



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-AA-42-1987

CALIDAD DEL AGUA DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES (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.*

DIRECCION GENERAL DE NORMAS

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

SECRETARIA DE MARINA. Dirección General de Oceanografía Naval.

DEPARTAMENTO DEL DISTRITO FEDERAL Dirección General de Reordenación Urbana y Protección Ecológica. Laboratorio Central de Control.

UNIVERSIDAD NACIONAL 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.

CALIDAD DEL AGUA-DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES (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.

0 INTRODUCCION

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. 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 APLICACION

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 en un medio líquido en tubos múltiples y el cálculo de sus números más probables (NMP) en la muestra.

Este método es aplicable para 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 parte de una secuencia continua. El grado de confirmación con una muestra en particular depende parcialmente de la naturaleza del agua y parcialmente de las razones para realizar el examen.

En la práctica, la detección 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 compete con las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

- NMX-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.- Organismos capaces de crecimiento aeróbico ya sea $308 \pm 1k$ ($35 \pm 1^{\circ}C$) ó $310 \pm 1k$ ($37 \pm 1^{\circ}C$) en un medio de cultivo líquido lactosado con producción de aciso y gas dentro de un periodo de 48 h.

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

3.3 Escherichia coli presuntiva (E. coli).- Organismos coliformes termotolerantes como se describe en 3.2 que también producen Indol a partir de tripofano a 317k ($44^{\circ}C$).

4 PRINCIPIO

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 308 o 310k (35 o $37^{\circ}C$). Cada uno de los que muestran turbidez con producción de gas se resiembró en un medio confirmativo más selectivo y, cuando se busca E. coli presuntiva, en un medio en el que se pueda demostrar la producción de indel.

Se lleva acabo la incubación de estos medios confirmativos basta por 48 horas ya sea 308 ó 310k (35 o $37^{\circ}C$) para la detección de organismos coliformes y a 317k ($44^{\circ}C$) para organismos termotolerantes y E. coli.

Mediante tablas estadísticas se lleva acabo el calculo del numero más probable (NMP) de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y E. coli que pueda estar presente en 100 cm^3 de muestra, a partir de los números de los tubos que dan resultados confirmativos positivos.

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 Incubadora capaz de mantener una temperatura de $308 \pm 1\text{k}$ ($35 + 1^\circ\text{C}$) ó $310 \pm 1\text{k}$ ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) y $317 \pm 0.5\text{k}$ ($44 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

5.2 Estufa capaz de mantener una temperatura de 453 a 473k (180 a 200°C).

5.3 Autoclave u olla de presión o con manómetro.

5.4 Potenciometro.

5.5 Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g.

5.6 Pipetas serológicas.

5.7 Pipeteros de aluminio o acero inoxidable; se pueden sustituir con papel aluminio o papel Kraft.

5.8 Tubos de ensaye de cristal refractario de 15mm x 150 mm con tapón de baquelita, aluminio o algodón.

5.9 Frascos muestreadores, de vidrio resistente o cristal refractario de 125 cm³, con tapón de cristal esmerilado.

5.10 Tubos de fermentación (Durham).

5.11 Asas de inoculación.

5.12 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 prueba.

Para la preparación de los reactivos, las condiciones de esterilización deben ser 349k (121°C) y 0.098066 Mpa (1 kg/cm²) de presión manométrica durante 15 minutos. Los tubos de fermentación (Durham) no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

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

6.1. Utilizar uno de los siguientes medios de cultivo:

6.1.1. Caldo lauril triptosa (CLT).

Medio de doble concentración:

Triptosa	40.0g
Lactosa	10.0g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	5.5g
Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄)	5.5g
Lauril sulfato de sodio	0.2g
Agua para llevar a	1000cm ³

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 mezclando suavemente para evitar la formación de espuma. Ajustar a pH 6.8. Preparar 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 53cm³ y el medio de doble concentración en volúmenes de 10 y 50 cm³. Cada tubo o matraz deben contener un tubo de fermentación invertido (Durham). Colocar en autoclave a 388k (115°C) durante 10 min.

6.1.2. Caldo Mc Conkey.

Medio doble de concentración:

Sales biliares	10.0g
Peptona	40.0g
Lactosa	20.0g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0g
Púrpura de bromocresol (1% v/v en solución Etanólica)	2cm ³
Agua para llevar a	1000cm ³

Disolver, calentando, la peptona, el cloruro de sodio y las sales biliares en agua y almacenarlo a 277k (4°C) durante toda la noche. Filtrar mientras esta aun frío añadir la lactosa y disolver. Ajustar a pH 7.4 y añadir la púrpura de bromocresol.

Preparar el medio de simple concentración disolviendo el de doble concentración con un volumen igual de agua o prepararlo usando la mitad de concentración de los ingredientes.

Distribuir el medio de simple concentración en volúmenes de 5 cm³ y la doble concentración en volúmenes de 10 y 50 cm³ en tubos o matraces conteniendo un tubo de fermentación invertido (Durham).

Colocar en autoclave a 388k (115°C) durante 10 min.

6.1.3.Caldo lactosa.

Medio de doble concentración:

Peptona	10.0g
Lactosa	10.0g
Extracto de carne	6.0g
Agua para llevar a	1000cm ³

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 5cm³ y la doble concentración en volúmenes de 10 y 50 cm³, Cada tubo o matraz debe contener un tubo de fermentación invertido (Durham). Esterilizar en autoclave a 394 ± 1k (121 ± 1°C) durante 15 min.

Estos tres medios son de uso común en numerosos países la selectividad del Mc Conkey y del CLT depende respectivamente de la presencia de salas biliares y del agente de superficie activo, el laurilsulfato. El caldo lactosa no es un medio selectivo.

6.2 Utilizar uno o más de los siguientes medios confirmativos:

6.2.1 Medios para la producción de gas:

6.2.1.1 caldo bilis lactosa verde brillante:

Peptona	10.0g
Lactosa	10.0g
Bilis de buey (deshidratada)	20.0g
Verde brillante (1% m/m en solución acuosa)	13cm ³
Agua para llevar a	1000cm ³

Disolver la peptona en 500 cm³ de agua. Añadir los 20g de bilis de buey deshidratada disueltos en 200cm³ de agua; La solución debe tener un pH entre 7.0 y 7.5 Disolver con agua hasta un volumen aproximado de 975 cm³. Añadir la lactosa y ajustar el pH a 7.4. Añadir la solución verde brillante y aforar a 1000 cm³ con agua.

Distribuir volúmenes de 5cm³ en tubos de ensaye conteniendo tubos de fermentación invertidos (Durham) y colocar en autoclave a 388k (115°C) durante 10 min.

Nota 1. - Este medio no da resultados reproducibles en todos los casos y se recomienda comprobar sus propiedades inhibitorias antes de usarlo.

6.2.1.2 Medio EC:

Triptosa o tripticasa	20.0g
Lactosa	5.0g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄)	4.0g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	1.5g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0g
Agua para llevar a	1000cm ³

Disolver los componentes por separado y agregarles agitando suavemente. El pH debe ser de 6.9 después de la esterilización. Antes de esterilizar, distribuir en tubos de fermentación con suficiente medio para que el tubo invertido quede cubierto cuando menos parcialmente Después de la esterilización.

Como medio confirmativo para coliformes totales, el más generalizado es el caldo de bilis lactosa verde brillante (BLVB). Para confirmar la presencia de coliformes fecales se utilizan tanto el BLVB como el caldo EC.

6.2.2. Medio para la producción de indol:

6.2.2.1. Agua de triptona:

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

Disolver los componentes en agua y ajustar a pH. 7.5 distribuir en volúmenes de 5cm³ y colocar en autoclave a 308K (115°C) durante 10 min.

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

6.3.Reactivo de Kovacs para indol:

1,4 dimetilaminobenzaldehído

(C ₆ H ₄ [H(CH ₃) ₂]CHO)	5.0g
Alcohol amílico (CH ₃ (CH ₂) ₄ CH) libre de bases orgánicas	75cm ³
Acido clorhídrico concentrado(HCL)	85cm ³

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

NOTA 3. - El reactivo debe tener la coloración entre amarillo claro; algunas muestras de alcohol amílico son insatisfactorias y dan una coloración oscura con el aldehído.

6.4 Reactivo de oxidasa para la prueba de oxidasa:

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina	0.1g
	10cm ³

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

6.5.1 Diluyentes:

6.5.1 Diluyente de peptona (0.1%)

Peptona	
Agua para llevar a	

Disolver la peptona en aproximadamente 950cm³ de agua. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1mol/L ó ácido clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización sea de 7.0±0.1. Llevar a 1000cm³ con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 394± 1K (121±1°C)

6.5.2 Solución salina de peptona:

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

Disolver los componentes hirviéndolos en aproximadamente 950cm³ de agua. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1mol/L o ácido clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización sea de 7.0±0.1. Llevar a 1000cm³ con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 394±1K (121±1°C) durante 15 min.

6.5.3 Solución de Ringer:

Cloruro de sodio (NaCL)	2.25g
Cloruro de potasio (KCL)	0.105g

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

Disolver los componentes y dividirlos en volúmenes convenientes.
Esterilizar en autoclave a 394K (181°C) durante 15min.

6.5.4 Solución amortiguadora de fosfato:

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

6.5.4.1 Solución de fosfato.

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

6.5.4.2 Solución de cloruro de magnesio.

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

Para usarla, añadir 1.25cm³ de solución de fosfato (6.5.4.1) y 5.0cm³ de solución de cloruro de magnesio (6.5.4.2) a 1000cm³ de agua. Distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 394±1K (121±1°C) durante 15 min.

7 MUESTREO

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

Las muestras para el análisis bacteriológico, se deben tomar en frascos muostreadores que se hayan lavado con extremo cuidado y esterilizado. En su interior colocar previo a la esterilización, 0.1cm³ de solución de tiosulfato de sodio al 1% con el propósito de inhibirla acción del cloro que puede contener la muestra, cubriendo además el tapón del frasco hasta el cuello con papel aluminio.

7.1.1 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 el 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.

Al muestrear, 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 de aproximadamente 100cm³. Es importante que todas las muestra 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 cm³ 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 anunciadas; 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 esta dotado de bomba mecánica, tomar la muestra en una llave previamente flameada de la descarga, dejando que fluya el agua libremente 5min. antes de tomar la muestra.

7.2.3 A efectuar este muestreo, se deben flamear los bordes del frasco y tapón durante el tiempo que dura el muestreo. Esto se hace con objeto de mantener el 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 notas 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 del muestreo, 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 horas para agua potable y de 6 horas para otros tipos de agua para que sea válido el resultado del análisis. Durante el período que transcurra del muestreo al análisis, se debe conservar la muestra a 277K(4°C), con objeto de inhibir la actividad bacteriana para no obtener resultados falsos o dudosos.

9. PROCEDIMIENTO

9.1 Pruebas presuntivas.

9.1.1 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 las diluciones necesarias en esta etapa.

Utilizar series que constan de por lo menos tres diluciones: 10.0cm^3 , 1.0cm^3 y 0.1cm^3 ó bien 1.0cm^3 , y 0.01cm^3 .

Por cada dilución debe haber 3 ó 5 tubos.

Para diluciones a 10 veces, poner $90 \text{ ó } 9 \text{ cm}^3$ del diluyente en matraces o tubos de dilución esterilizados. Alternativamente, usar volúmenes de diluyente preesterilizado en botellas de tapón de rosca. Hacer una o más diluciones a 10 veces transfiriendo un volumen de la muestra de agua a 9 volúmenes de 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 5cm³.

9.1.2 Incubación de los tubos.

Incubar los tubos inoculados ya sea a 308± 1K (35± 1°C) o 340± 1K(37±1°C) durante 48 horas.

9.1.3 Examen de los tubos

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

9.2 Pruebas confirmativas.

9.2.1 Inoculación del medio.

Resembrar a partir de cada tubo de medio de aislamiento que muestro 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 más inhibitorio de caldo lactosa para aislar, resembrar en alguno de los dos medios confirmativos más selectivos, Caldo de Bilis Lactosa Verde Brillante o Caldo EC para efectuar la confirmación.

9.2.2 Incubación y examen.

Para confirmar la presencia de organismos coliformes, incubar un tubo de 9.2.1 de Caldo Lactosa Verde Brillante o Caldo EC a 310K(37°C) y examinarlo para ver si hay producción de gas dentro de un período de 48 horas.

Para confirmar la presencia de organismos coliformes termotolerantes, incubar otro tubo de 9.2.1 de Caldo Bilis Lactosa Verde Brillante o Caldo EC a 317K (44°C) durante 24 horas para ver si hay producción de gas.

Para confirmar la presencia de E. coli. Presuntiva, incubar un tubo de 9.2.1 de agua de triptona para detectar la formación de indol a 317L(44°C) durante 24 horas. Después añadir de 0.2 a 0.3 cm³ de reactivo de Kovacs (6.3) el tubo de agua de triptona; El desarrollo de un anillo de color rojo después de agitar suavemente de note 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.

9.3 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 310K (37°C). Por consiguiente dan resultados negativos a 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 303 a 308K (30 a 35°C), pero a pesar de ello son capaces de producir ácido y gas a partir de lactosa a 310K(37°C). Tienen poco significado para efectos sanitarios y se distinguen del grupo de los coliformes por una reacción de oxidasa positiva.

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

-Colocar de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa recientemente preparado (6.4) en un papel filtro en una caja de Petri.

-Con una barra de vidrio o un asa de alambre de platino (no de nicromel), colocar parte del cultivo en el papel filtro preparado.

-Considerar la aparición de un color azul marino purpúreo 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 cm³ de la muestra.

10 CALCULOS

A partir del número de tubos que dan reacciones positivas en los medios de aislamiento y confirmativo, calcular por referencia a las tablas estadísticas (ver tabla) el número más probable de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *E. coli* presuntiva en 100 cm³ de la muestra. Cuando se emplean de dilución para hacerlo equivalente.

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

$$Nmp/100cm^3 = \frac{\text{No. de tubos positivos} \times 100}{\text{cm}^3 \text{ de muestra en tubos negativos}}$$

$$\sqrt{\frac{\text{cm}^3 \text{ de muestra en tubos negativos}}{\text{cm}^3 \text{ de muestra en todos los tubos.}}}$$

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 cm³ en cada uno, 5 con porciones de 1cm³ y con 5 porciones de 0.1 cm³.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100cm ³	Límite confiable de 95%		No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP POR 100cm ³	Límite confiable de 95%	
5tubos con 10cm	5tubos con 1cm ³	5tubos con 0.1cm ³		Interior	Superior	5tubos con 10cm ³	5tubos con 1cm ³	5tubos con 0.1cm ³		Interior	Superior
0	0	0	<2								
0	0	1	2	<0.5	7	4	2	1	26	9	78
0	1	0	2	<0.5	7	4	3	0	27	9	80
0	2	0	4	<0.5	11	4	3	1	33	11	93
						4	4	0	34	12	93
1	0	0	2	<0.5	7						
1	0	1	4	<0.5	11	5	0	0	23	7	70
1	1	0	4	<0.5	11	5	0	1	31	11	89
1	1	1	6	<0.5	15	5	0	2	43	15	110
12	2	0	6	<0.5	15	5	1	0	33	11	93
						5	1	1	46	16	120
2	0	0	5	<0.5	13	5	1	2	63	21	150
2	0	1	7	1	17						
2	1	0	7	1	17	5	2	0	49	17	130
2	1	1	9	2	21	5	2	1	70	23	170
2	2	0	9	2	21	5	2	2	94	28	220
2	3	0	12	3	28	5	3	0	79	25	190
						5	3	1	110	31	250
3	0	0	8	1	19	5	3	2	140	37	340
3	0	1	11	2	25						
3	1	0	11	2	25	5	3	3	180	44	500
3	1	1	14	4	34	5	4	0	130	35	300
3	2	0	14	4	34	5	4	1	170	43	490
3	2	1	17	5	46	5	4	2	220	57	700
3	3	0	17	5	46	5	4	3	280	90	850

							5	4	4	350	120	1,000
4	0	0	13	3	31		5	5	0	240	68	750
4	0	1	17	5	46		5	5	1	350	120	1,000
4	1	0	17	5	46		5	5	2	540	180	1,400
4	1	1	21	7	63		5	5	3	920	300	3,200
4	1	2	26	9	78		5	5	4	1600	640	5,800
4	0	0	22	7	67		5	5	5	=<2400		

TABLA 2

Indice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 1 tubo con porciones de 50 cm³ 5 tubos con porciones de 10 cm³ y 5 tubos con porciones de 10cm³

No. de tubos con reacciones positivas			Indice del NMP por 100cm ³	Límite confiable de 95%		No. de tubos con reacciones positivas			Indice del NMP por 100cm ³	Límite confiable de 95%	
1 tubo con 50cm ³	5 tubos con 10cm ³	5 tubos con 1cm ³		Interior	Superior	1 tubo con 50cm ³	5 tubos con 10cm ³	5 tubos con 1cm ³		Interior	Superior
0	0	0	<1								
0	0	1	1	<0.5	4	1	2	1	7	1	17
0	0	2	2	<0.5	6	1	2	2	10	3	23
0	1	0	1	<0.5	4	1	2	3	12	3	28
0	1	1	2	<0.5	6	1	3	0	8	2	19
0	1	2	3	<0.5	8	1	3	1	11	3	26
0	2	0	2	<0.5	6	1	3	2	14	4	34
0	2	1	3	<0.5	8	1	3	3	18	5	53
0	2	2	4	<0.5	11	1	3	4	21	6	66
0	3	0	3	<0.5	8	1	4	0	13	4	31
0	3	1	5	<0.5	13	1	4	1	17	5	47
0	4	0	5	<0.5	13						
						1	4	2	22	7	69
1	0	0	1	<0.5	4	1	4	3	28	9	85
1	0	1	3	<0.5	8	1	4	4	35	12	100
1	0	2	4	<0.5	11	1	4	5	43	15	120
1	0	3	6	<0.5	15	1	5	0	24	8	75
1	1	0	3	<0.5	8						
						1	5	1	35	12	100
1	1	5	5	<0.5	13	1	5	2	54	18	140

1	1	7	7	1	17		1	5	3	92	27	220
1	1	9	9	2	21		1	5	4	160	39	450
1	2	5	5	<0.5	13		1	5	5	=>240		

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 cm³, 5 tubos con porciones de 10 cm³ y 5 tubos con porciones de 1 cm³.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP Por 100cm ³	Límite confiable de 95%		No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100cm ³	Límite confiable de 95%	
5tubos con 50 cm	5tubos con 10cm	5tubos con 1cm ³		Inferior	Superior	5tubos con 50cm ³	5tubos con 10cm ³	5tubos con 1cm ³		Inferior	Superior
0	0	0	<1								
0	0	1	1	<0.5	2	4	1	1	4	1	9
0	1	0	1	<0.5	2	4	1	2	4	1	9
0	1	1	1	<0.5	2	4	2	0	4	1	9
0	2	0	1	<0.5	2	4	2	1	4	1	9
0	3	0	1	<0.5	2	4	2	2	5	2	12
						4	3	0	5	2	12
1	0	0	1	<0.5	2						
1	0	1	1	<0.5	2	4	3	1	5	2	12
1	1	0	1	<0.5	2	4	3	2	6	2	14
1	1	1	1	<0.5	2	4	4	0	6	2	14
1	2	0	1	<0.5	2	4	4	1	7	3	17
1	2	1	2	<0.5	4	4	4	0	7	3	17
1	3	0	2	<0.5	4	4	5	1	8	3	19
2	0	0	1	<0.5	2	5	0	0	4	1	9
2	0	1	1	<0.5	2	5	0	1	4	1	9
2	1	0	1	<0.5	2	5	0	2	6	2	14
2	1	1	2	<0.5	4	5	1	0	5	2	12
2	2	0	2	<0.5	4	5	1	1	6	2	14
2	2	1	2	<0.5	4						
						5	1	2	7	3	17
2	3	0	2	<0.5	4	5	2	0	6	2	14
2	3	1	3	1	7	5	2	1	8	3	19
2	4	0	3	1	7	5	2	2	10	4	23
						5	2	3	12	4	28
3	0	0	2	<0.5	4						
3	0	1	2	<0.5	4	5	3	0	9	3	21
3	1	0	2	<0.5	4	5	3	1	11	4	26
3	1	1	2	<0.5	4	5	3	2	14	5	34
3	1	2	3	1	7	5	3	3	18	6	53

3	2	0	3	1	7		5	4	0	13	6	31
3	2	1	3	1	7		5	4	1	17	6	47
3	2	2	4	1	9		5	4	2	22	7	70
3	3	0	3	1	7		5	4	3	28	9	85
3	3	1	4	1	9		5	4	4	35	11	100
3	4	0	4	1	9		5	5	0	24	8	75
3	4	1	4	1	9							
							5	5	1	35	11	100
4	0	0	2	<0.5	4		5	5	2	54	18	140
4	0	1	3	1	7		5	5	3	92	27	220
4	0	2	3	1	7		5	5	4	160	39	420
4	1	0	3	1	7		5	5	5	=>240		

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 1 cm³ y 3 con porciones de 0.1 cm³.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice Del NMP. Por cm ³	Límite Confiable de 95%	
3 tubos con cm ³	3 tubos con 1cm ³	3 tubos con 0.1 cm ³		Interior	Superior

0	0	0	<3	<0.5	
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3		13
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	280
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800
3	3	3	=> 2,400		

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 medio de cultivo empleados.
- c. El tiempo, temperatura y condiciones de la incubación.
- d. Los resultados expresados conforme a lo que se describe en el punto 10

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

11 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 “número más probable” (NMP), pero debe entenderse que este método no es exacto ya que sólo nos da la probable densidad de bacterias coliformes totales o fecales de una muestra determinada.

La confiabilidad está dada por los niveles superiores o inferiores del límite de confianza al 95% establecidos en las tablas para cada NMP/100 cm³, no obstante, es una indicación importante para evaluar la calidad sanitaria del agua.

12 BIBLIOGRAFIA

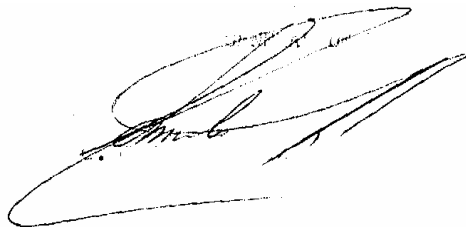
STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER.

15th edition.
Paginas 794-805.
1980.

14 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma concuerda parcialmente con el anteproyecto de 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 3 Junio de 1987
LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS



LIC. CONSUELO SAEZ PUEYO

