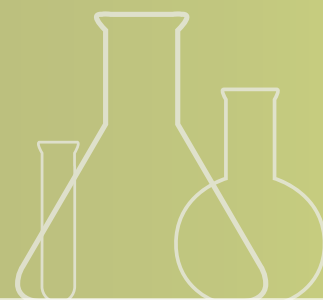


# 5077UY

Recuento de coliformes fecales en muestras  
de residuos sólidos industriales



Técnica de número más probable

---

**Elaborado** - M. Capandeguy

---

**Modificado** - No aplica

---

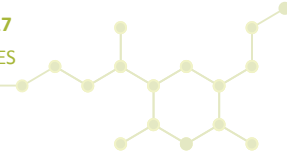
**Revisado** - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

---

**Aprobado** - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

---





## 1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es adecuada para detectar y cuantificar coliformes fecales en residuos sólidos industriales, utilizando el método estadístico de número más probable. El límite de cuantificación es de 0,18 microorganismos/mL o gramo (peso húmedo).

## 2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento 1050UY: Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos). Método termogravimétrico.
- 2.5. Ruta de análisis (RMB 11)
- 2.6. Instructivo de uso autoclaves (INE 13 y 97)
- 2.7. Instructivo de uso incubadora 35 °C (INE 46)
- 2.8. Instructivo de uso baño de agua a 44,5 °C (INE 87)
- 2.9. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 16C)
- 2.10. Instructivo de uso cámara de flujo (INE 17)
- 2.11. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 28)
- 2.13. Instructivo de uso analizador de pH (INE 98)

## 3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La muestra se diluye o suspende en buffer de dilución y se ajusta el pH, preparándose luego diluciones con las que se inoculan al menos 3 series de 5 tubos cada una de Caldo Lauril Triptosa (CLT). Este medio es utilizado como medio presuntivo, seguido por el medio EC para la confirmación de coliformes fecales. El medio EC no debe ser utilizado para aislar directamente ya que es necesario el enriquecimiento previo en un medio presuntivo (CLT) para la óptima recuperación de coliformes fecales.
- 3.2. El grupo de bacterias de coliformes fecales para la técnica de número más probable se definen como aquellas bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas que crecen y producen gas en CLT luego de ser incubadas a 35 °C ± 0,5 °C por 48 h ± 3 h y posteriormente fermentan lactosa y producen gas tras ser incubadas a 44,5 °C ± 0,2 °C por 24 h ± 2 h en caldo EC. La ausencia de producción de gas indica que no hay coliformes fecales presentes.
- 3.3. La densidad de coliformes fecales es reportada como NMP/g de peso seco.

## 4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes, túnica y guantes de descartables, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

## 5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La distribución desigual de bacterias en la muestra puede resultar en la tergiversación de la densidad real bacteriana dado que la técnica de número más probable se basa en la distribución de Poisson.

## 6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN

- 6.1. La muestra debe ser colectada en recipientes estériles de vidrio, plástico o bolsas de nylon. La muestra típica debe ser de al menos 100 g.
- 6.2. Mantener las muestras bacteriológicas por debajo de los 10 °C durante el traslado al laboratorio. El tiempo entre la toma de muestra y su análisis no puede superar las 24 horas.

## 7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Recipientes de plástico de 150 mL esterilizables
- 7.2. Tubos de ensayo de vidrio de 14,5 cm x 2,5 cm esterilizables
- 7.3. Tubos de ensayo de vidrio de 14,5 cm x 1,5 cm esterilizables
- 7.4. Campanas de Durham de 6 mm x 50 mm esterilizables
- 7.5. Gradilla para tubos de ensayo
- 7.6. Algodón
- 7.7. Anzas de 3 - 4 mm de diámetro
- 7.8. Mechero
- 7.9. Material de vidrio para la preparación de los medios de cultivo (500 mL y 1000 mL)
- 7.10. Incubadora a  $35,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- 7.11. Baño de agua o incubadora a  $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$
- 7.12. Placas de Petri de vidrio estériles de 7 cm de diámetro aprox.
- 7.13. Matraces de 1 y 2 L de capacidad
- 7.14. Balanza con resolución 0,01 g
- 7.15. Bolsas de nylon estériles
- 7.16. Analizador de pH
- 7.17. Heladera
- 7.18. Autoclave
- 7.19. Probetas 100 mL de plástico o vidrio
- 7.20. Pipeta automática de 0,1 – 1,0 mL y 1,0 – 10,0 con tips estériles correspondientes
- 7.21. Rastrillos estériles
- 7.22. Campana de flujo laminar (de preferencia)
- 7.23. Estufa de secado

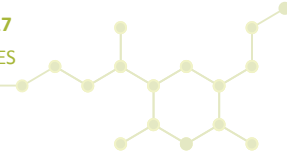
## 8. REACTIVOS

- 8.1. Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Nro. CAS 7778-77-0)
- 8.2. Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$  Nro. CAS 7786-30-3)
- 8.3. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.4. Agar de soja tríptica (TSA)
- 8.5. Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$  Nro. CAS 1310-73-2) 1,0 N para ajuste de pH
- 8.6. Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$  Nro. CAS 7647-01-0) 1,0 N para ajuste de pH
- 8.7. Medio de cultivo caldo de lauril triptosa (CLT)
- 8.8. Medio de cultivo caldo EC
- 8.9. Cepa certificada de *Escherichia coli* ATCC # 25922 (de preferencia) como control positivo de los medios CLT y EC
- 8.10. Cepa certificada de *Pseudomonas* sp. ATCC # 27853 (de preferencia) como control negativo del medio CLT
- 8.11. Cepa certificada de *Enterobacter aerogenes* ATCC # 13048 (de preferencia) como control negativo del medio EC

*Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.*

## 9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Utilizar lentes, guantes y túnica para el tratamiento de las muestras.



## 10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

## 11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

### Operaciones previas

- 11.1. **Solución stock de buffer:** Disolver 34,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 500 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N. Llevar el volumen a 1 L con agua desionizada. Esterilizar por filtración o en autoclave por 30 min a 121 °C. Rotular el recipiente indicando nombre del reactivo, fecha de elaboración y técnico responsable. Almacenar en heladera hasta el momento de uso, si hay evidencia de moho o de cualquier otro tipo contaminación, la solución debe de ser descartada y se debe preparar una nueva.
- 11.2. **Solución stock de cloruro de magnesio:** Agregar 38 g de  $\text{MgCl}_2$  a 1 L de agua desionizada. Esterilizar en autoclave por 30 min a 121 °C. Rotular el recipiente indicando nombre del reactivo, fecha de elaboración y técnico responsable. Almacenar en heladera hasta el momento de uso, si hay evidencia de moho o de cualquier otro tipo contaminación, la solución debe de ser descartada y se debe preparar una nueva.
- 11.3. **Buffer:** Mezclar 1,25 mL de la solución stock de buffer con 5 mL de la solución stock de cloruro de magnesio por litro de agua desionizada. El pH final debe ser de  $7,0 \pm 0,2$ ; de lo contrario ajustar con NaOH o NaCl 1N. Rotular el recipiente indicando nombre del reactivo, fecha de elaboración y técnico responsable. Almacenar en heladera hasta el momento de uso, si hay evidencia de moho o de cualquier otro tipo contaminación la solución debe de ser descartada y se debe preparar una nueva.
- 11.4. **TSA:** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada litro de medio a preparar utilizar 40,0g de TSA. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de  $7,3 \pm 0,2$  ajustar con soluciones de NaOH o NaCl. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Dispensar en placas de Petri estériles, aproximadamente 20 mL por placa. Dejar que el medio alcance temperatura ambiente antes de almacenar o usar. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Almacenar invertidas por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.5. **Caldo lauril triptosa (CLT):** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada litro a preparar utilizar 35,6 g de CLT y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de  $6,8 \pm 0,2$  ajustar con soluciones de NaOH o NaCl 1N. Dispensar 5,0 mL en tubos de ensayos y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.6. **Caldo lauril triptosa 2X (CLT 2X):** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada litro a preparar utilizar 71,2 g de CLT y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de  $6,8 \pm 0,2$  ajustar con soluciones de NaOH o NaCl 1N. Dispensar 10,0 mL en tubos de ensayo y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.7. **EC:** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada a litro a preparar, colocar 37,0 g de EC y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de  $6,9 \pm 0,2$ , ajustar con soluciones de NaOH o NaCl 1N. Dispensar 5,0 mL en tubos de ensayo y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.8. **Preparación de recipientes con buffer para diluciones:** Colocar 90 mL de buffer en recipientes de plástico de 150 mL. La cantidad de recipientes con buffer a preparar depende de la cantidad de series de diluciones que se vayan a realizar. También colocar 270 mL de buffer en frascos de 500 mL (preparar tantos como muestras a analizar). Tapar, rotular, cubrir con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar en heladera hasta el momento de su uso, máximo 30 días.
- 11.9. **Control positivo:** Mantener un cultivo stock de E. coli en medio TSA para el control positivo de los medios CLT y EC, renovándolo cada 30-40 días aproximadamente.
- 11.10. **Control negativo:** Mantener un cultivo stock de Enterobacter aerogenes en TSA para control negativo del medio EC y cultivo stock de Pseudomonas sp en TSA para control negativo del medio CLT, renovándolo cada 30-40 días aproximadamente.

## Preparación de la muestra

11.11. **Muestras sólidas:** Pesar 30,0 g  $\pm$  0,1 g de la muestra previamente mezclada en una bolsa estéril. Agregar 270 mL de buffer estéril y agitar enérgicamente hasta lograr una mezcla homogénea. Esta es la muestra "homogeneizada" (concentración = 0,1 g/mL). Ajustar el pH a 7,0-7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Si el valor de pH está muy alejado de este rango, utilizar HCl o NaOH más concentrado, de forma de no exceder el volumen de la muestra homogeneizada por más de 5 % (15 mL).

*Nota 2: No dejar la muestra homogeneizada a temperatura ambiente por más de 30 minutos.*

**Diluciones de la muestra:** Usar una pipeta estéril para transferir 10 mL de la muestra homogeneizada a 90 mL de buffer. Agitar manualmente un mínimo de 25 veces. Esta es la dilución 1 (concentración = 0,01 g/mL). A partir de esta, realizar diluciones seriadas transfiriendo 10 mL de la dilución anterior a 90 mL de buffer (dilución 2, 3, ...).

11.12. **Caso especial de muestras líquidas (% peso seco  $\leq$  7 %):** Colocar 300 mL de la muestra en una bolsa estéril y agitar manualmente para homogeneizar. Ajustar el pH a 7,0 -7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Esta es la muestra "homogeneizada". Si el valor de pH está muy alejado de este rango, utilizar HCl o NaOH más concentrado, de forma de no exceder el volumen de la muestra homogeneizada por más de 5 % (15 mL).

Para las diluciones de la muestra el procedimiento a seguir es el mismo que se realiza para muestras sólidas (11.11)

## Análisis de la muestra

### Fase presuntiva con caldo lauril triptosa (CLT)

11.13. Preparar CLT y colocarlo en tubos como se menciona en la Sección 11.5 Si el medio está almacenado en heladera, retirar 1 - 1,5 horas antes de realizar la inoculación para que alcance temperatura ambiente.

11.14. Sembrar los tubos. Para cada muestra se utilizan por lo menos 4 series, denominadas A, B, C y D con 5 tubos cada una. Cuando se siembran 10 mL de muestra, se deben utilizar tubos con concentración 2X (al doble). Rotular claramente cada tubo para identificar la muestra y la dilución inoculada.

**Serie A.** Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie A con 10,0 mL de muestra homogeneizada. Esta serie de tubos contiene 1,0 g de la muestra original. Esta serie de tubos debe contener una concentración del medio de 2X (al doble de concentración).

**Serie B.** Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie B con 1,0 mL de la muestra homogeneizada. Esta serie de tubos contiene 0,1 g de la muestra original.

**Serie C.** Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie C con 1,0 mL de la dilución de "1". Esta serie de tubos contiene 0,01 g de la muestra original.

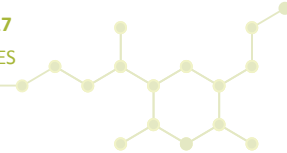
**Serie D.** Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie D con 1,0 mL de la dilución de "2". Esta serie de tubos contiene 0,001 g de la muestra original.

*Nota 3: Las diluciones descritas anteriormente se indican a modo de ejemplo. Si se conoce de antemano que la concentración de coliformes fecales es mayor a 1600 NMP/mL, entonces co-menzar sembrando 1,0 mL de la muestra homogeneizada y las 3 siguientes consecutivas. Realizar las series que mejor se adecuen según la concentración de coliformes fecales esperada.*

11.15. Incubar los tubos sembrados a 35 °C  $\pm$  0,5 °C. Luego de 24 h  $\pm$  2 h examinar los tubos para ver crecimiento y producción de gas. Si no hubo producción de gas, re-incubar por otras 24 h  $\pm$  2 h.

11.16. Los tubos en los cuales se evidenció crecimiento y producción de gas dentro de las 48 h  $\pm$  3 h, se consideran presuntivamente positivos. La presencia de gas pero no de crecimiento se considera negativa, ya que puede deberse a un mal manejo de la campana.

11.17. Para los tubos con reacción presuntiva positiva pasar a la fase de confirmación con EC.



### Fase confirmativa para coliformes fecales usando el medio de cultivo EC

- 11.18. Preparar los tubos de EC según sección 11.7. Por cada tubo positivo de CLT, se inocula un tubo de EC. Si el medio está almacenado en heladera, retirar 1 - 1,5 horas antes de realizar la inoculación para que alcance temperatura ambiente.
- 11.19. Agitar suavemente el tubo que presentó reacción positiva presuntiva.
- 11.20. Usar un anza estéril para transferir crecimiento desde el tubo de reacción presuntiva positiva al correspondiente tubo de EC.
- 11.21. Colocar todos los tubos inoculados de EC en un baño de agua o incubadora a  $44,5 \pm 0,2$  °C (dentro de la media hora post inoculación) y dejarlos por  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .
- 11.22. Luego de la incubación, examinar cada tubo en busca de crecimiento y producción de gas. El crecimiento y la producción de gas en caldo EC luego de  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  son considerados como reacción de coliformes fecales positiva. La presencia de gas pero no de crecimiento se considera negativa.
- 11.23. Registrar los resultados positivos y negativos de EC

### Determinación de % peso seco

- 11.24. Pesar entre 10 - 30 g de la muestra en un crisol o plato.
- 11.25. Dejar secar durante toda la noche a una temperatura entre  $103 - 105$  °C. Permitir que la muestra llegue a temperatura ambiente dentro del desecador antes de pesarla.
- 11.26. Calcular el % de peso seco de la siguiente manera:

$$\% \text{ peso seco} = \frac{\text{g muestra seca}}{\text{g muestra húmeda}} \times 100$$

*Nota 4: en el caso de contar con balanza de humedad, ver procedimiento 1050UY: Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos). Método termogravimétrico.*

## 12. ANÁLISIS DE DATOS

La densidad de coliformes fecales se calcula siguiendo la técnica de número más probable (NMP). Debido a la extrema variabilidad de la muestras, el resultado se expresa en NMP/g en peso seco. A este resultado se llega siguiendo los próximos 3 pasos: selección de las diluciones significativas, cálculo NMP/g, cálculo de NMP/g peso seco.

### Selección de diluciones significativas

De las 4 series realizadas en 11.3, solamente 3 de ellas son consideradas como significativas. Leer todos los siguientes pasos para la elección.

- 12.1. Elegir la serie menos concentrada con resultados positivos en los 5 tubos. Esta serie y las 2 siguientes menos concentradas son consideradas como las significativas. (Tabla 2, ejemplo A).
- 12.2. Si la serie más concentrada tiene menos de 5 tubos positivos se selecciona esa serie y las dos que les siguen. (Tabla 2, ejemplos B y C).
- 12.3. Si al aplicar los pasos 1 y 2, queda sin seleccionar una serie menos concentrada con algún tubo positivo, entonces seleccionar la serie más concentrada que presente menos de 5 tubos positivos y las siguientes 2 series. (Tabla 2, ejemplo D).
- 12.4. Si al aplicar las reglas anteriores queda aún sin seleccionar una serie menos concentrada con resultados positivos, entonces agregar el número de tubos positivos de esta serie a los de la serie más diluida de las que fueron seccionadas. (Tabla 2, ejemplo E).
- 12.5. Si al aplicar las reglas anteriores, las series realizadas no son suficientes como para seleccionar 3, seleccionar las 3 series menos concentradas. (Tabla 2, ejemplo F).

### Cálculo de NMP/g de peso húmedo

12.6. Obtener el índice de NMP de la Tabla 1, considerando las diluciones significativas seleccionadas en el paso anterior. Los límites de confianza del 95% también pueden ser obtenidos de la Tabla 1.

$$\text{NMP/g} = \frac{\text{índice de NMP (Tabla 1)}}{\text{g de muestra de la dilución más concentrada (de las 3 seleccionadas como significativas)}}$$

Tabla 1. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones positivas cuando se utilizan 5 tubos por serie.

Combinación de tubos positivos	Índice NMP/mL	Límite confianza del 95%		Combinación de tubos positivos	Índice NMP/mL	Límite confianza del 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-2	0,36	0,03	1,01	1-3-2	1,25	0,29	2,96
0-0-3	0,54	0,03	1,37	1-3-3	1,47	0,38	3,64
0-0-4	0,72	0,08	1,74	1-3-4	1,69	0,48	4,60
0-0-5	0,91	0,15	2,12	1-3-5	1,91	0,57	5,66
0-1-0	0,18	0,03	0,63	1-4-0	1,05	0,21	2,45
0-1-1	0,36	0,03	1,01	1-4-1	1,27	0,30	3,00
0-1-2	0,55	0,03	1,38	1-4-2	1,48	0,39	3,70
0-1-3	0,73	0,08	1,75	1-4-3	1,70	0,48	4,68
0-1-4	0,91	0,15	2,14	1-4-4	1,93	0,58	5,75
0-1-5	1,10	0,23	2,56	1-4-5	2,15	0,67	6,57
0-2-0	0,37	0,03	1,02	1-5-0	1,28	0,30	3,03
0-2-1	0,55	0,03	1,39	1-5-1	1,50	0,40	3,75
0-2-2	0,74	0,08	1,76	1-5-2	1,72	0,49	4,77
0-2-3	0,92	0,15	2,15	1-5-3	1,95	0,58	5,83
0-2-4	1,11	0,23	2,58	1-5-4	2,17	0,68	6,64
0-2-5	1,29	0,31	3,07	1-5-5	2,40	0,77	7,31
0-3-0	0,56	0,03	1,40	2-0-0	0,45	0,03	1,19
0-3-1	0,74	0,09	1,77	2-0-1	0,68	0,06	1,64
0-3-2	0,93	0,16	2,17	2-0-2	0,91	0,15	2,13
0-3-3	1,12	0,23	2,60	2-0-3	1,15	0,25	2,69
0-3-4	1,30	0,31	3,10	2-0-4	1,39	0,35	3,38
0-3-5	1,49	0,39	3,72	2-0-5	1,64	0,46	4,37
0-4-0	0,75	0,09	1,79	2-1-0	0,68	0,06	1,66
0-4-1	0,94	0,16	2,19	2-1-1	0,92	0,15	2,16
0-4-2	1,12	0,24	2,63	2-1-2	1,16	0,25	2,72
0-4-3	1,31	0,32	3,13	2-1-3	1,41	0,36	3,43
0-4-4	1,50	0,40	3,77	2-1-4	1,66	0,46	4,47
0-4-5	1,69	0,48	4,62	2-1-5	1,92	0,57	5,71
0-5-0	0,94	0,16	2,21	2-2-0	0,93	0,16	2,18
0-5-1	1,13	0,24	2,65	2-2-1	1,18	0,26	2,76
0-5-2	1,33	0,32	3,17	2-2-2	1,43	0,36	3,49
0-5-3	1,52	0,40	3,82	2-2-3	1,68	0,47	4,56
0-5-4	1,71	0,48	4,70	2-2-4	1,94	0,58	5,81
0-5-5	1,90	0,56	5,63	2-2-5	2,21	0,69	6,75



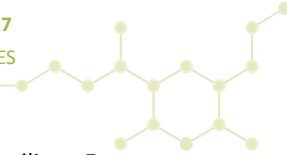


Tabla 1. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones positivas cuando se utilizan 5 tubos por serie (Continuación).

Combinación de tubos positivos	Índice NMP/mL	Límite confianza del 95%		Combinación de tubos positivos	Índice NMP/mL	Límite confianza del 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
1-0-0	0,20	0,03	0,68	2-3-0	1,19	0,26	2,79
1-0-1	0,40	0,03	1,08	2-3-1	1,44	0,37	3,55
1-0-2	0,60	0,03	1,49	2-3-2	1,70	0,48	4,67
1-0-3	0,81	0,11	1,91	2-3-3	1,97	0,59	5,91
1-0-4	1,01	0,19	2,36	2-3-4	2,23	0,70	6,83
1-0-5	1,22	0,28	2,87	2-3-5	2,51	0,82	7,59
1-1-0	0,40	0,03	1,09	2-4-0	1,46	0,38	3,61
1-1-1	0,61	0,03	1,50	2-4-1	1,72	0,49	4,77
1-1-2	0,81	0,11	1,92	2-4-2	1,99	0,60	6,00
1-1-3	1,02	0,19	2,38	2-4-3	2,26	0,72	6,92
1-1-4	1,23	0,29	2,90	2-4-4	2,54	0,83	7,68
1-1-5	1,44	0,37	3,54	2-4-5	2,82	0,94	8,36
1-2-0	0,61	0,03	1,51	2-5-0	1,74	0,50	4,88
1-2-1	0,82	0,12	1,94	2-5-1	2,01	0,61	6,10
1-2-2	1,03	0,20	2,40	2-5-2	2,29	0,73	7,00
1-2-3	1,24	0,29	2,93	2-5-3	2,57	0,84	7,76
1-2-4	1,46	0,38	3,59	2-5-4	2,86	0,95	8,45
1-2-5	1,67	0,47	4,51	2-5-5	3,15	1,07	9,10
3-0-0	0,79	0,10	1,88	4-3-0	2,71	0,90	8,09
3-0-1	1,06	0,21	2,46	4-3-1	3,26	1,11	9,34
3-0-2	1,35	0,33	3,23	4-3-2	3,86	1,32	10,60
3-0-3	1,65	0,46	4,40	4-3-3	4,51	1,54	11,92
3-0-4	1,96	0,59	5,89	4-3-4	5,21	1,76	13,31
3-0-5	2,29	0,73	6,99	4-3-5	5,93	1,96	14,77
3-1-0	1,07	0,22	2,50	4-4-0	3,35	1,14	9,53
3-1-1	1,37	0,34	3,29	4-4-1	3,98	1,37	10,84
3-1-2	1,67	0,47	4,52	4-4-2	4,66	1,59	12,23
3-1-3	1,99	0,60	6,01	4-4-3	5,39	1,81	13,68
3-1-4	2,32	0,74	7,10	4-4-4	6,15	2,02	15,21
3-1-5	2,67	0,88	8,00	4-4-5	6,93	2,23	16,81
3-2-0	1,38	0,35	3,35	4-5-0	4,11	1,41	11,11
3-2-1	1,70	0,48	4,64	4-5-1	4,83	1,64	12,56
3-2-2	2,02	0,62	6,13	4-5-2	5,59	1,87	14,09
3-2-3	2,36	0,76	7,20	4-5-3	6,39	2,09	15,70
3-2-4	2,71	0,90	8,10	4-5-4	7,22	2,30	17,39
3-2-5	3,08	1,04	8,94	4-5-5	8,06	2,50	19,16

Tabla 1. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones positivas cuando se utilizan 5 tubos por serie (Continuación).

Combinación de tubos positivos	Índice NMP/mL	Límite confianza del 95%		Combinación de tubos positivos	Índice NMP/mL	Límite confianza del 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
3-3-0	1,72	0,49	4,77	5-0-0	2,40	0,76	7,63
3-3-1	2,05	0,63	6,24	5-0-1	3,14	1,06	9,08
3-3-2	2,40	0,77	7,31	5-0-2	4,27	1,46	11,42
3-3-3	2,76	0,92	8,21	5-0-3	5,78	1,92	14,46
3-3-4	3,13	1,06	9,06	5-0-4	7,59	2,39	18,16
3-3-5	3,52	1,20	9,89	5-0-5	9,53	1,65	22,34
3-4-0	2,09	0,64	6,36	5-1-0	3,29	1,12	9,40
3-4-1	2,44	0,79	7,42	5-1-1	4,56	1,56	12,02
3-4-2	2,81	0,93	8,33	5-1-2	6,31	2,07	15,53
3-4-3	3,19	1,08	9,18	5-1-3	8,39	2,57	19,85
3-4-4	3,58	1,23	10,02	5-1-4	10,62	3,04	24,85
3-4-5	3,99	1,37	10,86	5-1-5	12,93	3,04	30,90
3-5-0	2,48	0,80	7,53	5-2-0	4,93	1,67	12,76
3-5-1	2,86	0,95	8,44	5-2-1	7,00	2,24	16,94
3-5-2	3,25	1,10	9,31	5-2-2	9,44	2,80	22,13
3-5-3	3,65	1,25	10,17	5-2-3	12,05	3,31	28,43
3-5-4	4,07	1,40	11,03	5-2-4	14,79	3,81	37,14
3-5-5	4,50	1,54	11,89	5-2-5	17,67	5,03	52,30
4-0-0	1,30	0,31	3,11	5-3-0	7,92	2,47	18,86
4-0-1	1,66	0,46	4,45	5-3-1	10,86	3,08	25,44
4-0-2	2,07	0,64	6,31	5-3-2	14,06	3,68	34,45
4-0-3	2,53	0,82	7,64	5-3-3	17,50	4,34	51,31
4-0-4	3,02	1,02	8,81	5-3-4	21,22	5,29	67,98
4-0-5	3,55	1,21	9,96	5-3-5	25,27	8,14	79,71
4-1-0	1,69	0,48	4,60	5-4-0	12,99	3,48	31,08
4-1-1	2,12	0,66	6,46	5-4-1	17,24	4,29	49,75
4-1-2	2,58	0,85	7,79	5-4-2	22,12	5,63	70,87
4-1-3	3,10	1,05	8,98	5-4-3	27,81	8,82	86,00
4-1-4	3,65	1,25	10,16	5-4-4	34,54	11,59	101,10
4-1-5	4,25	1,45	11,38	5-4-5	42,56	14,37	118,00
4-2-0	2,16	0,67	6,61	5-5-0	23,98	7,62	76,29
4-2-1	2,64	0,87	7,94	5-5-1	34,77	11,72	101,60
4-2-2	3,17	1,08	9,15	5-5-2	54,22	17,91	141,90
4-2-3	3,75	1,29	10,37	5-5-3	91,78	26,72	220,10
4-2-4	4,38	1,50	11,64	5-5-4	160,90	38,37	410,30
4-2-5	5,04	1,71	12,97	5-5-5	>160,90		

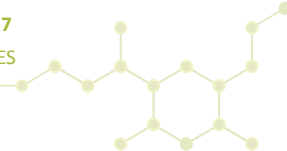


Tabla 2. Ejemplo de selección de series significativas y cálculos de NMP/g

Ejemplos	0,001 g	0,0001 g	0,00001 g	0,000001 g	1er paso Diluciones significativas	2do paso Índice NMP (Tabla 1) / mayor dilución significativa
A	5/5	5/5	3/5	0/5	5-3-0	(7,92/0,0001)=79,200 NMP/g
B	4/5	5/5	1/5	0/5	4-5-1	(4,83/0,001)=4830 NMP/g
C	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	(0,18/0,001)=180 NMP/g
D	5/5	3/5	1/5	1/5	3-1-1	(1,37/0,0001)=13,700 NMP/g
E	4/5	4/5	0/5	1/5	4-4-1	(3,98/0,001)=3980 NMP/g
F	5/5	5/5	5/5	2/5	5-5-2	(54,22/0,0001)=542,200 NMP/g

### Cálculo de NMP/g de peso seco

12.7. Para el análisis y el cálculo de % peso seco ir a la Sección 11.3.

12.8. Convertir a NMP/g en peso seco usando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{NMP}}{\text{g (peso seco)}} = \frac{\frac{\text{NMP}}{\text{g (peso húmedo)}}}{\% \text{ peso seco (expresado en decimales)}}$$

## 13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

### Control de cultivos

Cada vez que se analizan muestras se deben realizar los siguientes controles de los medios de cultivo CLT y EC

13.1. **Verificación de esterilidad de los medios de cultivos:** incubar una porción representativa de cada lote de medio de cultivo preparado (1 de cada 50 aprox.) en iguales condiciones que la muestra, a 35 °C ± 0,5 °C (CLT) y 44,5 °C ± 0,2 °C (EC) durante 48 h ± 3 h o 24 h ± 2 h respectivamente, y verificar que no haya crecimiento

13.2. **Controles negativos:** inocular el medio CLT con una especie negativa conocida de coliformes (*Pseudomonas* ATCC # 27853 de preferencia) y el medio EC con una especie negativa de coliformes fecales (*Enterobacter aerogenes* ATCC # 13048 de preferencia) e incubar en iguales condiciones que la muestra. No debe haber crecimiento ni producción de gas.

13.3. **Controles positivos:** inocular los medios CLT y EC con una especie conocida de coliforme fecal (*E. coli* ATCC # 25922 de preferencia) e incubar en iguales condiciones que la muestra. Debe evidenciarse crecimiento y producción de gas.

### Blanco

Cada día que se analicen muestras se debe realizar un blanco de muestra.

13.4. **Muestras sólidas:** Esterilizar 100 g de muestra en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Pesarse 30,0 g ± 0,1 g de la muestra previamente mezclada en una bolsa estéril. Agregar 270 mL de buffer estéril y agitar para homogenizar. Esta es la muestra "homogeneizada". Ajustar el pH a 7,0-7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Esta es la muestra "homogeneizada".

13.5. **Caso especial de muestras líquidas (% peso seco ≤ 7%):** Esterilizar por duplicado 500 mL de muestra en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Colocar 300 mL de la muestra en una bolsa estéril y agitar para homogenizar. Ajustar el pH a 7,0-7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Esta es la muestra "homogeneizada".

13.6. Preparar la muestra, realizar las diluciones según sección 11.2 sembrar según 11.3 (con 3 series es suficiente) e incubar en iguales condiciones que la muestra. No debe haber crecimiento en ningún tubo.

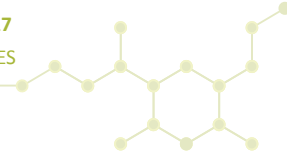
### **Precisión**

Cada día que se analicen muestras, se debe realizar al menos una muestra por duplicado.

- 13.7. Utilizar los valores obtenidos en el cálculo de NMP/g de la muestra realizada por duplicado y calcular sus respectivos logaritmos.
- 13.8. Calcular la diferencia de los logaritmos en valor absoluto.
- 13.9. Verificar que este valor sea menor al valor de precisión del método calculado en la validación de la metodología.

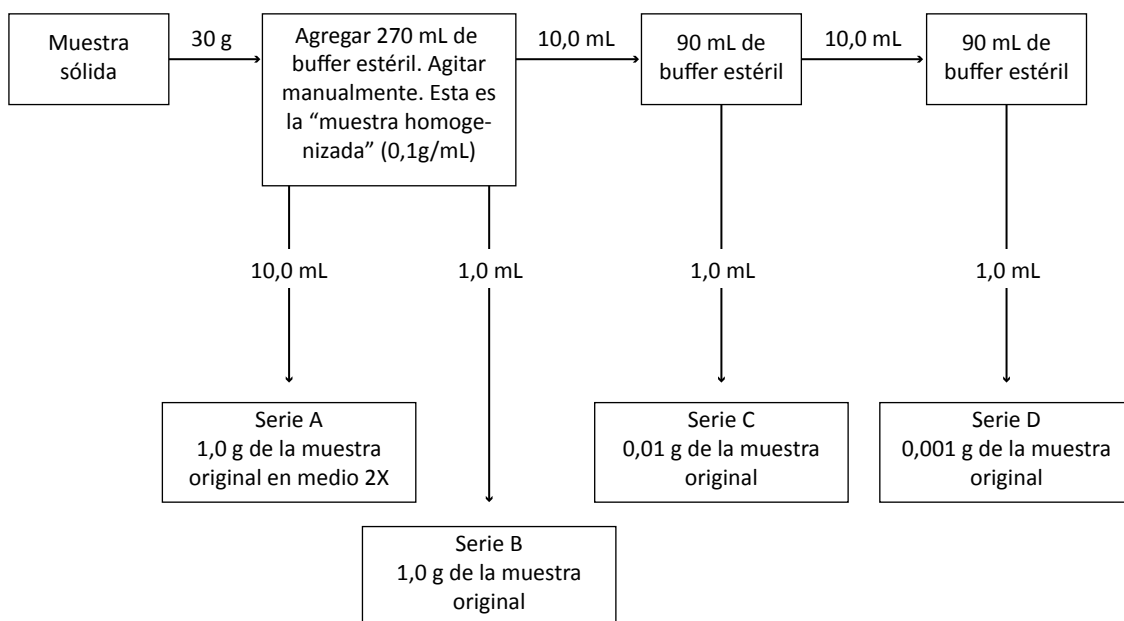
## **14. BIBLIOGRAFÍA**

- 14.1. EPA-821-R-10-003 Method 1680: Fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by Multiple tube Fermentation using Lauryl Tryptose Broth (LTB) and EC Medium, US EPA, Abril 2010.

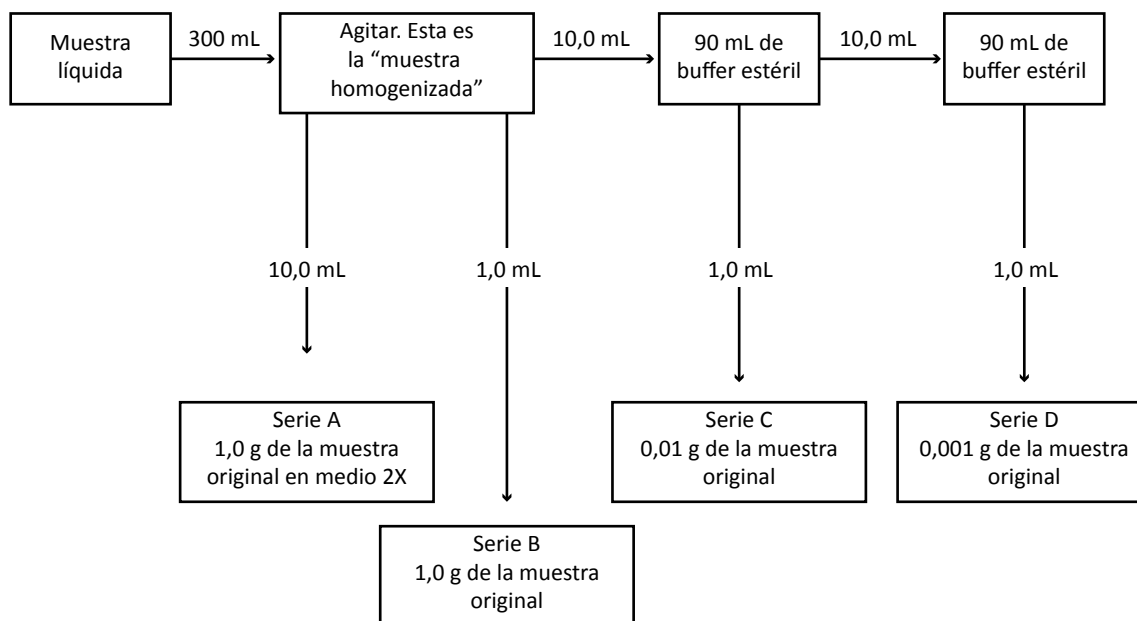


## ANEXOS

### A. Esquema de diluciones y sembrado de tubos para muestras sólidas



### B. Caso especial: esquema de diluciones y sembrado de tubos para muestras líquidas (muestra sólida con porcentaje de peso seco menor o igual a 7%)



C. Esquema de fermentaciones

