	1	5	5	>=240		
1	2	0	5	<0.5	13						

Tabla 3

Índice del NMP y límite confiable de 95 % para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 5 tubos con porciones de 50 ml, 5 con porciones de 10 ml y 5 tubos con porciones de 1 ml .

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%		No. De tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%	
5 tubos con 50ml	5 tubos con 10ml	5 tubos con 1ml		Inferior	Superior	5 tubos con 50ml	5 tubos con 10ml	5 tubos con 1 ml		Inferior	Superior

0	0	0	<1	-	-	4	1	1	4	1	9
0	0	1	1	<0.5	2	4	1	2	4	1	9
0	1	0	1	<0.5	2	4	2	0	4	1	9
0	1	1	1	<0.5	2	4	2	1	4	1	9
0	2	0	1	<0.5	2	4	2	2	5	2	12
0	3	0	1	<0.5	2	4	3	0	5	2	12
1	0	0	1	<0.5	2	4	3	1	5	2	12
1	0	1	1	<0.5	2	4	3	2	6	2	14
1	1	0	1	<0.5	2	4	4	0	6	2	14
1	1	1	1	<0.5	2	4	4	1	7	3	17
1	2	0	1	<0.5	2	4	5	0	7	3	17
1	2	1	2	<0.5	4	4	5	1	8	3	19
1	3	0	2	<0.5	4	5	0	0	4	1	9
2	0	0	1	<0.5	2	5	0	1	4	1	9
2	0	1	1	<0.5	2	5	0	2	6	2	14
2	1	0	1	<0.5	2	5	1	0	5	2	12
2	1	1	2	<0.5	4	5	1	1	6	2	14
2	2	0	2	<0.5	4	5	1	2	7	3	17
2	2	1	2	<0.5	4	5	2	0	6	2	14
2	3	0	2	<0.5	4	5	2	1	8	3	19
2	3	1	3	1	7	5	2	2	10	4	23
2	4	0	3	1	7	5	2	3	12	4	28
3	0	0	2	<0.5	4	5	3	0	9	3	21
3	0	1	2	<0.5	4	5	3	1	11	4	26
3	1	0	2	<0.5	4	5	3	2	14	5	34
3	1	1	2	<0.5	4	5	3	3	18	6	53
3	1	2	3	1	7	5	4	0	13	6	31
3	2	0	3	1	7	5	4	1	17	6	47
3	2	1	3	1	7	5	4	2	22	7	70
3	2	2	4	1	9	5	4	3	28	9	85
3	3	0	3	1	7	5	4	4	35	11	100
3	3	1	4	1	9	5	5	0	24	8	75
3	4	0	4	1	9	5	5	1	35	11	100
3	4	1	4	1	9	5	5	2	54	18	140
4	0	0	2	<0.5	4	5	5	3	92	27	220
4	0	1	3	1	7	5	5	4	160	39	420
4	0	2	3	1	7	5	5	5	>=240		
4	1	0	3	1	7						

Tabla 4

Índice del NMP y límite confiable de 95 % para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 3 tubos con porciones de 10 ml, 3 tubos con porciones de 1 ml, 3 tubos con porciones de 0.1 ml .

No. de tubos con reacciones positivas	Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%
---------------------------------------	---------------------------	-------------------------

3 tubos con 10 ml	3 tubos con 1 ml	3 tubos con 0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	3
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	>=2400		

11.1 Confiabilidad

El procedimiento de fermentación en tubos múltiples es el método más usado por su facilidad y economía. El resultado de esta prueba se expresa por el “numero mas probable” (NMP), pero debe entenderse que el método no es exacto ya que solo nos da la probable densidad de bacterias coliformes totales o coliformes fecales (termotolerantes) de una muestra determinada.

La confiabilidad esta dada por los niveles superiores o inferiores del límite de confianza al 95% establecido en las tablas para cada NMP/100 mL, no obstante, es una indicación importante para evaluar la calidad sanitaria del agua.

12. INTERFERENCIAS

Colocar en el material de muestreo, previo a la esterilización, 0.1 mL de solución de tiosulfato de sodio al 10% 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 de trabajo seguro y un archivo de las normas de seguridad respecto a la exposición y manejo seguro de las sustancias químicas especificadas 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 empleados 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 El hidróxido de sodio en contacto con los ojos o piel, puede causar severa irritación o quemaduras. La inhalación de vapores puede causar tos, dolor en el pecho, dificultad para respirar o estado de inconsciencia.

14 MANEJO DE RESIDUOS

Es la responsabilidad del laboratorio cumplir con todos los reglamentos federales, estatales y locales referente al manejo de residuos, particularmente las reglas de identificación, almacenamiento y disposición de residuos peligrosos.

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.

14.3 Todas las muestras que cumplan con la Norma de descarga a alcantarillado pueden descargarse en el mismo sistema.

15. BIBLIOGRAFÍA

15.1 Standard Methods for The Examination Of Water And Wastewater. 20th edition. páginas 9-45 a 9-51.1998.

15.2 Norma ISO/DP 9308/2. Water Quality-detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli by the multiple tube (most probable number) method.

15.3 NMX-AA-03-1980.- Aguas residuales.- muestreo.

15.4 NOM-008-SCFI-2002- Sistema general de unidades de medida.

- 15.5 NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- 15.6 NMX-AA-116-SCFI-2001.-Análisis de Agua-guía de solicitud para la presentación de métodos alternos
- 15.7 NMX-AA-014-1980.- Cuerpos receptores.- muestreo
- 15.8 Procedimiento obligatorio para el muestreo de descargas.- articulo 278-b de la ley federal de derechos.- 1997.
- 15.9 NMX-AA-89/1-1986.- Protección al ambiente - calidad del agua - vocabulario - parte 1.
- 15.10 NMX-AA-115-SCFI-2001.- Análisis de Agua.- criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos.
- 15.11 NMX-AA-008-SCFI-2000.-Análisis de Agua- Determinación del pH
- 15.12 NOM-BB-14 Clasificación y tamaños para utensilios de vidrio usados en el laboratorio

16. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

El método analítico concuerda con la Norma ISO/DP 9308/2. Water Quality-detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* by the multiple tube (most probable number) method.

MÉXICO, D.F. A,

**MIGUEL AGUILAR ROMO
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS**