
NORMA CUBANA

NC

1095: 2015

**MICROBIOLOGÍA DEL AGUA — DETECCIÓN Y
ENUMERACIÓN DE COLIFORMES — TÉCNICA DEL NÚMERO
MÁS PROBABLE (NMP)**

**Water microbiology — Detection and enumeration of coliforms — Most Probable
Number Method (NMP)**

ICS: 07.100.20

**1. Edición Junio 2015
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA**

**Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261, El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 7830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu**



Cuban National Bureau of Standards

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Órgano Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 61 de Microbiología de los Alimentos integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Dirección Nacional de Salud Ambiental -Ministerio de Salud Pública (DNSA-MINSAP)
 - Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM-MINSAP)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (CNHA-IMV-MINAG)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio de Cubacontrol S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-IFAL-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE- MINSAP)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA-MES)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MINAL)
 - Laboratorio Central de Calidad (CIDCI. MINCIN)
 - ALIMPORT (MINCEX)
 - Escuela de Hotelería y Turismo (MINTUR)
 - Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
 - Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN-CITMA)
 - Empresa Nacional de Análisis y Servicios Técnicos (ENAS)
- Se basa en los documentos: *American PublicHealthAssociation. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. Washington, DC: APHA, AWWA, WEF; 2005, International Standard. Water quality. General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture, ISO 8199 Switzerland, 2005, U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2011. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. Washington (EE UU); 2011 y en World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. 4 ed. Ginebra: WHO; 2011 y otros citados en la bibliografía de la misma.*
- Sustituye la NC 93-01-128: 1988 Sistema de Normas Protección del Medio Ambiente. Hidrosfera. Determinación del número más probable de coliformes totales y fecales.

© NC, 2015

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

0 INTRODUCCIÓN	4
1 ALCANCE Y APLICACIÓN.....	5
2 REFERENCIAS NORMATIVAS	5
3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES	5
5 MEDIOS DE CULTIVO Y DILUENTES.....	6
6 APARATOS Y CRISTALERÍA	10
7 MUESTREO	11
8 PROCEDIMIENTO.....	11
9 PRUEBAS DE CONTROL PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL PROCEDIMIENTO.....	14
10 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	14
ANEXO A.1	16
ANEXO A.2	17
ANEXO A.3	18
ANEXO A.4	19
ANEXO A.5	20
ANEXO A.6	21
BIBLIOGRAFÍA	23

0 Introducción

0.1 La presencia y extensión de la contaminación fecal es un factor importante en la evaluación de la calidad de un cuerpo de agua y el riesgo de infección para la salud humana. El examen de muestras de agua para la presencia de coliformes, si bien es difícil de interpretar porque algunas de estas bacterias viven en el suelo y en el agua superficial y no siempre tienen un origen intestinal, puede indicar fracaso en el tratamiento o en la distribución del agua potable.

0.2 El método del NMP se utiliza para enumerar microorganismos que son difíciles de cultivar en medio sólido y que pueden estar presentes en un reducido número en la muestra a analizar. El principio general de estas técnicas consiste en la inoculación de un volumen conocido de una porción de ensayo de la muestra en una serie de tubos conteniendo una cantidad determinada de medio de cultivo líquido. La precisión del Número Más Probable (NMP) aumenta con el número de tubos que se usan, aunque cinco tubos por dilución se consideran como una relación apropiada entre la precisión y la economía. Se asume que, después de una adecuada incubación, cada microorganismo presente se multiplicará, produciendo cambios en las propiedades observables del medio líquido.

MICROBIOLOGÍA DEL AGUA — DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE COLIFORMES — TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

1 Alcance y aplicación

Este método es adecuado para el examen de agua potable, que incluye todas las muestras de agua tratadas de la red de distribución, depósitos de agua y sistemas especiales. También se emplea para aguas residuales y superficiales y es recomendado para aguas que presentan turbidez. Es un estimado del número de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes en las muestras de agua analizadas.

1.1 Sumario del método

El número de bacterias viables de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes presentes en el agua y capaces de reproducirse, se determina cultivando una cantidad conocida de la muestra de agua en una serie de tubos conteniendo un medio de cultivo líquido, en una primera fase denominada prueba presuntiva (caldo lactosado o caldo lauriltriptosa), seguida de una segunda fase o prueba confirmativa (caldo bilis verde brillante lactosa para coliformes totales y caldo EC para coliformes termotolerantes). El número de organismos se expresa como Número Más Probable por 100 mL de muestra (NMP/100 mL) acorde a las alícuotas inoculadas de la muestra y se determina mediante las Tablas de NMP dispuestas en los anexos.

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas, sólo es aplicable la edición citada. Para las referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento de referencia incluyendo cualquier enmienda.

-NC-ISO 11133-1: 2012, *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías en la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 1: Guías generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.*

-NC-ISO 11133-2: 2013, *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías en la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 2: Guías prácticas en la comprobación del rendimiento de los medios de cultivo.*

--NC-ISO 7218: 2013, *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Requerimientos generales y guía para exámenes microbiológicos.*

3 Términos y definiciones

Para el propósito de esta norma se aplican los siguientes términos y definiciones:

3.1

organismos coliformes

bacterias que a 35-37°C, fermentan la lactosa con producción de gas bajo las condiciones especificadas

3.2

coliformes termotolerantes

bacterias que a la temperatura especificada (44,5 °C ± 0,5 °C) fermentan la lactosa con producción de gas a las 48 h, bajo las condiciones de ensayo especificadas

3.3**enumeración de coliformes**

determinación del **Número Más Probable** (NMP) de organismos coliformes (3.1) o de organismos coliformes termotolerantes (3.2) por cada 100 mililitros de la muestra de ensayo, cuando los estudios se llevan a cabo de acuerdo con el método especificado

4 Principio

4.1. El método se basa en la inoculación de porciones de la muestra y diluciones en una serie de tubos de un medio de cultivo líquido que contiene lactosa (prueba presuntiva). Los tubos se examinan a las 24 y 48 horas de incubación a $35-37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y los que muestran turbidez con producción de gas se inoculan en un medio selectivo (prueba confirmativa) por 48 horas a $35-37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ para coliformes totales o 24 horas a $44-44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ para coliformes termotolerantes. El cálculo del Número Más Probable (NMP) de organismos se realiza por tablas estadísticas de probabilidad en 100mL de la muestra a partir de los resultados de las positivities de los tubos en la prueba confirmativa.

5 Medios de cultivo y diluentes**5.1 Materiales básicos**

Use componentes de calidad uniforme e ingredientes químicos de grado analítico para la preparación de los medios de cultivo y reactivos.

Para la elaboración de los medios utilice agua destilada o desionizada, libres de sustancias que puedan inhibir el crecimiento bacteriano bajo las condiciones en que se efectúa este ensayo.

5.2 Generalidades

Ver NC-ISO 7218, NC-ISO 11133-1 y NC-ISO 11133-2 para la preparación, producción y pruebas de rendimiento de los medios de cultivo.

5.2.1 Diluentes**5.2.2 Agua de dilución (solución Buffer)****5.2.2.1 Composición****Buffer fosfato**

Producto	Cantidad
Fosfato dihidrogenado de potasio(KH_2PO_4)	34.0 g
Agua destilada o desionizada	500 mL

Solución de cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Producto	Cantidad
Cloruro de magnesiohexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	81.1 g
Agua destilada o desionizada	1000 mL

5.2.2.2 Preparación

Disuelva 34g de fosfato dihidrogenado de potasio (KH_2PO_4) en 500 mL de agua destilada. Ajuste el pH a 7.2 ± 0.5 adicionando solución de hidróxido de sodio [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$]. Diluya con agua destilada hasta 1 L. Se descarta la solución si está turbia. De esta

solución de buffer fosfato se toma 1.25 mL y 5 mL de la solución de cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y se diluye hasta 1L con agua destilada. Distribuir en tubos las cantidades que permitan obtener 9 ± 0.2 mL, después la esterilización a 121°C por 15 min.

5.2.3 Agua de peptona

5.2.3.1 Composición

Producto	Cantidad
Digerido enzimático de peptona	1.0 g
Agua destilada o desionizada	1000 mL

5.2.3.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua. Caliente si es necesario para garantizar la completa disolución de los ingredientes. Ajuste el pH, si es preciso, adicionando solución de hidróxido de sodio [$c(\text{NaOH})=1$ mol/L] o ácido clorhídrico [$c(\text{HCl})=1$ mol/L] de forma tal que después de la esterilización 121°C por 15 min este se encuentre a 7.0 ± 0.5 a 25°C .

5.2.4 Agua de peptona salina

5.2.4.1 Composición

Producto	Cantidad
Digerido enzimático de peptona	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada o desionizada	1000 mL

5.2.4.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua. Caliente si es necesario para garantizar la completa disolución de los ingredientes. Ajuste el pH, si es preciso, adicionando solución de hidróxido de sodio [$c(\text{NaOH})=1$ mol/L] o ácido clorhídrico [$c(\text{HCl})=1$ mol/L] de forma tal que después de la esterilización a 121°C por 15 min éste se encuentre a 7.0 ± 0.5 a 25°C .

5.3 Medios de cultivo

Los medios distribuidos asépticamente pueden ser conservados, en refrigeración, a temperaturas de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ por un período de hasta un mes. Antes del uso, deben ser cuidadosamente revisados para descartar los que presenten contaminación, evaporación excesiva o cualquier otra evidencia de deterioro y mantenerse fuera de refrigeración el tiempo suficiente para que alcancen la temperatura ambiente. Si el almacenamiento de los medios ya preparados y distribuidos se realiza a temperatura ambiente, se recomienda no conservarlos por más de una semana. Utilice los medios de cultivo deshidratados de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

5.3.1 Caldo lactosado

5.3.1.1 Composición

Producto	Concentración simple	Concentración doble	Concentración triple
	Cantidad	Cantidad	Cantidad
Digerido enzimático de la caseína	5.0 g	10.0 g	15.0 g
Lactosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ .H ₂ O)	5.0 g	10.0 g	15.0 g
Agua destilada o desionizada	1000 mL	1000 mL	1000 mL

5.3.1.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua. Caliente si es necesario para garantizar la completa disolución de los ingredientes. Ajuste el pH, si es preciso, adicionando solución de hidróxido de sodio [c(NaOH)=1 mol/L] o ácido clorhídrico [c(HCl) =1 mol/L] de forma tal que después de la esterilización éste se encuentre a $7,2 \pm 0,2$ a 25°C. Distribuya el medio en cantidades de 10 mL en tubos de ensayo de aproximadamente 16 mm x 160 mm o de 20 mm x 200 mm, con tapa de rosca de baquelita u otro material inerte resistente al tratamiento térmico a que serán sometidos, que contengan los tubos de fermentación (tubos Durham). Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min, en un intervalo de tiempo no superior a las 2 horas posteriores a la disolución de los ingredientes. Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización y, al menos, una o dos terceras partes de su altura debe estar bajo el nivel del líquido contenido en el tubo.

5.3.2. Caldo lauriltriptosa

5.3.2.1 Composición

Producto	Concentración simple	Concentración doble	Concentración triple
	Cantidad	Cantidad	Cantidad
Triptosa	20g	40 g	60 g
Lactosa	5 g	10g	15 g
Fosfato dipotásico	2.75 g	5.5 g	8.25 g
Fosfato monopotásico	2.75 g	5.5 g	8.25 g
Cloruro de sodio	5 g	10g	15 g

Laurilsulfato de sodio	0.1 g	0.2 g	0.3 g
Agua destilada o desionizada	1000 mL	1000 mL	1000 mL

5.3.2.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua. Se puede adicionar 0.01 g/L de púrpura de bromocresol al medio, como una guía para determinar la producción de ácido y la confirmación de crecimiento (este paso es opcional). Caliente si es necesario para garantizar la completa disolución de los ingredientes. Ajuste el pH, si es preciso, adicionando solución de hidróxido de sodio [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$] o ácido clorhídrico [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$] de forma tal que después de la esterilización éste se encuentre a $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuya el medio en cantidades de 10 mL en tubos de ensayo de aproximadamente 16 mm x 160 mm, con tapa de rosca de baquelita u otro material inerte resistente al tratamiento térmico a que serán sometidos, que contengan los tubos de fermentación (tubos Durham). Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min, en un intervalo de tiempo no superior a las 2 horas posteriores a la disolución de los ingredientes. Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización y, al menos, una o dos terceras partes de su altura debe estar bajo el nivel del líquido contenido en el tubo.

5.3.3 Caldo lactosado con bilis y verde brillante

5.3.3.1 Composición

Producto	Cantidad
Digerido enzimático de caseína	10 g
Lactosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10 g
Bilis de buey deshidratada	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua destilada o desionizada	1000 mL

5.3.3.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua. Caliente si es necesario para garantizar la completa disolución de los ingredientes. Ajuste el pH, si es preciso, adicionando solución de hidróxido de sodio [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$] o ácido clorhídrico [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$] de forma tal que después de la esterilización este se encuentre a $7,2 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuya el medio en cantidades de 10 mL en tubos de ensayo de aproximadamente 16 mm x 160 mm, con tapa de rosca de baquelita u otro material inerte resistente al tratamiento térmico a que serán sometidos, que contengan los tubos de fermentación (tubos Durham). Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min, en un intervalo de tiempo no superior a las 2 horas posteriores a la disolución de los ingredientes. Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización y, al menos, una o dos terceras partes de su altura debe estar bajo el nivel del líquido contenido en el tubo.

5.3.4 Caldo EC

5.3.4.1 Composición

Producto	Cantidad
Triptosa o tripticasa	20.0 g
Lactosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ .H ₂ O)	10.0 g
Bilis de Buey deshidratada o sales biliares No. 3	1.5 g
Fosfato dipotásico hidrogenado (K ₂ HPO ₄)	4.0 g
Fosfato potásico dihidrogenado (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agua destilada o desionizada	1000 mL

5.3.4.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua. Caliente si es necesario para garantizar la completa disolución de los ingredientes. Ajuste el pH, si es preciso, adicionando solución de hidróxido de sodio [c(NaOH) =1 mol/L] o ácido clorhídrico [c(HCl) =1 mol/L] de forma tal que después de la esterilización este se encuentre a $6,9 \pm 0,2$ a 25°C. Distribuya el medio, en cantidades de 10 mL, en tubos de ensayo de aproximadamente 16 mm x 160 mm, con tapa de rosca de baquelita u otro material inerte resistente al tratamiento térmico a que serán sometidos, que contengan los tubos de fermentación (tubos Durham). Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min, en un intervalo de tiempo no superior a las 2 horas posteriores a la disolución de los ingredientes. Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización y, al menos, una o dos terceras partes de su altura debe estar bajo el nivel del líquido contenido en el tubo.

6 Aparatos y cristalería

Equipamiento usual del laboratorio de microbiología(ver NC-ISO 7218) y, en particular, los siguientes:

6.1 Aparato para esterilización seca (horno) o para esterilización húmeda (autoclave)

6.2 Incubadoras, capaces de operar a 37 °C ±1°C.

6.3 Baño de agua termostataado, con tapa, capaz de operar a 44-44.5°C ± 0.5 °C.

6.4 Asas, hechas de platino-iridio, o de níquel-cromo, aproximadamente de 3 mm de diámetro o asas desechables.

6.5 Tubos de ensayo, de aproximadamente 16 mm x 160 mm y 20 mm x 200 mm.

6.6 Tubos Durham, de tamaño adecuado para el uso en tubos de ensayo de dimensiones de

16 mm x 160 mm.

6.7 Pipetas de descarga total, con capacidades nominales de 1 mL de capacidad y aproximación de 0,01 mL y 10 mL de capacidad y aproximación de 0,1 mL.

6.8 Pipetas Eppendorf de volumen variable entre 1000 y 100 µL con puntas y contenedor autoclaveable.

6.9 pH metro, con precisión para ± 0.1 unidades de pH a 25°C.

6.10 Dispositivo para pipeteo automático.

6.11 Incinerador de asas. Numeración

6.12 Cuando no se suministren estériles, los aparatos y cristalería utilizados en este proceder deben ser esterilizados por uno de los siguientes métodos:

6.12.1 En un horno a 170 ± 10 °C por, al menos, una hora (excluyendo el tiempo de precalentamiento).

6.13.1 En autoclave a 121 ± 3 °C por, al menos, 15 min.

Estos procesos deben estar debidamente controlados según las normas de calidad establecidas para los mismos.

7 Muestreo

7.1 El muestreo debe llevarse a cabo de acuerdo con la norma nacional o internacional establecida para el agua en cuestión. Si no existe una norma o procedimiento, se recomienda que se realice el muestreo de acuerdo entre las partes.

7.2 Las muestras deben procesarse en las primeras 6 horas posteriores a su recolección. Se recomienda refrigeración entre 5 ± 3 °C.

7.3 Si las muestras han sido refrigeradas debe aguardarse, antes de proceder a comenzar el desarrollo de este procedimiento, a que las mismas adquieran la temperatura del cuarto de siembra con la finalidad de disminuir el stress térmico de la población bacteriana presumiblemente presente.

7.4 Cuando sean necesarias diluciones de la muestra original, éstas se realizarán en uno de los diluentes referidos en (5.2) empleando para ello 9.0 mL de diluyente y 1.0 mL de la muestra original. Se agitará suavemente para homogeneizar, rotando el frasco en uno y otro sentido, evitando la formación de espuma. A partir de esta dilución, repitiendo el procedimiento descrito, se podrán realizar tantas diluciones decimales como sean necesarias según el tipo de agua a analizar. De forma general no se recomiendan diluciones superiores a 10^{-6} .

8 Procedimiento

8.1 Agite las muestras antes de tomar las alícuotas para la inoculación de las series de tubos.

8.2 Inocule los tubos con pipetas estériles (6.7) de 10 mL ó 20,0 mL, para las porciones de 10 mL y 20 mL, y con pipetas estériles de 1 mL cuando se utilicen porciones de 1,0 y 0,1 mL. En estos dos últimos casos puede recomendarse el uso de pipetas Eppendorf (6.8) de 100 y 1000 μ L respectivamente, siempre que previamente se proceda a la esterilización de las puntas. Se debe tener especial precaución, en el momento de descargar el inóculo, de no introducir burbujas en el tubo de fermentación (tubo de Durham)(6.6).

8.3 Serie de cinco (5) tubos

Presenta dos variantes:

8.3.1 Inóculos de 10 mL de muestra

Consiste en la inoculación de 10 mL de inóculo en cada uno de cinco (5) tubos conteniendo 10 mL de caldo lactosado de doble concentración (5.3.1.) o de caldo laurilriptosa de doble concentración (5.3.2) en la prueba presuntiva.

8.3.1.2 Inóculos de 20 mL de muestra

Consiste en la inoculación de 20 mL de inóculo en cada uno de cinco (5) tubos conteniendo 10 mL de caldo lactosado tres veces concentrado (5.3.1) o de caldo laurilriptosa de triple concentración (5.3.2) en la prueba presuntiva. Se recomiendan para aguas tratadas, especialmente la variante que utiliza inóculos de 20,0 mL.

8.3.2 Serie de quince (15) o más tubos

Consiste en la inoculación, en la **prueba presuntiva**, de las alícuotas de muestra que se reflejan a continuación:

Volumen de muestra	Medio de cultivo (10 mL)	Número de tubos a inocular
10,0 mL	Caldo lactosado o laurilriptosa de doble concentración	5
1,0 mL	Caldo lactosado o laurilriptosa simple	5
0,1 mL	Caldo lactosado o laurilriptosa simple	5

8.4 El NMP consta de dos etapas:

8.4.1 Prueba presuntiva

8.4.1.1 Los tubos inoculados con la muestra que contienen caldo lactosado o caldo laurilriptosa son examinados después de 24 y 48 horas de incubación a $35 - 37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se considerará como positiva la presencia de cualquier cantidad de gas en el tubo de Durham. Los cultivos que no muestren gas en la lectura de 24 horas serán incubados 24 horas más, procediendo entonces a repetir la lectura.

8.4.1.2 Efectúe subcultivos de cada tubo que muestre turbidez con producción de gas en un medio más selectivo y confirmatorio(5.3.3 ó 5.3.4).

8.4.1.3 Registre, en la libreta de trabajo (ver Tablas 1 y 2 Propuestas de Protocolo de trabajo, Anexos A.2 y A.3) el número de tubos positivos en cada lectura. Los tubos positivos en

el caldo lactosado son solamente presuntivos a coliformes. Por tanto, es importante que se sometan a la prueba confirmativa todos los tubos positivos en la prueba presuntiva.

8.4.2 Prueba confirmativa

El medio confirmativo para la enumeración de organismos coliformes (caldo lactosado con bilis y verde brillante) se incuba hasta 48 horas a $35-37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, mientras que para los coliformes termotolerantes (caldo EC) la incubación es a $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (baño de agua termostataado) por 24 horas.

8.4.2.1 Prueba confirmativa para organismos coliformes

8.4.2.1.1 Agite levemente los tubos positivos o rótelos suavemente. Evite la película superficial, de estar presente, inclinando el tubo ligeramente. Con un asa de platino-iridio, o de níquel-cromo de 3.0 – 3.5 mm de diámetro (6.4), previamente esterilizada al calor bajo la llama de un mechero, inocule un tubo de caldo lactosado con bilis y verde brillante (CBVB) de cada tubo positivo resultante de la prueba presuntiva.

8.4.2.1.2 Incube a $35-37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y examine la producción de gas dentro de un período de 48 horas. Se considera positiva la presencia de turbidez y cualquier cantidad de gas en el tubo de Durham.

8.4.2.1.3 Registre, en la libreta de trabajo (Tablas 1 y 2, según corresponda, Anexos A.2 y A.3), el número de tubos positivos en la prueba confirmativa para la determinación del NMP de organismos coliformes.

8.4.2.2 Prueba confirmativa para coliformes termotolerantes

8.4.2.2.1 Encienda el baño de agua termostataado y asegúrese que alcance la temperatura apropiada ($44-44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ según el método).

8.4.2.2.2 Agite levemente los tubos positivos o rótelos suavemente. Evite la película superficial, de estar presente, inclinando el tubo ligeramente. Transfiera una porción del cultivo, utilizando un asa de platino-iridio, o de níquel-cromo de 3,0 – 3,5 mm de diámetro (6.4), previamente esterilizada al calor bajo la llama de un mechero, a un tubo de caldo EC de cada tubo positivo en la prueba presuntiva.

8.4.2.2.3 Una vez efectuada la inoculación, el tubo de cultivo debe colocarse en el baño de agua termostataado ($44-44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) dentro de los primeros 30 minutos posteriores a esta acción, para evitar la aparición de falsos positivos.

8.4.2.2.4 Incube a $44-44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y examine la producción de gas dentro de un período de 24 horas. Se considera positiva la presencia de cualquier cantidad de gas en el tubo de Durham.

8.4.2.2.5 Registre, en la libreta de trabajo (Tablas 1 y 2, según corresponda, Anexos A.2 y A.3), el número de tubos positivos en la Prueba Confirmativa para la determinación del NMP de organismos coliformes termotolerantes.

9 Pruebas de control para el aseguramiento de la calidad del procedimiento

9.1 Utilice controles de *Escherichiacoli* y *Enterobacteraerogenes* y verifique que se cumpla lo planteado en la tabla siguiente:

Medio de cultivo ⇒	Caldo BVB	Caldo EC
Temperatura de incubación ⇒	35-37±0.5°C	44-44.5°C ± 0.5°C
Microorganismo ↓	Producción de gas ↓	Producción de gas ↓
<i>Enterobacteraerogenes</i>	+	-
<i>Escherichiacoli</i>	+	+

Antes del análisis de cualquier muestra, el baño de agua termostatado debe ser previamente calibrado utilizando estos controles. Este proceder se repetirá cada vez que se ejecute una determinación, incubándose los controles conjuntamente con los cultivos correspondientes a las pruebas confirmatorias.

9.2 Reporte los resultados obtenidos en el control de calidad interno en la libreta de trabajo del laboratorio.

10 Interpretación de los resultados

10.1 El cálculo el Número Más Probable (NMP) de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes presentes en 100 mL de la muestra, se realiza por medio de lastablas estadísticas 3, 4 y 5 (Anexas A.4, A.5y A.6) según el número de tubos con resultados positivos en las correspondientes pruebas confirmativas.

10.2 Cuando se utilicen series de 5 tubos con 10,0 mL de inóculo (8.3.1.1) el cálculo del NMP de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes presentes en 100 mL de la muestra se realizará utilizando la tabla 3 (Anexo A.4).

10.3 Cuando se usen series de 5 tubos utilizando 20 mL de inóculo (8.3.1.2) el cálculo del NMP de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes presentes en 100 mL de la muestra se realizará utilizando la tabla 4 (Anexo A.5).

10.4 Cuando se empleen series de 15 tubos (8.3.2), utilizando como inóculo alícuotas de la muestra sin diluir, el cálculo del NMP de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes presentes en 100 mL de la muestra se efectuará utilizando la tabla 5 (Anexo A.6).

10.5 Cuando se utilicen series de más de 15 tubos, empleando como inóculo alícuotas de diferentes diluciones de la muestra a analizar, el cálculo del NMP de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes presentes en 100 mL de la muestra se efectuará utilizando la tabla 5 (Anexo A.6)de acuerdo con las siguientes especificaciones:

10.5.1 Para seleccionar las series de tres diluciones a utilizar en la determinación del NMP escoja la mayor dilución que muestre resultados positivos en las cinco porciones inoculadas (sin que exista una dilución menor que presente alguna porción negativa) y las dos siguientes diluciones más altas (ejemplo a). Use los resultados de estas tres series de cinco porciones elegidas para efectuar el cálculo, multiplicando el resultado que aparece en la

tabla 5 (Anexo A.6) por el inverso del factor de dilución de las porciones correspondientes a la posición central de la serie.

Ejemplo	10,0 mL	1,0 mL	0,1 mL	0,01 mL	0,001 mL	Series positivas seleccionadas			NMP/100 mL
a	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5	2	0	49 x 10 = 490
b	4/5	5/5	1/5	0/5	0/5	4	5	1	48
c	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0	0	1	1,8

Nota: El numerador representa el número de tubos positivos, mientras que el denominador informa sobre el total de cultivos inoculados en esa serie.

10.5.2 Si la menor dilución ensayada muestra un número inferior a cinco porciones positivas, seleccione ésta y las dos siguientes diluciones más altas (ejemplos b y c).

10.5.3 En el caso de que aparezca un resultado positivo en una dilución mayor siguiente a las tres escogidas de acuerdo a las reglas aplicadas en el epígrafe 10.6, cambie la selección hacia la menor dilución que muestre menos de cinco porciones positivas y las dos más altas siguientes (ejemplo d).

Ejemplo	10,0 mL	1,0 mL	0,1 mL	0,01 mL	0,001 mL	Series positivas seleccionadas			NMP/100 mL
d	5/5	4/5	4/5	1/5	0/5	4	4	1	40 x 10 = 400
e	5/5	4/5	4/5	0/5	1/5	4	4	1	40 x 10 = 400
f	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5	5	2	540 x 100 = 54 000

10.5.4 Si aparecen tubos positivos en diluciones más altas y no consecutivas a la última porción elegida, incorpore este número de tubos positivos a los de la última serie seleccionada, y efectúe entonces el cálculo, tal y como se describe en el inciso 10.8 (ejemplo e).

10.5.5 Cuando no se utilicen suficientes inóculos con diluciones más elevadas para poder efectuar la selección y los cálculos según los criterios precedentes, escoja las tres diluciones consecutivas menores tal y como se muestra en el inciso 10.8 (ejemplo f).

10.6 De no aparecer en las tablas la combinación de tubos adecuada, emplee para los cálculos la siguiente ecuación:

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

ANEXO A.1

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO (SERIE DE 15 TUBOS)

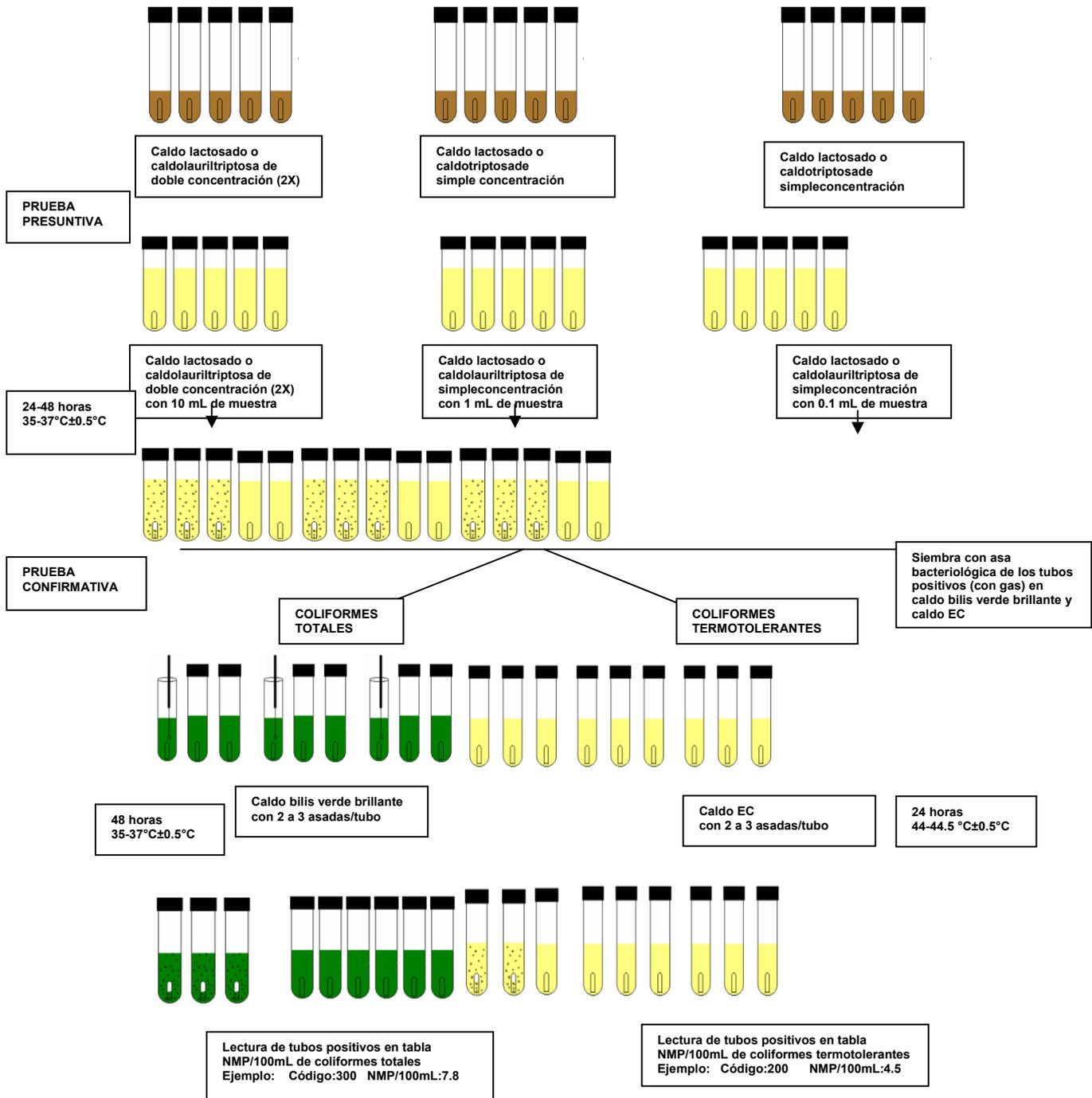


Figura A.1. Método de detección

ANEXO A.4

Tabla 3. Valores del NMP por 100 mL de muestra y límites de confianza del 95 %, cuando son utilizadas series de cinco porciones de 10,0 mL

Número de tubos con resultados positivos en la prueba confirmativa	NMP (por 100 mL)	Límites de confianza (95 %)	
		Inferior	Superior
0	< 2,2	0,0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,0
5	>16,0	8,0	Infinito

ANEXO A.5

Tabla 4. Valores del NMP por 100 mL de muestra y límites de confianza del 95 %, cuando son utilizadas series de cinco porciones de 20,0 mL

Número de tubos con resultados positivos en la prueba confirmativa	NMP (por 100 mL)	Límites de confianza (95 %)	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	0,0	3,5
1	1,1	0,051	5,4
2	2,6	0,400	8,4
3	4,6	1,0	13,0
4	8,0	2,1	23,0
5	>8,0	3,4	Infinito

ANEXO A.6

Tabla 5. Valores del NMP por 100 mL de muestra y límites de confianza del 95 %, cuando son utilizadas series de cinco porciones de 10,0 mL, cinco porciones de 1,0 mL y cinco porciones de 0,1 mL

Combinación de positivos	Índice de NMP/100 mL	Límite de confianza		Combinación de positivos	Índice de NMP/100m L	Límite de confianza	
		Bajo	Alto			Bajo	Alto
0-0-0	<1.8	-	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.090	6.8	4-1-0	17	6.0	40
0-1-0	1.8	0.090	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.70	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	50
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	70
1-0-0	2.0	0.10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4.0	0.70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6.0	1.8	15	4-3-0	27	9.9	70
1-1-0	4.0	0.71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8.1	3.4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8.3	3.4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3.5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	10	3.5	22	5-0-0	23	6.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6.8	1.8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4.1	26	5-1-2	63	22	150

2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4.1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3.5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6.0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6.8	40	5-5-1	350	100	1100
3-4-1	24	9.8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1600	700	-
4-0-2	21	6.8	40				

Bibliografía

[1] American Public Health Association. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20 ed. Washington, DC: APHA, AWWA, WEF; 1998.

[2] World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. 3ed. Ginebra: WHO; 2004.