

Aguas residuales - Métodos de análisis - Parte 23: Determinación de coliformes fecales en medio A-1

Waste water - Test methods - Part 23: Determination of faecal coliform organisms in A-1 medium

Primera edición : 1995

Reimpresión : 1999

Descriptor: *calidad del agua, aguas residuales, análisis químico, determinación de contenido, análisis microbiológico, coliformes fecales, bacterias coliformes*

CIN 13.060.40;07.100.20

COPYRIGHT © 1995 : INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION - INN

* Prohibida reproducción y venta *

Dirección : Matías Cousiño N° 64, 6° Piso, Santiago, Chile

Casilla : 995 Santiago 1 - Chile

Teléfonos : +(56 2) 441 0330 • Centro de Documentación y Venta de Normas (5° Piso) : +(56 2) 441 0425

Telefax : +(56 2) 441 0427 • Centro de Documentación y Venta de Normas (5° Piso) : +(56 2) 441 0429

Internet : inn@entelchile.net

Miembro de : ISO (International Organization for Standardization) • COPANT (Comisión Panamericana de Normas Técnicas)

Aguas residuales - Métodos de análisis - Parte 23: Determinación de coliformes fecales en medio A-1

Preámbulo

El Instituto Nacional de Normalización, INN, es el organismo que tiene a su cargo el estudio y preparación de las normas técnicas a nivel nacional. Es miembro de la INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) y de la COMISION PANAMERICANA DE NORMAS TECNICAS (COPANT), representando a Chile ante esos organismos.

La norma NCh2313/23 ha sido preparada por la División de Normas del Instituto Nacional de Normalización, y en su estudio participaron los organismos y las personas naturales siguientes:

Aguas Industriales Ltda.
Alex Stewart Intercorp Chile y Cia. Ltda.
AQUA Ltda.
Bayer de Chile S.A.
Centro de Estudios, Medición y Certificación
de Calidad, CESMEC Ltda.

Centro de Investigación Minero Metalúrgica, CIMM
Centro de Investigación y Planificación sobre el
Medio Ambiente, CIPMA
Cervecera Santiago Ltda.
CIREN CORFO
CODELCO - Chile
Comisión Nacional del Medio Ambiente, CONAMA
Compañía Minera Disputada Las Condes S.A.
Compañía Minera El Indio

Alejandra Sandoval
Manuel Montero N.
Raúl Thiers
Ricardo Fehlandt G.

Vicenta Lozano R.
Sandra Muñoz
Ximena Parra S.
Olga Ureta B.
Ruby Utrera C.

Iván Santandreu
David Carre T.
José Luis Gómez A.
Alberto Tello
Patricia Matus C.
Fernando Valenzuela D.
Eugenio Benítez G.

NCh2313/23

Compañía Tecno Industrial S.A.
Cooperativa Agrícola Lechera Santiago Ltda.
Departamento de Investigaciones Científicas y
Tecnológicas, Universidad Católica de Chile, DICTUC
Dirección General de Aguas, DGA
Dirección General Territorio Marítimo y Marina
Mercante, DIRECTEMAR
EC-LAB
Embotelladora Andina S.A.
Empresa de Agua Potable Lo Castillo S.A.,
EAPLOC
Empresa de Servicios Sanitarios de Coquimbo,
ESSCO S.A.
Empresa de Servicios Sanitarios del Bío-Bío,
ESSBIO S.A.

Empresa de Servicios Sanitarios El Libertador S.A.,
ESSEL S.A.
Empresa Metropolitana de Obras Sanitarias, EMOS S.A.

Empresa Pesquera EPERVA S.A.
Empresa Servicios Sanitarios de Antofagasta S.A.
Empresa Servicios Sanitarios de Atacama S.A.
Empresa Servicios Sanitarios de La Araucanía,
ESSAR S.A.
Empresa Servicios Sanitarios de Valparaíso,
ESVAL S.A.

Empresas CMPC S.A.
Fundación Chile
Hidrolab Ltda.
IANSA S.A.
Industrias Ambrosoli S.A.
Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA

Instituto de Investigaciones y Control, IDIC
Instituto de Investigaciones Pesqueras
Instituto de Salud Pública de Chile, ISP
Instituto Nacional de Normalización, INN
Laboratorios Carlos Latorre
OXIQUIM S.A.
Pesquera El Golfo S.A.
PETROX S.A.

Pablo Zamorano G.
Marco Antonio Leiva A.

Arturo Givovich H.
Alberto Merino G.

Crnl. L.T. Carlos Bastías A.
Manuel Ruiz M.
Patricio Delpiano P.

Elizabeth Echeverría

Beatriz Honorato G.

Aquiles Altamirano H.
Pedro Cisternas O.

Eduardo Alarcón M.
Mireya Alvarado S.
Fernando Garcés A.
Mercedes Rojas S.
Fernando Sandoval S.
Isabel Villar A.
José R. Cañón C.
Jorge Ponce de León F.
Claudia Sara Almendares A.

Zita Ruiz I.

Manuel Alvarez C.
Myriam Rodríguez M.
Pedro Muga F.
Laura Avila M.
Ximena Cuadros M.
Ricardo Cereceda O.
Luis Borie Melgar
Elena Bustamante A.
Regina Ite D.
José Matamala G.
Alfredo Calvo C.
Luis Furet C.
Nelly Elgueta M.
Leonor Ceruti M.
Ricardo Latorre
Jorge Orlando Rivas Q.
Nicos Nicolaidés B.
Sergio Arévalo E.

Servicio Agrícola y Ganadero, Departamento de
Protección de los Recursos Naturales, SAG – DEPROREN
Servicio Nacional de Geología y Minería, SERNAGEOMIN
SGS Chile Ltda.
SGS Eco-Care Ltda.
SHELL Chile S.A.
SILOB Chile Laboratorios

Sergio Rojas P.
Luis Hinojosa A.
Jessica Burckhardt V.
Víctor Arenas C.
Jorge Naranjo S.
Anita Bontá Z.
Silvia Díaz A.
Jaime Lobos C.
Alberto Ill Pong L.
Aníbal Mege T.
Ricardo Cristi L.
Christian Maurer G.
Ximena Lecaros G.
José N. Arenas
Eugenio Doussoulin E.
Enrique Kaliski K.
Ada González S.

Sociedad de Fomento Fabril, SOFOFA
Superintendencia de Servicios Sanitarios, SISS

TECNOLAB

Universidad Austral de Chile, UACH
Universidad de Tarapacá, Instituto Agronomía
Universidad Nacional Andrés Bello, Fac. Ingeniería
González S. Ada

Esta norma se estudió para establecer el método oficial de análisis para la determinación de coliformes fecales en aguas residuales, usando medio A-1.

Los anexos A y B forman parte del cuerpo de la norma. El anexo C no forma parte del cuerpo de la norma y se inserta solamente a título informativo.

Esta norma ha sido aprobada por el Consejo del Instituto Nacional de Normalización, en sesión efectuada el 28 de Julio de 1995.

Esta norma ha sido declarada norma chilena Oficial de la República por Decreto N° 545, de fecha 28 de Septiembre de 1995, del Ministerio de Obras Públicas, publicado en el Diario Oficial N° 35.315, del 13 de Noviembre de 1995.

Aguas residuales - Métodos de análisis - Parte 23: Determinación de coliformes fecales en medio A-1

1 Alcance y campo de aplicación

1.1 Esta norma establece el método de análisis para la determinación de coliformes fecales en medio A-1 en aguas residuales.

1.2 Esta norma es aplicable para la determinación de coliformes fecales en aguas residuales que cumplan las características de las aguas servidas domésticas que se indican en anexo A de esta norma.

1.3 En caso de que se sospeche que el agua residual contenga elementos o compuestos que puedan inhibir el crecimiento bacteriano, se debe efectuar un estudio comparativo con el método de determinación de coliformes fecales en medio EC (NCh2313/22).

2 Referencias

NCh410	Calidad del agua - Vocabulario.
NCh2313/22	Aguas residuales - Métodos de análisis - Parte 22: Determinación de coliformes fecales en medio EC.

3 Principios

El método se basa en aislar el grupo coliforme fecal, seleccionando los microorganismos por incubación del inóculo a temperaturas mayores a las normales ($44,5 \text{ °C} \pm 0,2 \text{ °C}$), utilizando la técnica de tubos múltiples.

4 Definiciones

4.1 aguas residuales: aguas que se descargan después de haber sido usadas en un proceso, o producidas por éste, y que no tienen ningún valor inmediato para este proceso.

4.2 técnica de tubos múltiples: método cuantitativo para estimar la concentración de microorganismos presentes en la muestra, mediante la inoculación de una serie de tubos en concentraciones decimales decrecientes de la muestra, en un medio de cultivo adecuado, las cuales se incuban en condiciones de tiempo y temperatura determinados.

5 Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad p.a.

5.1 Reactivos

5.1.1 Agua destilada o desmineralizada, libre de cloro, trazas de metales y compuestos tóxicos o nutrientes que puedan influir en el desarrollo o supervivencia de microorganismos.

5.1.2 Tampón fosfato dilución

a) Solución concentrada de fosfato diácido de potasio

Fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4	34 g
Hidróxido de sodio, $NaOH$ 1 N	
Agua destilada, c.s.p.	1 L

Preparación

Disolver el fosfato diácido de potasio en 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1 N. Aforar a 1 L con agua destilada.

b) Solución concentrada de cloruro de magnesio. Disolver 81,1 g de cloruro de magnesio hexahidratado en 1 litro de agua destilada.

c) Tampón fosfato para dilución (agua de dilución)

Solución concentrada de fosfato diácido de potasio	1,25 ml
Solución concentrada de cloruro de magnesio	5 ml
Agua destilada, c.s.p.	1 000 ml

Preparación

Distribuir en botellas y/o tubos de ensayo, las cantidades requeridas de tampón de dilución. Se acepta una tolerancia de variación del volumen de un 2% después de la esterilización.

Las botellas y tubos de dilución deben ser esterilizados a 121°C por 15 min.

5.2 Medios de cultivos

Para asegurarse la uniformidad del medio de cultivo, se deben usar medios deshidratados comerciales.

5.2.1 Medio A-1

Composición del medio basal.

	Concentración simple	Concentración doble
Lactosa	5,0 g	10,0 g
Triptona	20,0 g	40,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g	10,0 g
Salicina	0,5 g	1,0 g
* Polietilenglicol p-isooctil fenil éter	1,0 ml	2,0 ml

*) Tritón X-100

Preparación

Disolver la cantidad adecuada del medio, según sea concentración simple o doble, en un litro de agua destilada y calentar hasta disolución completa y ajustar el pH a $6,9 \pm 0,1$. Antes de esterilizar, distribuir 10 ml en tubos de fermentación con tubos Durham invertidos en su interior.

Esterilizar por 10 min en autoclave a 121°C. Almacenar en oscuridad a temperatura ambiente por no más de siete días. Ignorar la formación de precipitado.

6 Aparatos

6.1 Incubadoras

Las incubadoras deben mantener una temperatura uniforme y constante de $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ todo el tiempo, en todos los puntos.

Las incubadoras deben estar provistas de bandejas espaciadas de modo de asegurar la uniformidad de la temperatura de la cámara.

Mantener dentro de la incubadora un termómetro de precisión, de sensibilidad mínima $0,1^{\circ}\text{C}$, trazable a uno del *National Institute of Standards and Technology*, inmerso en líquido (glicerina, agua o aceite mineral), y llevar un registro diario de la temperatura (mañana y tarde). Es deseable, adicionalmente, mantener un termómetro de registro de máxima - mínima en la bandeja central y registrar el rango de temperatura más alta en un período de 24 h.

Se recomienda controlar y registrar una vez al mes la temperatura de cada bandeja.

6.2 Baño termostático, provisto de una tapa de dos aguas para reducir la pérdida de agua por evaporación y capaz de mantener la temperatura a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ con circulación de agua.

La temperatura debe ser monitoreada usando un termómetro de precisión de sensibilidad mínima $0,1^{\circ}\text{C}$, contrastado con un termómetro certificado por el NIST.

El baño debe tener una profundidad que asegure que los tubos incubados queden inmersos sobre el nivel del medio.

6.3 Horno de esterilización, de tamaño suficiente para prevenir la sobrecarga en el interior; construido para proporcionar una temperatura uniforme de esterilización de $170^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ y equipado con los termómetros adecuados. El uso de instrumentos de registros de temperatura es opcional, pero recomendable.

6.4 Autoclave, de tamaño suficiente, para evitar la sobrecarga interna, construido para proporcionar una temperatura uniforme dentro de la cámara hasta la temperatura de esterilización de 121°C ; equipado con un termómetro de precisión, cuyo bulbo debe estar ubicado en la línea de descarga del vapor, de tal forma de registrar la temperatura mínima dentro de la cámara de esterilización, (el uso de un instrumento de registro de temperatura es opcional), equipado con un manómetro y válvulas de seguridad apropiadamente ajustadas, conectadas directamente con la línea proveedora de vapor saturado o directamente al generador de vapor y capaz de alcanzar la temperatura deseada dentro de 30 min.

6.5 Equipo electrométrico para medición de pH, con precisión y reproducibilidad de 0,1 unidades de pH, equipado con electrodos adecuados.

6.6 Balanza de precisión, de sensibilidad mínima 1 mg.

6.7 Utensilios para la preparación del medio, de vidrio borosilicato u otro material no corrosivo, tal como acero inoxidable. El material de vidrio debe estar limpio y libre de residuos.

6.8 Pipetas, de 10, 5 y 1 ml, capaces de proporcionar el volumen requerido con seguridad y rapidez. El error de calibración dado por el fabricante no debe exceder el 2,5%.

6.9 Contenedores de pipetas

Cajas de aluminio o acero inoxidable, de un ancho de 5 cm a 7,5 cm, cilíndricas o rectangulares y un largo aproximado de 40 cm o mangas de esterilización de plástico resistente al autoclavado.

No usar contenedores o cajas de cobre o aleaciones de cobre.

6.10 Tubos y botellas de dilución

Botellas o tubos de vidrio, preferiblemente vidrio borosilicato, con tapas de vidrio esmerilado o tapas rosca cuyo delineado no produzca compuestos tóxicos o bacteriostáticos durante la esterilización. No usar tapones de algodón. Las marcas de los niveles de graduación deben ser indelebles en los lados de tubos y botellas. Las botellas plásticas o de otros materiales no tóxicos y de tamaño aceptable pueden sustituir al vidrio, siempre que puedan ser esterilizados adecuadamente.

6.11 Tubos de fermentación, de 18 mm x 150 mm ó 20 mm x 150 mm.

Cuando los tubos son usados para ensayo de producción de gas, se debe incluir un tubo Durham invertido.

Los tubos deben ser de un tamaño tal, que el tubo Durham quede completamente lleno con el medio y al menos parcialmente sumergido en el tubo y lo suficientemente grandes para hacer que las burbujas de gas sean claramente visibles.

No usar tapones de algodón cuando los tubos de fermentación son empleados en el ensayo de coliformes fecales.

7 Procedimiento

7.1 Recolección y preservación de la muestra

7.1.1 Usar envases de material neutro e inocuo, esterilizados. En caso de usar frascos, la tapa y el cuello deben cubrirse con papel antes de su esterilización.

7.1.2 Para muestras que contengan cloro, previo a la esterilización, agregar al envase 0,1 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10% m/v por cada 100 ml de muestra.

7.1.3 Para muestras que contengan metales pesados, previo a la esterilización, agregar 0,3 ml de solución al 15% m/v de EDTA ajustada a pH 6,5, por cada 120 ml de muestra.

7.2 Muestra

Antes de efectuar los cultivos, la botella con la muestra y las diluciones, deben ser agitadas vigorosamente preferentemente por agitación mecánica, con movimientos hacia arriba y hacia abajo.

7.3 Diluciones

7.3.1 Dilución 1:10 (10^{-1}) Tomar 1 ml de la muestra y depositarla en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de dilución estéril.

7.3.2 Dilución 1:100 (10^{-2}) De la dilución 1:10 tomar 1 ml y depositarlo en un tubo de ensayo, con 9 ml de agua de dilución estéril.

7.3.3 Las siguientes diluciones se efectúan de igual forma de acuerdo a la cantidad de microorganismos esperados.

7.4 Inoculación

Las muestras se inoculan de acuerdo al siguiente procedimiento:

7.4.1 Inocular 5 tubos de fermentación con medio A-1 concentración doble, con 10 ml de la muestra.

7.4.2 Inocular 5 tubos de fermentación con medio A-1 concentración simple, con 1 ml de la muestra.

7.4.3 Inocular 5 tubos de fermentación con medio A-1 concentración simple, con 1 ml de la dilución 1:10 (10^{-1}) de la muestra.

7.4.4 Inocular 5 tubos de fermentación con medio A-1 concentración simple, con 1 ml de la dilución 1:100 (10^{-2}) de la muestra.

7.4.5 Así sucesivamente se inocula de acuerdo con la cantidad de gérmenes esperados.

7.5 Incubación

Los tubos inoculados deben ser agitados suavemente para mezclar la muestra con el medio de cultivo.

7.5.1 Incubar los tubos inoculados en estufa a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ por 3 h.

7.5.2 Retirar los tubos de la estufa y sumergirlos en el baño termostático a $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$, de tal forma que el nivel de agua del baño sea superior al nivel del medio en el tubo, e incubar por $21\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

7.5.3 Junto con la incubación de las muestras llevar un control positivo *E. coli* y un control negativo *Enterobacter aerogenes*.

7.5.4 Después de terminado el período de incubación registrar los tubos que presentan alguna formación de gas y enturbiamiento, dentro de $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, como reacción positiva para coliformes de origen fecal.

8 Expresión de resultados

8.1 El número más probable, NMP, se obtiene de la tabla N°2 que se incluye en anexo B de esta norma. Las cantidades inoculadas están señaladas y sólo indican la dilución decimal, no necesariamente son indicativas de los volúmenes sembrados.

8.2 El número más probable para combinaciones que no aparecen en la tabla, o para otras combinaciones de tubos o diluciones, puede ser estimado por la siguiente fórmula:

$$NMP \cdot 100 \text{ ml} = \frac{\text{número tubos positivos} \cdot 100}{\sqrt{(\text{ml muestra tubos negativos}) \cdot (\text{ml muestra todos los tubos})}}$$

8.3 Cuando se emplean más de tres diluciones decimales, se debe usar el resultado de sólo tres de éstas para calcular el número más probable. Para seleccionar estas tres diluciones se debe elegir la dilución que dio resultados positivos en los cinco tubos y las siguientes dos diluciones más altas. Se deben usar los resultados de estos tres volúmenes para calcular el número más probable (ver ejemplo en anexo C de esta norma).

9 Informe

9.1 El informe del análisis debe contener la información siguiente:

- a) la identificación precisa de la muestra, incluyendo lugar, día, hora de muestreo y la fecha del análisis;
- b) los resultados obtenidos según se indica en cláusula 8 de esta norma;
- c) la referencia a esta norma;
- d) cualquier desviación del procedimiento especificado en esta norma o cualquier otra circunstancia que pueda afectar los resultados.

10 Bibliografía

- [1] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition.

Anexo A

Caracterización de aguas servidas domésticas

A.1 En la siguiente tabla se indican los valores característicos de un agua servida doméstica.

Tabla - Valores característicos de aguas servidas domésticas

Parámetro	Valor característico	
pH	6,0 a 8,0	
Temperatura	20	°C
Sólidos suspendidos	220	mg/L
Sólidos sedimentables	6	mg/L 1h
Aceites y grasas	60	mg/L
Hidrocarburos	10	mg/L
Arsénico	0,05	mg/L
Cadmio	0,01	mg/L
Cianuro	0,20	mg/L
Cobre	1	mg/L
Cromo total	0,1	mg/L
Cromo hexavalente	0,05	mg/L
Fósforo	5	mg/L
Mercurio	0,001	mg/L
Níquel	0,1	mg/L
Plomo	0,2	mg/L
Sulfatos (disueltos)	300	mg/L
Sulfuros	3	mg/L
Zinc	1	mg/L
Detergentes	10	mg/L
Triclorometano	0,1	mg/L
Compuestos fenólicos	0,05	mg/L

Anexo B

Tabla N° 2 - Tabla para el cálculo del número más probable

Combinación de tubos positivos	NMP/100 ml	Límite de confianza 95%		Combinación de tubos positivos	NMP/100 ml	Límite de confianza 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-	4-2-0	22	9,0	56
0-0-1	2	1,0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1,0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1,0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
1-0-0	2	1,0	10	5-0-0	23	9,0	86
1-0-1	4	1,0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2,0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3,0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4,0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6,0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7,0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5,0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7,0	45	5-5-1	300	100	1 300
4-1-0	17	7,0	46	5-5-2	500	200	2 000
4-1-1	21	9,0	55	5-5-3	900	300	2 900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1 600	600	5 300
				5-5-5	≥ 1 600	-	-

Anexo C (Informativo)

Ejemplo de cálculo de número más probable

C.1 En el siguiente ejemplo, el numerador representa los tubos positivos y el denominador el total de tubos sembrados.

Ejemplo	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	0,001 ml	Combinación de positivos
(a)	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0
(b)	5/5	4/5	2/5	0/5	5-4-2
(c)	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0

C.2 En el ejemplo (c), se eligen las tres primeras diluciones de tal forma de incluir el resultado positivo en la dilución.

C.3 En otras oportunidades hay que corregir como se muestra en (d). Cuando aparecen resultados positivos en diluciones más altas que las tres elegidas, tal como en e).

Ejemplo	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	0,001 ml	Combinación de positivos
(d)	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-2
(e)	5/5	3/5	2/5	0/5	5-3-2

