



NORMA MEXICANA

NMX-AA-007-SCFI-2013

**ANÁLISIS DE AGUA – MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA
EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES
TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA LA NMX-AA-007-SCFI-2000)**

**WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF TEMPERATURE IN
NATURAL WATERS, WASTEWATERS AND TREATED
WASTEWATERS – TEST METHOD**



PREFACIO

En la elaboración de la presente norma mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN AMBIENTAL
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- FASIQ INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- INDEX-LAB
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.



- LABORATORIO DE SERVICIOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO SERVICIOS AMBIENTALES
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, I.P.D.
Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Ciencia y Tecnología Ambiental
Depto. Biotecnología
- UNIDAD AZCAPOTZALCO
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Depto. de Ciencias Básicas
Área de Química



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos

- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Ingeniería

**ÍNDICE DEL CONTENIDO**

Número del Capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	2
2	REFERENCIAS	3
3	DEFINICIONES	3
4	PRINCIPIO	6
5	REACTIVOS Y PATRONES	6
6	MATERIALES	7
7	EQUIPO	7
8	RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	7
9	CONTROL DE CALIDAD	8
10	VERIFICACIÓN DE LOS TERMÓMETROS.	9
11	PROCEDIMIENTO	10
12	CÁLCULOS	11
13	INFORME DE LA PRUEBA	11
14	INTERFERENCIAS	12
15	SEGURIDAD	13
16	MANEJO DE RESIDUOS	14
17	VIGENCIA	14
18	BIBLIOGRAFÍA	14
19	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	16
	APÉNDICE INFORMATIVO A	17



NORMA MEXICANA

NMX-AA-007-SCFI-2013

ANÁLISIS DE AGUA – MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA LA NMX-AA-007-SCFI-2000)

WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF TEMPERATURE IN NATURAL WATERS, WASTEWATERS AND TREATED WASTEWATERS – TEST METHOD

0 INTRODUCCIÓN

La temperatura termodinámica, también denominada temperatura absoluta, es una de las magnitudes fundamentales que definen el Sistema Internacional de Unidades (SI) y cuya unidad es el kelvin, simbolizado como K. Esta unidad se utiliza tanto para expresar valores de temperatura termodinámica como intervalos de temperatura.

Por acuerdo del Comité Internacional de Pesas y Medidas en 1989, la Escala Internacional de Temperatura (ITS-90) se define operacionalmente en términos de técnicas de medición por termometría de presión de vapor, termometría de gas, termometría con resistencia de platino y pirometría óptica.

Es usual expresar la temperatura con base en la escala Celsius ($^{\circ}\text{C}$), definida con relación a la temperatura termodinámica por:

$$t (\text{ }^{\circ}\text{Celsius}) = T (\text{kelvin}) - 273,15 \text{ K}$$

La Dirección General de Normas de la Secretaría de Economía aprobó la presente norma, cuya declaratoria de vigencia fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el: jueves 23 de enero de 2014.



El grado Celsius es una unidad de temperatura de magnitud idéntica al kelvin. Sobre la escala Celsius, la temperatura de fusión del agua pura a la presión de 101,325 kPa, es igual a 0 °C y la ebullición del agua, a la misma presión, es igual a 100 °C.

El método de prueba normado establece el procedimiento para realizar la medición en el sitio donde se encuentra el agua, y el resultado se expresa en grados Celsius (°C).

Las temperaturas elevadas en el agua pueden ser indicadores de actividad biológica, química y física, lo anterior tiene influencia en los tratamientos y abastecimientos para el agua, así como en la evaluación limnológica de un cuerpo de agua, por lo que es necesario medir la temperatura como un indicador de la presencia de compuestos y contaminantes, a través del método de prueba que se establece en la presente norma mexicana.

El valor de temperatura es un criterio de calidad del agua para la protección de la vida acuática y para las fuentes de abastecimiento de agua potable, es también un parámetro establecido como límite máximo permitido en las descargas de aguas residuales y una especificación de importancia en los cálculos de balance de energía y de calor de los procesos industriales.

Para la aplicación de la presente norma mexicana es indispensable contar con un instrumento de medición con trazabilidad demostrable al sistema internacional de unidades.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método de prueba para la medición de la temperatura, cuando se usan instrumentos de medición directa o instrumentos que indican expansiones o fuerzas proporcionales en los cambios de temperatura, en aguas naturales crudas no salinas (epicontinentales, subterráneas y pluviales), en aguas salinas (marinas, costeras, de estuarios, esteros, marismas y subterráneas), aguas residuales crudas municipales e industriales y aguas residuales tratadas municipales e industriales en el intervalo comprendido entre 0 °C y 45 °C.



Para su uso doméstico, como fuente de abastecimiento de agua potable, público urbano, recreativo con y sin contacto directo, riego agrícola, pecuario, acuacultura, industrial y protección de la vida acuática marina y de agua dulce y descarga en cuerpos receptores y alcantarillado municipal o reúso. Es de aplicación nacional.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma mexicana se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

NMX-AA-089/1-SCFI-2010	Protección al ambiente - calidad del agua - vocabulario - parte 1. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 03 de marzo de 2011.
NMX-AA-089/2-1992	Protección al ambiente - calidad del agua - vocabulario - parte 2. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de marzo de 1992.
NMX-AA-115-SCFI-2001	Análisis de agua - Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma mexicana, aplican los términos y definiciones contenidos en las normas mexicanas NMX-AA-089/1-SCFI-2010 y NMX-AA-089/2-1992 (véase 2 Referencias) y se establecen las siguientes:

3.1 Calibración:

El conjunto de operaciones que tiene por finalidad determinar los errores de un instrumento para medir y, de ser necesario, otras características metrológicas.



3.2 Escala Internacional de Temperatura 1990 (ITS-90):

Es la escala de temperatura adoptada por el Comité Internacional sobre Pesas y Medidas en 1989, que se define operacionalmente en términos de técnicas termométricas aplicables en intervalos definidos de temperatura.

3.3 Grado Celsius:

Es la unidad de la escala de temperatura definida por el punto del hielo fundente al que se le atribuye el valor de cero grados (0 °C) y el de ebullición del agua al que se le atribuye el valor cien grados (100 °C), ambos puntos determinados a la presión de 101,325 kPa.

3.4 Grado Fahrenheit:

Es la unidad de la escala de temperatura utilizada comúnmente en Estados Unidos de Norte América. Para esta escala, se atribuye el valor de 32 °F al punto del hielo fundente y el valor de 212 °F al de ebullición del agua, ambos puntos determinados a la presión de 101,325 kPa. La relación entre la temperatura expresada en grado Fahrenheit y en grado Celsius es: t (Fahrenheit) = $(9/5) t$ (Celsius) + 32.

3.5 kelvin:

Es la unidad de la escala de temperatura del Sistema Internacional de Unidades cuyo símbolo es K. La escala de temperatura kelvin se define por asignación del valor igual a 273,16 K a la temperatura del punto triple del agua.

3.6 Instrumentos o termómetros que indican expansiones o fuerzas proporcionales en los cambios de temperatura:

Las expansiones o fuerzas proporcionales a los cambios de temperatura, dentro de la gama de construcción y calibración del instrumento, son registradas por sistemas amplificadores mecánicos, eléctricos, electrónicos o combinación de ellos, para obtener las lecturas de temperatura.

3.7 Temperatura:

Potencial o grado calorífico referido a un cierto cuerpo.



3.8 Termómetro:

Instrumento que usualmente se pone en contacto con la sustancia cuya temperatura desea conocerse hasta que se alcance el equilibrio térmico. Dicho dispositivo, cuando está correctamente calibrado, permite obtener indirectamente el valor de temperatura, midiendo el cambio de alguna propiedad de un constituyente del mismo termómetro que varía monotónicamente con la temperatura.

3.9 Termómetro de inmersión completa:

Termómetro de líquido en vidrio, diseñado para indicar valores correctos de temperatura cuando el cuerpo completo del termómetro está sumergido en el líquido que se examina.

3.10 Termómetro de inmersión parcial:

Termómetro de líquido en vidrio, diseñado para indicar valores correctos de temperatura cuando el bulbo y una porción definida del vástago están expuestos a la temperatura por medir. El nivel de inmersión que debe coincidir con la superficie libre del cuerpo líquido está indicado por una marca sobre el vástago del termómetro. La porción remanente del vástago se encuentra usualmente expuesta al aire.

3.11 Termómetro de inmersión total:

Termómetro de líquido en vidrio, diseñado para indicar valores correctos de temperatura cuando el bulbo y la porción del vástago que contiene el líquido están expuestos a la temperatura por medir. La profundidad de inmersión del termómetro debe ajustarse de forma que el nivel superior del líquido del termómetro coincida con la superficie libre del líquido que se examina.

3.12 Termómetro de vidrio con columna de mercurio:

Termómetro que se basa en la dilatación del mercurio líquido para indicar la temperatura. Consta básicamente de un bulbo de vidrio que contiene el mercurio, soldado a un tubo capilar de vidrio de diámetro uniforme, graduado y sellado en su otra extremidad.



3.13 Termómetro de resistencia de platino:

Termómetro que se basa en la variación de la resistencia de un sensor, constituido por un hilo de platino, en función de la temperatura.

3.14 Termómetro de termistor:

Termómetro que se basa en la medición de la variación de resistencia de un sensor, constituido por un elemento semiconductor, en función de la temperatura. El termistor se utiliza en el intervalo de temperatura en el que la resistencia del elemento semiconductor disminuye monotónicamente cuando la temperatura se incrementa.

3.15 Termómetro de termopar:

Termómetro que se basa en el cambio de la diferencia de potencial que se establece en un termoelemento constituido por la soldadura entre dos metales o aleaciones metálicas diferentes cuando cambia la temperatura de la soldadura. El termopar se constituye por la asociación de dos termoelementos cuyas soldaduras se encuentran a temperaturas distintas.

4 PRINCIPIO

El principio se basa en las propiedades de los materiales de dilatarse o contraerse con los cambios de temperatura o en las propiedades eléctricas de los mismos con los que se realizará la medición; estas propiedades son siempre las mismas para una temperatura dada, lo que permite graduar los instrumentos de medición.

5 REACTIVOS Y PATRONES

- 5.1** Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características: a) Conductividad; 5,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ máximo a 25 °C y b) pH: 5,0 a 8,0.

6 MATERIALES

6.1 Son válidos para el uso propuesto de esta norma los siguientes dispositivos, siempre y cuando se encuentren calibrados o verificados contra un termómetro calibrado.

6.1.1 Termómetro o juego de termómetros de líquido en vidrio, con graduación de al menos $1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para cubrir el intervalo de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $101\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.2 Termómetro con sensor de termistor, con una resolución de lectura de al menos $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, para cubrir el intervalo de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $101\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.3 Termopar, con una resolución de lectura de al menos $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, para cubrir el intervalo de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $101\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.4 Termómetro con resistencia de Pt, con una resolución de lectura de al menos $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, para cubrir el intervalo de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $101\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 Envases de polietileno o de vidrio limpios.

6.3 Vasos térmicos de doble pared, provistos de su respectiva tapa.

7 EQUIPO

7.1 En el caso de que el Laboratorio efectúe la verificación de sus termómetros se requiere un baño maría con control de temperatura ajustable por lo menos entre $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8 RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

8.1 Para esta medición no se requiere preparación ni conservación de las muestras.

- 8.2** Las determinaciones de temperatura deben efectuarse de inmediato en el lugar de muestreo.
- 8.3** Cuando sea preciso extraer una muestra, se toma un volumen aproximado de 1 L para termómetros de inmersión parcial en un envase de polietileno, de vidrio limpio o de doble pared y aproximado de 500 mL para Termopar u otro instrumento, en un envase de polietileno, de vidrio limpio o de doble pared; se determina la temperatura de inmediato.
- 8.4** Si la temperatura del cuerpo de agua o de la descarga es apreciablemente mayor o menor que la del ambiente (diferencia de temperatura superior a 5 °C), se recomienda extraer la muestra mediante un recipiente de muestreo y colocarlo posteriormente en un recipiente de doble pared, colocar la tapa y medir de inmediato la temperatura.

9 CONTROL DE CALIDAD

- 9.1** Cada laboratorio que utilice este método debe operar un programa de control de calidad en referencia a la norma NMX-AA-115-SCFI-2001 (véase 2 Referencias).
- 9.2** Es obligatorio para el laboratorio mantener los siguientes registros:
- 9.2.1** Los nombres y títulos de los analistas o muestreadores que ejecutaron los análisis y el encargado de control de calidad que verificó los análisis.
- 9.2.2** Las bitácoras o registros de los muestreadores o del analista en los que se contengan los siguientes datos:
- a) Identificación de la muestra;
 - b) fecha del análisis y
 - c) trazabilidad de la medición.



De tal forma que permita a un evaluador externo reconstruir cada medición mediante el seguimiento de la información desde la recepción de la muestra hasta el resultado final.

10 VERIFICACIÓN DE LOS TERMÓMETROS

10.1 La trazabilidad de los valores de temperatura reportados por quien aplique esta norma mexicana, con la Escala Internacional de Temperatura, se obtiene con el empleo de termómetros de uso rutinario, calibrados o verificados por comparación de lecturas con termómetros calibrados con trazabilidad demostrable al sistema internacional de unidades, y por aplicación de las correcciones, obtenidas de la calibración, a los valores de lecturas de las temperaturas obtenidas en las pruebas.

10.2 Verificación de los termómetros de uso rutinario

10.2.1 Esta verificación se efectúa por comparación de las lecturas del termómetro que se verifica con las de un termómetro calibrado, ambos termómetros se sumergen juntos en un mismo baño maría o en un mismo equipo comercial para calibración de termómetros. La verificación del termómetro se realiza a partir de una temperatura de 10 °C, en una serie de puntos espaciados dentro del intervalo del termómetro a verificar.

10.2.2 Ajustar la temperatura del baño maría por debajo de la primera temperatura por verificar. Introducir el (los) termómetro(s) por verificar en el baño maría, junto al termómetro calibrado de forma que los bulbos se sitúen en el mismo nivel de profundidad.

10.2.3 Actuar sobre el ajuste de temperatura del baño maría de forma que la temperatura se incremente lentamente a velocidad uniforme a medida que se acerque al punto de verificación. En la vecindad inmediata del punto de verificación, la velocidad de incremento de temperatura debe ser menor que una graduación en 5 min.

10.2.4 En el punto de verificación, registrar las lecturas de temperatura del (los) termómetro(s) por verificar y del termómetro calibrado. En caso de ser necesario, anotar la altura de columna emergente



de los termómetros de inmersión total para calcular las correcciones de lectura correspondientes.

10.2.5 Aumentar la velocidad de incremento de temperatura del baño maría hasta acercarse al punto de verificación siguiente y repetir 10.2.3 y 10.2.4.

10.2.6 Repetir 10.2.5 hasta alcanzar la temperatura de 45 °C.

10.3 Frecuencia de control de verificación de los termómetros.

10.3.1 Con periodicidad mínima anual, el laboratorio debe efectuar una verificación interna de los termómetros de uso rutinario.

10.3.2 El laboratorio debe establecer la frecuencia de control de calibración de su termómetro calibrado.

11 PROCEDIMIENTO

Siempre que sea posible se debe realizar la medición directamente en el cuerpo de agua, en caso de que esto no sea posible, extraer una porción de la muestra como se indica en el inciso 8.3. Esperar el tiempo suficiente para obtener mediciones constantes¹. Enjuagar con agua destilada el instrumento de medición.

Las lecturas se obtienen directamente de la escala del aparato medidor de temperatura, y se informan en grados Celsius (°C).

En el caso de aguas residuales, de ser posible todas las lecturas deben hacerse en las descargas o bien recolectar la muestra y realizar la medición. En caso de que no sea posible, ésta puede medirse en un punto accesible del conducto más próximo a la descarga.

11.1 Medir directamente la temperatura del agua, en caso de requerir extraer muestra, introducir el recipiente para muestreo, moverlo de manera circular durante 1 min para que se equilibre su temperatura con la del agua y retirar el recipiente con la muestra.

¹ Considerar las características del instrumento, existen en el mercado los de inmersión parcial o total. El vástago debe estar separado al menos 2 cm de las paredes del recipiente.

11.2 Sumergir inmediatamente el termómetro, en posición centrada en el recipiente, hasta la marca de inmersión parcial o hasta una graduación apropiada si el termómetro es de inmersión total. Aplicar ligeros movimientos circulares por lo menos durante 1 min hasta que la lectura del termómetro se estabilice. Si la temperatura de la muestra difiere en más de ± 5 °C de la del ambiente, repetir el muestreo a partir de 11.1 utilizando el vaso de doble pared. Si el termómetro es de sensor, éste debe sumergirse en el volumen mínimo de muestra y a la profundidad que recomienda el fabricante y las lecturas deben efectuarse después del tiempo de equilibrio recomendado en el manual del usuario.

11.3 Registrar la lectura y la altura de la columna emergente si el termómetro utilizado es de inmersión total.

11.4 Realizar por triplicado las operaciones 11.1 a 11.3.

12 CÁLCULOS

12.1 Calcular el promedio de las tres lecturas. Los resultados obtenidos se expresan redondeando al entero y en grados Celsius (°C).

13 INFORME DE LA PRUEBA

En el informe de la prueba se deben incluir los siguientes datos:

13.1 Identificación completa de la muestra;

13.2 Referencia de este método;

13.3 La lectura de temperatura obtenida, en °C, y

13.4 Fecha del análisis.

14 INTERFERENCIAS

14.1 Precauciones y recomendaciones relativas al uso de los termómetros de líquido en vidrio.

14.1.1 Error de paralaje: El error de paralaje puede eliminarse si se tiene cuidado en que la escala graduada del termómetro pueda observarse por reflexión sobre la columna del líquido dentro del capilar. Para ello, el observador ajusta el nivel de su ojo sobre una línea de lectura, de forma que la graduación más cercana del menisco se superponga exactamente a su propia imagen reflejada por el líquido. Si se desea efectuar lecturas muy precisas, también debe tomarse en cuenta que las líneas de la escala graduada tienen un cierto espesor y lo más apropiado es considerar la posición de las líneas definidas por su parte central. El uso de lupas especiales para termómetros disponibles comercialmente, puede facilitar la lectura de la temperatura sobre la escala graduada.

14.1.2 Durante el transporte de los termómetros, puede ocurrir una ruptura de la columna del líquido en el capilar o aún el paso del gas de relleno hacia el bulbo. Este tipo de problema debe detectarse y eliminarse antes de utilizar el termómetro. Para ello se verifica por inspección visual que no existen burbujas de gas encerradas en el bulbo y que no se detectan rupturas de la columna de líquido en el vástago del termómetro o gotas del líquido adheridas en la parte superior del capilar. Verificar también que el bulbo se encuentra en perfecto estado. Si se detecta alguno de los problemas antes mencionados, frecuentemente se puede remediar siguiendo las indicaciones que se dan en el Apéndice Informativo A.

14.1.3 Cuando no se utilizan, los termómetros se conservan en un estuche apropiado en posición vertical y en lugares no sometidos a vibraciones o sacudidas como en los cajones que se abren y cierran con frecuencia.

14.1.4 Existe a menudo cierta adherencia del mercurio sobre el vidrio que puede falsear la lectura de temperatura cuando el equilibrio se alcanza con una "columna descendente". Este problema es más notorio cuando el diámetro del capilar es menor que 0,1 mm. Para

evitar este problema, antes de efectuar la lectura, se recomienda dar un golpe ligero con la uña del dedo sobre el vástago del termómetro, cerca de la posición de lectura. Otra forma de evitar este problema consiste en alcanzar el equilibrio de temperatura con un termómetro colocado a una temperatura inicial inferior a la del cuerpo de agua por medir (columna ascendente).

- 14.1.5** Si se observa adherencia de mercurio dentro del capilar, que forme una capa o que queden gotitas de mercurio que no puedan eliminarse por el procedimiento indicado en el inciso anterior, ello es indicativo de una oxidación del mercurio y el termómetro debe descartarse.
- 14.1.6** Cuando se efectúan lecturas de temperatura en medios transparentes bajo iluminación obtenida con un foco de tungsteno, el calor irradiado puede causar errores en el valor de la temperatura medida y también puede invalidar cualquier corrección de lectura de temperatura por efecto de columna emergente.
- 14.1.7** Las lecturas de temperatura deben efectuarse después de que el termómetro esté en equilibrio de temperatura con el medio. En general, se puede considerar que con termómetros de mercurio en vidrio, un tiempo de 1-2 min después de sumergir el termómetro es generalmente suficiente para efectuar lecturas en condiciones de equilibrio de temperatura.
- 14.1.8** En aguas subterráneas y de pozos a profundidades mayores a 200 metros, puede ocurrir una variación en la medición, debido a la diferencia de temperaturas entre el medio y el artefacto muestreador, asegurar que el artefacto muestreador se equilibre con la temperatura del agua a muestrear.

15 SEGURIDAD

- 15.1** Esta norma no especifica todas las normas de seguridad que deben observarse durante su aplicación. Es responsabilidad del usuario observar las reglas generales y particulares de higiene y seguridad aplicables a las operaciones de muestreo y al manejo de materiales especificados en esta norma.



- 15.2** Los termómetros de mercurio en vidrio son frágiles. En caso de ruptura, deben tomarse las medidas oportunas para evitar la contaminación del ambiente con el mercurio que pudiera derramarse.
- 15.3** Cuando se trate de aguas residuales se debe usar el equipo de protección adecuado: ropa de algodón, guantes adecuados para el tipo de descarga, lentes de seguridad, mascarillas y zapatos de seguridad.
- 15.4** Cuando se emplean termómetros de líquido en vidrio, siempre deben de usarse y almacenarse en forma vertical para evitar la disgregación del líquido de llenado.

16 MANEJO DE RESIDUOS

En la prueba realizada en campo, después de efectuar la medición, la muestra que se haya tomado se regresa al cuerpo de agua muestreado.

17 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrará en vigor 60 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el **Diario Oficial de la Federación**.

18 BIBLIOGRAFÍA

- NOM-001-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997 (ACUERDO por el cual se reforma la nomenclatura de las normas oficiales mexicanas expedidas por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, así como la ratificación de las mismas previa a su revisión quinquenal, publicado en Diario Oficial de la Federación el 23 de abril de 2003).



- NOM-008-SCFI-2002 Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.
- NOM-011-SCFI-2004 Instrumentos de medición - Termómetros de líquido en vidrio para uso general – Especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de octubre de 2004.
- NMX-AA-093-SCFI-2000 Análisis de agua - Determinación de la conductividad electrolítica – Método de prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de diciembre de 2000.
- NMX-AA-116-SCFI-2001 Análisis de agua - Guía de solicitud para la presentación de métodos alternos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.
- ASTM Designation E 1 Specification for ASTM Thermometers, American Society for Testing and Materials, Part 14.03, 1995.
- ASTM Designation E-77 Standard Test Methods for Inspection and Verification of Liquid-in-Glass Thermometers, American Society for Testing and Materials, Part. 14.03, 1995.
- ASTM Designation E 344 Terminology Relating to Thermometry and Hygrometry. American Society for Testing and Materials.
- ASTM Designation E 563 Standard Practice for Preparation and Use of Freezing Point Reference Bath. American Society for Testing and Materials.
- Método 170.1 Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes, EPA-600/4-79-020 Revised 1983.15.9 Acuerdo por el que se Establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89, Diario Oficial de la Federación, 13 de diciembre de 1989.
- Method 2550 Temperature - en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, DC 20005, 19th Edition., 1995.



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

NMX-AA-007-SCFI-2013
16/18

- M.L. McGlashan, Physico-Chemical Quantities and Units, Royal Institute of Chemistry, 2nd Ed. 1971.
- R.N. Goldberg, R.D. Weir, Conversions of Temperatures and Thermodynamic Properties to the Basis of the International Temperature Scales of 1990, Pure & Appl. Chem., 64 (1992) 1545.

19 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no coincide con ninguna norma internacional por no existir norma internacional sobre el tema tratado.

APÉNDICE INFORMATIVO A

PROCEDIMIENTO PARA ELIMINAR BURBUJAS

A.1 Procedimiento para eliminar burbujas del bulbo o para unir la columna del líquido seccionada en el capilar de un termómetro de líquido en vidrio.

A.1.1 Cuando se observa la existencia de burbujas en el bulbo o la ruptura de la columna de líquido en el capilar, a menudo pueden eliminarse estos problemas mediante enfriamiento suficiente del bulbo hasta que la totalidad del líquido se encuentre reunida en él. Efectuar esta operación observando las siguientes precauciones:

Preparar una mezcla refrigerante en un vaso de doble pared, de boca ancha, de capacidad que no requiere ser mayor que 350 mL, colocando 250 mL de acetona grado técnico e introduciendo cuidadosamente trozos de hielo seco hasta que disminuya suficientemente la temperatura de la acetona. Manteniendo el termómetro en posición vertical, introducir parcialmente el bulbo en la mezcla refrigerante y evitar el enfriamiento del vástago para que no existan riegos de solidificación del líquido contenido en el capilar. Si el termómetro contiene mercurio, evitar que se solidifique en el bulbo. Durante el enfriamiento, dar pequeños golpes con la uña del dedo sobre el vástago para facilitar el desalojo de la burbuja. Dejar finalmente que el termómetro alcance nuevamente la temperatura ambiente manteniéndolo en posición vertical. Verificar que el tratamiento da un resultado satisfactorio.

A.1.2 Si sólo se presenta una ruptura de la columna de líquido en el capilar, pueden aplicarse varios tratamientos.

A.1.2.1 Si la ruptura se sitúa cerca del límite superior de la columna de líquido y si el capilar del termómetro tiene una pequeña cámara de expansión arriba del límite superior de la escala graduada, el líquido puede unirse por calentamiento progresivo y cuidadoso del

bulbo sumergido en un baño de aceite apropiado, hasta que la burbuja de gas alcance dicha cámara. Para facilitar la unión de las porciones de líquido, se pueden dar golpecitos con la uña del dedo sobre el vástago del termómetro. Cuando las porciones de líquido se reúnen, se retira el bulbo del baño de aceite y se deja enfriar lentamente el termómetro manteniéndolo en posición vertical. Se verifica que el tratamiento da el resultado esperado. Puesto que en este tratamiento, el calentamiento del bulbo rebasa la temperatura del límite superior de la escala de lectura del termómetro, es preciso dejar éste en reposo a la temperatura ambiente por lo menos durante 72 h. (Este método no debe aplicarse a termómetros que indican temperaturas superiores a 250 °C debido a la alta presión del gas que se genera en el capilar que puede romper el bulbo o provocar su deformación permanente).

- A.1.2.2** Los termómetros que tienen una cámara de contracción situada entre el bulbo y el inicio de la escala graduada pueden presentar separación bien sea en la cámara o en la porción de capilar situada inmediatamente arriba de la cámara. A menudo es posible eliminar la separación reuniendo el mercurio en la cámara de contracción por enfriamiento del bulbo.

México, D.F., a 23 de enero de 2014.

**EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS
LIC. ALBERTO ULISES ESTEBAN MARINA**



NORMA MEXICANA

NMX-AA-008-SCFI-2016

ANÁLISIS DE AGUA.- MEDICIÓN DEL pH EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS.- MÉTODO DE PRUEBA- (CANCELA A LA NMX-AA-008- SCFI-2011).

WATER ANALYSIS.-MEASUREMENT OF pH IN NATURAL
WATERS, WASTEWATERS AND TREATED WASTEWATERS.-
TEST METHOD



PREFACIO

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENTRO DE SERVICIOS QUÍMICOS
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- CESAR CLEMENTE ALVARADO GARCÍA
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- EQUIPOS PARA DIAGNÓSTICO ANALÍTICO, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- IDECA, S.A. DE C.V.
- INDEX-LAB
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO



- INTERTEK TESTING SERVICES DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE SERVICIOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS, S.A. DE C.V.
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO Y ASESORÍA EN CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN, S.A. DE C.V.
- MAS INSTRUMENTOS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- ORGANISMO PÚBLICO DESCENTRALIZADO PARA LA PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE AGUA POTABLE, ALCANTARILLADO Y SANEAMIENTO DEL MUNICIPIO DE TLALNEPANTLA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX ETILENO COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PERKIN ELMER DE MÉXICO, S.A.
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, I.P.D.
Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- SERVICIOS ESPECIALIZADOS Y PRODUCTOS PARA TRATAMIENTO DE AGUAS, S.A. DE C.V.



- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
- SISTEMAS DE INGENIERÍA AMBIENTAL, S.A. DE C.V.
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD AZCAPOTZALCO
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Depto. de Ciencias Básicas
Área de Química
- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Ingeniería



ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	2
2	REFERENCIAS	2
3	DEFINICIONES	2
4	PRINCIPIO	3
5	INTERFERENCIAS	4
6	REACTIVOS Y PATRONES	5
7	EQUIPO	6
8	MUESTREO	7
9	PROCEDIMIENTO	8
10	EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS	11
11	CONTROL DE CALIDAD	11
12	INFORME DE ENSAYO	12
13	VIGENCIA	12
14	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	12
	APÉNDICE A (INFORMATIVO)	15
	VALORES DE PH DE LOS PATRONES DE TRABAJO	15
15	BIBLIOGRAFÍA	15



NORMA MEXICANA

NMX-AA-008-SCFI-2016

ANÁLISIS DE AGUA.- MEDICIÓN DEL pH EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS.- MÉTODO DE PRUEBA- (CANCELA A LA NMX-AA-008-SCFI-2011).

WATER ANALYSIS.-MEASUREMENT OF pH IN NATURAL WATERS, WASTEWATERS AND TREATED WASTEWATERS.- TEST METHOD

0 INTRODUCCIÓN

La medición del pH del agua es muy importante para muchos tipos de muestra. Los valores altos y bajos de pH son tóxicos para organismos acuáticos, ya sea directa o indirectamente. Es el parámetro más importante utilizado en la evaluación de las propiedades corrosivas de un medio ambiente acuático. Asimismo, es importante para el funcionamiento efectivo de los procesos de tratamiento de aguas y su control (por ejemplo, floculación y desinfección con cloro), el control de disolución de metales en canales y conductos y tratamiento biológico de aguas residuales y los vertidos de aguas residuales.

Los métodos electrométricos están basados en la medición de la diferencia de potencial de una celda electroquímica, la cual consta de dos medias celdas, la primera consiste en un electrodo de medición y la segunda en un electrodo de referencia. El potencial del electrodo de medición es una función de la actividad del ion hidrógeno de la disolución de medición.

La Dirección General de Normas de la Secretaría de Economía aprobó la presente norma, cuya declaratoria de vigencia fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el:

SINEC-20160705110503214

ICS: 13.060.45

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana es de aplicación nacional y establece el método de prueba para la medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, en el intervalo de pH 0 a pH 14 y en un intervalo de temperatura de 0 °C a 50 °C.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes, o las que las sustituyan:

- | | |
|------------------------|--|
| NMX-AA-089/1-SCFI-2010 | Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario - Parte 1 (Cancela a la NMX-AA-089/1-1986). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 03 de marzo de 2011. |
| NMX-AA-089/2-SCFI-2010 | Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario - Parte 2. (Cancela a la NMX-AA-089/2-1992). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de agosto de 2013. |
| NMX-AA-115-SCFI-2015 | Análisis de agua – Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos (Cancela a la NMX-AA-115-SCFI-2001). Declaratoria de Vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de octubre de 2015. |

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma mexicana, aplican los términos y definiciones contenidos en las normas mexicanas NMX-AA-089/1-SCFI y NMX-AA-089/2-SCFI (véase 2 Referencias) y se establecen las siguientes:

3.1 pH:

El pH se define en términos de la actividad relativa de los iones de hidrógeno en la disolución:

$$pH = -\log a_H = -\log(m_H \gamma_H / m^0)$$

Donde a_H es la actividad relativa del ión hidrógeno (en base molal); γ_H es el coeficiente de actividad molal del ión hidrógeno H^+ a la molalidad m_H , y m^0 es la molalidad estándar. La magnitud pH es considerada como una medida de la actividad de los iones hidrógeno en la disolución.

3.2 Patrón de referencia:

Patrón, en general de la más alta calidad metrológica (con certificado de trazabilidad) disponible en un lugar dado, o en una organización determinada, del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar.

3.3 Patrón de trabajo:

Patrón que es usado rutinariamente para verificar o controlar las medidas materializadas, instrumentos de medición o los materiales de referencia.

Otros términos aplicables a este concepto en el contexto de la verificación son "patrón de verificación" y "muestra control".

3.4 pHmetro:

Entiéndase equipo medidor de pH.

4 PRINCIPIO

La medición del valor de pH está basada en la diferencia de potencial de una celda electroquímica empleando un pHmetro adecuado.

El valor de pH de una medición depende de la temperatura debido al equilibrio de disociación. Por lo tanto, la temperatura de la muestra siempre debe ser reportada en conjunto con el pH de la muestra.

En caso de utilizar equipo con compensador de temperatura, no se requiere reportar la temperatura para cada lectura realizada, simplemente se debe mencionar de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 10 de esta norma.

5 INTERFERENCIAS

5.1 La temperatura, algunos gases y materiales orgánicos interfieren con la medición de pH. Materiales suspendidos en la muestra pueden provocar errores significativos (efecto de suspensión). Esperar la sedimentación y sumergir los electrodos en la fracción clara. Cuando se hace la medición en aguas residuales y en aguas superficiales, hay un alto riesgo de manchar los electrodos o de contaminación de las membranas y los diafragmas con aceite, grasa u otros contaminantes. Lavar inmediatamente después de la medición con HCl 1:1 o disolución de limpieza. Cuando sea posible eliminar la mayor cantidad de grasa de la superficie.

5.2 Las desviaciones en las mediciones son causadas por variaciones en las lecturas de pH, especialmente en la membrana, el diafragma y la medición de disolución y los resultados de mediciones incorrectas. Estas desviaciones son más bajas si las calibraciones y mediciones son llevadas a cabo bajo condiciones similares (ejemplo temperatura).

5.3 El envejecimiento y sedimentación (recubrimientos) en la membrana (ejemplo carbonato de calcio, hidróxidos de metales, aceites, grasas) del electrodo de medición induce una aparente disminución de la pendiente obtenida de las lecturas en el electrodo de pH, tiempos de respuesta largos o la presencia de sensibilidades cruzadas entre aniones y cationes.

5.4 Las sedimentaciones (recubrimientos) o precipitaciones en el o sobre el diafragma (ejemplo cloruro de plata, sulfuro de plata y proteínas) interfieren con el contacto eléctrico para la disolución de medición.

Ambas interferencias 5.3 y 5.4, pueden ser eliminadas, si se emplea el siguiente procedimiento: Sumergir el electrodo de pH en una disolución 0,1 M de ácido clorhídrico (HCl) o 0,1 M de HNO₃, durante 20 minutos. Enjuagar con agua corriente antes de usar.

5.5 Especialmente en aguas con baja conductividad, se puede presentar una alta variabilidad de las lecturas. Los efectos de agitación y efectos de memoria (retrodifusión de la disolución de medición dentro del electrodo de referencia) podrían causar desviaciones en las mediciones. En estos casos se pueden utilizar electrodos especiales de pH (ejemplo con un

diafragma sólido o con un puente interno con una disolución de AgCl-disolución de referencia libre de electrolitos).

5.6 La liberación de gases en los alrededores del electrodo de pH, puede causar interferencias adicionales y entonces tener un cambio en el valor de pH.

5.7 En las suspensiones, puede ocurrir una desviación en la medición. En este caso, dejar reposar la muestra en un recipiente completamente lleno y cerrado y posteriormente medir en el sobrenadante claro.

6 REACTIVOS Y PATRONES

Utilizar solamente reactivos de grado analítico, a menos que se indique lo contrario.

6.1 Agua destilada o desionizada.

Deberá entenderse agua que cumpla con las siguientes características: a) conductividad, 5,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 ° C máximo; b) pH: 5,0 a 8,0.

6.2 Patrón de referencia (Véase 3.2)

6.3 Patrón de trabajo (Véase 3.3)

Debe de ser de diferente lote y/o marca del utilizado como patrón de referencia, puede ser comercial o disolución de las mencionadas en el Apéndice A, es válido utilizar una disolución cuya caducidad ha vencido, mientras no supere los dos años posteriores a esta fecha y siempre y cuando cumpla con los criterios de aceptación y rechazo establecidos en el control de calidad del propio laboratorio.

6.4 Disoluciones amortiguadoras de pH de referencia

Utilizar las disoluciones B, C, D, F e I, que se encuentran en el Apéndice A (informativo), o disoluciones amortiguadoras de pH de referencia comerciales que no estén afectadas por el crecimiento de microorganismos. Si las disoluciones no se esterilizan son estables durante aproximadamente 6 semanas. El dióxido de carbono de la atmósfera afecta a disoluciones de pH con valores de pH de más de 4.

Cabe aclarar que los valores de pH asignados a estas disoluciones (Apéndice A) son nominales, no son trazables a las unidades del SI y de ningún modo reemplazan el uso de materiales de referencia certificados.

Para el caso de las disoluciones comerciales, la caducidad será la indicada por el fabricante.

6.5 Electrolitos para relleno de electrodos de referencia.

Usar la disolución de electrolito recomendada por el fabricante.

7 EQUIPO

7.1 Recipiente de muestreo

Utilizar un recipiente con capacidad mínima de 500 mL, fondo plano hecho con vidrio de baja alcalinidad, por ejemplo, vidrio de borosilicato, recipientes de plástico que puedan ser impermeables a los gases, o vasos térmicos de doble pared, provistos de su respectiva tapa.

7.2 Instrumento para la medición de la temperatura

7.2.1 Termómetro con resolución de al menos 1 °C

7.2.2 Sensor de temperatura

Independiente o integrado en el electrodo de pH.

7.3 pHmetro

Equipo electrónico para medición del pH; con una resolución de la lectura de pH de al menos 0,01 unidades.

NOTA: La compensación de la temperatura llevada a cabo por los pHmetros disponibles comercialmente, está basada en la ecuación de Nernst, es decir, depende de la temperatura y la pendiente teórica correspondiente de los electrodos, tomada en cuenta en la indicación del valor de pH. Sin embargo, esto no compensa la dependencia de la temperatura en el valor del pH de la disolución de medida.

7.4 Electrodo de vidrio y electrodo de referencia

Los electrodos convencionales están conformados por 2 medias celdas e involucran reacciones de óxido reducción; pueden ser de varios tipos.

Se describen los más comúnmente empleados para la medición del pH:

- Clase 0; Compuestos de metales inertes y celdas de óxido-reducción electrolítica
- Clase 1; Compuestos de un metal embebido en una solución electrolítica del mismo metal, por ejemplo Ag/Ag^+
- Clase 2; Compuestos de un metal embebido en una sal del mismo metal, por ejemplo $\text{Ag}/\text{AgX}/\text{X}^-$

El cuerpo del electrodo puede estar construido de diferentes materiales.

El valor práctico de la pendiente debe ser de al menos 95%, de la pendiente teórica, a menos que el fabricante del equipo especifique otro valor.

Por lo general los equipos cuentan con la función de intervalo permisible de la pendiente, el cual realiza el cálculo automáticamente, basta con seguir las instrucciones del fabricante para configurar el equipo adecuadamente.

En caso de que no se cuente con esta función, llevar a cabo el cálculo de la pendiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Almacenar los electrodos de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8 MUESTREO

El valor de pH puede cambiar rápidamente en la muestra de agua como resultado de procesos químicos, físicos o biológicos. Por esta razón, es recomendable medir el pH directamente del cuerpo de agua, si esto no es posible, tomar al menos 500 mL de muestra de agua en un recipiente de muestreo y medir sin exceder las 6 h después de la toma de muestra, cuando éste sea el caso señalar en el informe final de laboratorio el tiempo en que se midió el pH.

Cuando se está recolectando la muestra, evitar el intercambio de gases, ejemplo la liberación de dióxido de carbono entre las muestras y el aire del

ambiente. Llenar el recipiente completamente y taparlo adecuadamente evitando en la medida de lo posible la formación de burbujas.

Las muestras deberán mantenerse a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en la obscuridad o protegido de la luz solar, durante su transporte y almacenamiento.

NOTA: Usualmente, el muestreo y transporte son los principales factores de incertidumbre cuando se mide pH. Por lo tanto, los resultados de las mediciones in-situ, frecuentemente muestran una baja incertidumbre de la medición.

9 PROCEDIMIENTO

9.1 Preparación

9.1.1 Para asegurar la buena funcionalidad del electrodo de pH, se debe realizar el mantenimiento, limpieza y verificación periódica, de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a lo establecido por el propio laboratorio, todo lo anterior debe quedar documentado.

9.1.2 Atemperar las disoluciones patrón de referencia para la calibración y patrones de trabajo para la verificación (muestra control), que serán utilizadas, siempre que sea posible éstas no deberán variar en $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, de la muestra problema.

9.1.3 La selección de las disoluciones patrón de referencia indicadas en el párrafo anterior, estará en función del pH esperado en la muestra problema, lo cual se puede saber mediante un análisis rápido, por medio de una tira indicadora de pH, la cual se humedece con la muestra problema y con ayuda de la escala de colores provista por el fabricante de las tiras indicadoras, realiza una estimación del valor esperado de pH, esto es importante sobre todo cuando se realiza la calibración solo a dos puntos.

9.1.4 En caso de que el equipo cuente con compensador de temperatura, verifique que este se encuentre activado, en equipos que cuenten con intervalo permisible de la pendiente, asegúrese que esta sea de al menos 95% de la pendiente teórica, a menos que el fabricante del equipo especifique otro valor.

9.1.5 En caso de que el equipo no cuente con esta función, deberá realizar el cálculo de la pendiente una vez que se haya calibrado el equipo para asegurarse que cumpla con lo anterior.

9.1.6 Cuando se usa un electrodo de pH sin un sensor de temperatura interno, sumergir el sensor de temperatura o el termómetro en la disolución, al mismo tiempo, para todas las mediciones que se efectúen.

9.2 Calibración analítica

9.2.1 Lea cuidadosamente el manual del equipo, ya que parámetros como la compensación de temperatura, el reconocimiento automático de disoluciones patrón de calibración, estabilidad de las lecturas, intervalos permisibles de la pendiente, pueden influir adversamente en la calibración e incluso dar lugar a errores sistemáticos.

9.2.2 Calibrar el electrodo en el intervalo requerido, en función de la muestra problema que se desea medir, ya sea en 2 puntos usando disoluciones patrón de referencia o realizar la calibración en 3 puntos usando disoluciones patrón de referencia siguiendo instrucciones del fabricante, en ambos casos.

9.2.3 Registrar los valores iniciales obtenidos de la calibración, así como la temperatura a la cual se efectuó la medición, en caso de que no se realice con equipo con compensador de temperatura. El valor práctico de la pendiente debe ser de al menos 95% de la pendiente teórica, a menos que el fabricante del equipo especifique otro valor.

9.2.4 Una vez que la calibración se ha realizado de manera exitosa, esta se deberá comprobar, realizando al menos 3 lecturas de cada una de estas mismas disoluciones patrón de referencia. Llevando a cabo lecturas independientes consecutivas, de la misma alícuota, enjuagar el electrodo de pH con agua destilada o desionizada (véase 6.1), entre cada lectura. La medición no debe desviarse por más de $\pm 0,05$ unidades de pH del valor nominal del patrón de referencia usado y entre las lecturas independientes realizadas no deberá haber una diferencia mayor a 0,03 unidades de pH entre ellas, registrar para cada lectura de pH, la temperatura a la cual se efectuó la medición, en caso de que no se realice con equipo con compensador de temperatura.

9.2.5 En caso de que la variación de las lecturas no sea la adecuada, repetir el procedimiento y reemplazar las disoluciones o el electrodo de pH si es necesario.

- 9.2.6** Posteriormente se deberá medir al menos una disolución patrón de trabajo (muestra control), llevando a cabo al menos 3 lecturas independientes consecutivas, de la misma alícuota, enjuagar el electrodo de pH con agua destilada o desionizada (véase 6.1), entre las lecturas independientes realizadas no deberá haber una diferencia mayor a 0,03 unidades de pH entre ellas, registrar para cada lectura de pH, la temperatura a la cual se efectuó la medición, en caso de que no se realice con equipo con compensador de temperatura.
- 9.2.7** Preferentemente utilizar la disolución patrón de trabajo que más se asemeje a la muestra problema que se desea medir. Cada laboratorio deberá establecer los criterios de aceptación y rechazo, de esta disolución patrón de trabajo (muestra control).
- 9.2.8** En caso de que la variación de las lecturas no sea la adecuada, repetir el procedimiento y reemplazar las disoluciones o el electrodo de pH si es necesario.
- 9.2.9** El procedimiento de calibración con patrones de referencia y verificación de patrones control (muestra control) descrito anteriormente, es necesario que se realice en el laboratorio antes de salir a campo y en el primer punto de muestreo en campo de cada día de trabajo o antes de analizar un lote de muestras en el laboratorio por día.
- 9.2.10** Para los siguientes puntos de muestreo es posible no realizar la calibración, siempre y cuando se mantenga el mismo intervalo de trabajo con el que fue calibrado previamente el equipo, y se verifique con la disolución patrón de trabajo (muestra control) cumpliendo con los criterios de aceptación y rechazo establecidos por el propio laboratorio.

Si hay varios sitios de muestreo cercanos y el equipo no se desplaza de uno a otro, es posible verificarlo solo una vez como se indica en 9.2.10.

NOTA: Entiéndase por calibración o calibración analítica, al ajuste que se hace al equipo, mediante la comparación con patrones de referencia.

9.3 Medición de las muestras

- 9.3.1** Una vez que el equipo está calibrado y verificado correctamente, como se menciona en los puntos descritos anteriormente, se procede a realizar la medición de la muestra problema. Cuando sea posible, medir las muestras directamente del cuerpo de agua, en caso de no ser posible,

extraer como se menciona en el Capítulo 8 y realizar las mediciones sobre esta alícuota.

9.3.2 Sumergir el electrodo en la muestra problema, agitar levemente, esperar que la lectura de pH se estabilice, obtener y registrar al menos tres lecturas sucesivas independientes, entre cada medición enjuagar el electrodo de pH con agua destilada o desionizada (véase 6.1) y secar. La variación de las tres lecturas obtenidas no deberá desviarse más de 0,03 unidades de pH. Sólo en caso de que el equipo no cuente con compensador de temperatura, registrar el valor de temperatura a la cual se realizó la medición.

9.3.3 Reportar el promedio obtenido acompañado del dato de temperatura, sólo en caso de que el equipo no cuente con compensador de temperatura; de igual forma si la medición no se realizó al momento de la colecta de muestra indicar el tiempo transcurrido, el cual no debe exceder las 6 h de la toma de muestra.

9.3.4 Si las tres lecturas consecutivas difieren en más de 0,03 unidades de pH, repetir si es posible con otra porción de la muestra problema, en caso de que esto no sea posible o persista el problema repetir desde el procedimiento de calibración.

10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Reportar el valor promedio de pH de las tres mediciones de las lecturas independientes redondeando a una cifra decimal.

En caso de que el equipo no cuente con compensador de temperatura, realizar la corrección correspondiente y reportar el promedio del valor corregido.

Reportar la temperatura promedio a la cual se efectuó la medición, redondeando al entero y en grados Celsius.

De igual forma si la medición no se realizó al momento de la colecta de muestra indicar el tiempo transcurrido, el cual no debe exceder las 6 h, de la toma de muestra.

11 CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad analítico de esta norma mexicana, considerar lo descrito en la NMX-AA-115-SCFI (véase 2 Referencias).

12 INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo deberá contener al menos la siguiente información:

- 12.1 Toda la información requerida para la identificación completa de la muestra.
- 12.2 Referencia al método de prueba utilizado.
- 12.3 La expresión de los resultados de acuerdo con el capítulo 10.

13 VIGENCIA

La presente de norma mexicana, entrará en vigor 120 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el **Diario Oficial de la Federación**.

14 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana¹ coincide básicamente con la norma internacional ISO 10523:2008.- Water quality – Determination of pH y difiere de ella en los siguientes puntos:

Capítulo/Inciso que aplica diferencia	al la	Desviación Técnica / Justificación
0 Introducción		Se redujo la información de la introducción, para dejar únicamente la necesaria.
1 Objetivo y Campo de Aplicación		Se adecuó el objetivo de acuerdo a la necesidad y alcance requerido para la aplicación nacional. De igual forma se amplió el intervalo de trabajo para adecuarse a las

¹ Esta norma, es modificada (MOD) con respecto a la Norma ISO 10523:2008.- Water quality – Determination of pH

	necesidades de medición, de los cuerpos de agua nacionales
3 Definiciones	Se añadió la definición de patrón de referencia, patrón de trabajo y pHmetro (véase 3.2 a 3.4), para homologar esta norma mexicana con el conjunto de normas de este tema (Análisis de agua).
4 Principio	Se complementó la información para considerar los equipos que tienen compensador de temperatura automático.
5 Interferencias	Se eliminaron algunas interferencias, que no son aplicables para el alcance de la presente norma mexicana y algunas se complementaron.
6 Reactivos	Se especificaron puntualmente las características del agua a utilizar y se modificó el texto para señalar que los valores asignados son nominales, ya que no tienen una incertidumbre asociada, así mismo se añadió patrón de referencia y patrón de trabajo.
7 Equipo	Se complementó la información de los equipos requeridos, para ser más específicos, se modificó la escala requerida del termómetro, para coincidir con la NMX vigente de temperatura y finalmente se agregó las características de los diferentes electrodos de pH, que se pueden utilizar.
8 Muestreo	Se modificó el intervalo de temperatura al que deben mantenerse las muestras, para homologar esta norma mexicana con el conjunto de normas de este tema (Análisis de agua). Y se estableció el volumen mínimo y el tiempo máximo de análisis en caso de no realizar la medición inmediatamente.
9 Procedimiento	Se modificó el texto en los puntos 9.1 Preparación, 9.2 Calibración y ajuste del equipo de medición y 9.3 Medición de las Muestras para completar el procedimiento y mejorar la calidad del análisis y que la redacción estuviera más clara y completa.
10 Expresión de	Se determinó que los resultados serán

resultados	expresados con dos cifras decimales y la forma de reportar la temperatura y tiempo de análisis, en caso de ser necesario.
11 Control de calidad	Se agregó el capítulo para establecer el control de calidad que debe seguir cada laboratorio que aplique esta norma mexicana
12 Informe de ensayo	Se suprimieron algunos puntos que no son necesarios para el alcance de esta norma mexicana.
Apéndices	Se excluyeron de la presente norma mexicana los Apéndices Informativos B, C, D y E, que incluía la norma ISO en la cual está basada esta norma mexicana, debido a que no son aplicables para el alcance nacional del mismo. Dejando únicamente el Apéndice A (informativo), del cual se descartó la Tabla 2, ya que no es de utilidad para la presente norma mexicana.

APÉNDICE A
(Informativo)
Valores de pH de los patrones de trabajo

A.1 Dependencia de la temperatura de valores de pH de las disoluciones de trabajo.

TABLA 1.- Ejemplos de valores de disoluciones de patrones de trabajo

Temperatura °C	B Tartrato Ácido de Potasio Saturado	C Ftalato de Hidroxido de Potasio 0,05 mol/kg	D Fosfato 0,025 mol/kg	F Borax 0,01 mol/kg	I Carbonato de Sodio / Bicarbonato de Sodio 0,025 mol/kg
0	---- ^a	4,000	6,984	9,464	10,317
5	---- ^a	3,998	6,951	9,395	10,245
10	---- ^a	3,997	6,923	9,332	10,179
15	---- ^a	3,998	6,900	9,276	10,118
20	---- ^a	4,000	6,881	9,225	10,062
25	3,557	4,005	6,865	9,180	10,012
30	3,552	4,011	6,853	9,139	9,966
35	3,549	4,018	6,844	9,102	9,926
37	3,548	4,022	6,841	9,088	9,910
40	3,547	4,027	6,838	9,068	9,889
50	3,549	4,050	6,833	9,011	9,828

^a No puede ser usada debajo de 25 ° C

15 BIBLIOGRAFÍA

-NOM-008-SCFI-2002

Sistema General de Unidades de Medida.
Publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 27 de noviembre de 2002. Modificación publicada en el **Diario Oficial de la Federación** 24 de septiembre de 2009.

-ISO 10523: 2008.- Water quality – Determination of pH.



-Compendium of Analytical Nomenclature, definitive rules 1997, 3th Edition, Inczedy, J.; Lengyel, T. and Ure, A.M., IUPAC

-BUCK, R.O., RONDININI, S., COVINGTON, A.K., BAUCKE, F.G.K., BRETT, C.M.A., CAMOES, M.F., MILTON, M.J.T., MUSSINI, T., NAUMANN, R., PRATT, K.W., SPITZER, P., WILSON, G.S., The measurement of pH: Definition, standards and procedures (IUPAC Recommendations 2002), Pure Appl. Chem. 2002, Vol. 74, pp. 2169–2200.

Ciudad de México, a

EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS

ALBERTO ULISES ESTEBAN MARINA



NORMA MEXICANA

NMX-AA-034-SCFI-2015

**ANÁLISIS DE AGUA - MEDICIÓN DE SÓLIDOS Y SALES
DISUELTAS EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y
RESIDUALES TRATADAS – MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA A LA NMX-AA-034-SCFI-2001).**

WATER ANALYSIS – MEASUREMENT OF SALTS AND SOLIDS
DISSOLVED IN NATURAL WATER, WASTEWATERS AND
TREATED WASTEWATERS - TEST METHOD



P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- CÉSAR CLEMENTE ALVARADO GARCÍA
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA.
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- HACH COMPANY
- IDECA, S.A. DE C.V.
- INDEX-LAB
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.



- LABORATORIO DE SERVICIOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS S.A. DE C.V.
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PERKIN ELMER DE MÉXICO, S.A.
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, I.P.D.
Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Ingeniería

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
2	PRINCIPIO DEL MÉTODO	2
3	REFERENCIAS	2
4	DEFINICIONES	2
5	EQUIPO Y MATERIALES	3
6	REACTIVOS Y PATRONES	4
7	RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	5
8	CONTROL DE CALIDAD	6
9	PROCEDIMIENTO	6
10	CÁLCULOS	9
11	INTERFERENCIAS	12
12	SEGURIDAD	13
13	MANEJO DE RESIDUOS	13
14	VIGENCIA	14
15	BIBLIOGRAFÍA	14
16	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	15
	APÉNDICE INFORMATIVO A	16



NORMA MEXICANA

NMX-AA-034-SCFI-2015

ANÁLISIS DE AGUA - MEDICIÓN DE SÓLIDOS Y SALES DISUELTAS EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS – MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-034-SCFI-2001).

WATER ANALYSIS - MEASUREMENT OF SALTS AND SOLIDS
DISSOLVED IN NATURAL WATER, WASTEWATERS AND
TREATED WASTEWATERS - TEST METHOD

0 INTRODUCCIÓN

Todas las aguas contienen sustancias disueltas en cantidades variables que dependen de su origen.

El agua puede contener varios tipos de sólidos, entre ellos, sólidos disueltos y los sólidos suspendidos.

Los sólidos y sales disueltas pueden afectar adversamente la calidad de un cuerpo de agua, un efluente o un proceso de varias formas, en plantas potabilizadoras por ejemplo el análisis de sólidos disueltos son importantes como indicadores de la efectividad de procesos de tratamiento del agua.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método para la medición de sólidos y sales disueltas y aplica para aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Es de aplicación nacional.

La Dirección General de Normas de la Secretaría de Economía aprobó la presente norma, cuya declaratoria de vigencia fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el:



2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El principio de este método se basa en la medición cuantitativa de los sólidos y sólidos disueltos así como la cantidad de materia orgánica contenidos en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, mediante la evaporación y calcinación de la muestra filtrada o no, en su caso, a temperaturas específicas, en donde los residuos son pesados y sirven de base para el cálculo del contenido de estos.

3 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma mexicana, se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes o las que la sustituyan:

NMX-AA-089/1-SCFI-2010	Protección al ambiente-Calidad del agua-Vocabulario-Parte 1 (Cancela a la NMX-AA-089-1-1986). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 2011.
NMX-AA-089/2-SCFI-2010	Protección al ambiente-Calidad del agua-Vocabulario-parte 2 (Cancela a la NMX-AA-89/2-1992). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 agosto de 2013.
NMX-AA-115-SCFI-2015	Análisis de agua - Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos (Cancela a la NMX-AA-115-SCFI-2001). Declaratoria de Vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de octubre de 2015.

4 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma mexicana, aplican los términos y definiciones contenidos en las normas mexicanas NMX-AA-089/1-SCFI y NMX-AA-089/2 (véase 3 Referencias) y se establecen las siguientes:



4.1 Masa constante:

Es la masa que se registra cuando el material ha sido calentado, enfriado y pesado, y que en dos ciclos completos consecutivos presenta una **diferencia** $\leq 0,0005$ g.

4.2 Sólidos Disueltos Totales (SDT):

Es el material soluble constituido por materia inorgánica y orgánica que permanece como residuo después de evaporar y secar una muestra previamente filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio con poro de $1,5 \mu\text{m}$ a una temperatura de $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3 Sólidos Suspendidos Totales (SST):

Es el material constituido por los sólidos sedimentables, los sólidos suspendidos y coloidales que son retenidos por un filtro de fibra de vidrio con poro de $1,5 \mu\text{m}$ secado y llevado a masa constante a una temperatura de $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV):

Son aquellos sólidos suspendidos que se volatilizan en la calcinación a $550 \text{ }^\circ\text{C} \pm 50 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5 Sólidos Totales (ST):

Es el residuo que permanece en una cápsula después de evaporar y secar una muestra a una temperatura de $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.6 Sólidos Totales Volátiles (STV):

Cantidad de materia orgánica e inorgánica que se volatiliza por el efecto de la calcinación a $550 \text{ }^\circ\text{C} \pm 50 \text{ }^\circ\text{C}$.

5 EQUIPO Y MATERIALES

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

5.1 Equipo

- a) Horno de secado capaz de mantener una temperatura de $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- b) Balanza analítica calibrada, con una resolución de 0,1 mg;
- c) Mufla eléctrica capaz de mantener una temperatura de $550\text{ °C} \pm 50\text{ °C}$
- d) Equipo de filtración al vacío y
- e) Parrilla de calentamiento.

5.2 Materiales

- a) Cápsulas de evaporación (porcelana, níquel o platino), del tamaño acorde al volumen de la muestra,
- b) Desecador, provisto con un desecante o con control de humedad,
- c) Filtro de fibra de vidrio. Los filtros deberán ser circulares, con una porosidad de $1,5\ \mu\text{m}$ y del diámetro correspondiente para adaptarse perfectamente en el dispositivo de filtrado,
- d) Soporte de secado: charola de aluminio o Crisol Gooch,
- e) Dispositivo de filtración o Crisol Gooch,

NOTA 1: El crisol Gooch o dispositivo de filtración debe tener suficiente permeabilidad para permitir que el agua pase libremente.

- f) Pinzas para cápsula y/o crisol, y
- g) Probeta.

6 REACTIVOS Y PATRONES

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se indique otro grado.



Cuando se indique agua debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características: a) Conductividad máx: 5,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C, y b) pH: 5,0 a 8,0.

Disolución control: El laboratorio deberá preparar una disolución de control de calidad (véase 6.1).

6.1 Disolución control

La disolución control debe contener los elementos siguientes:

Cloruro de sodio (NaCl), carbonato de calcio (CaCO_3), celulosa microcristalina ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n, tierra de diatomáceas y caolín o almidón.

Agregar la cantidad necesaria de cloruro de sodio, previamente secado a 105 °C \pm 2 °C por 2 horas, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, tierra de diatomáceas y almidón o caolín, de acuerdo a la concentración deseada de sólidos en las muestras de control, agregar agua y llevar al aforo de 1 000 mL.

Esta disolución tiene una vida útil de máximo doce meses.

NOTA 2: Se pueden utilizar materiales de referencia comerciales.

7 RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

7.1 El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 7 días y almacenarlas a una temperatura de 4 °C \pm 2 °C.

Es conveniente que para muestras provenientes de reactores biológicos el análisis se realice dentro de las 24 h posteriores a la toma de muestra para minimizar la interferencia por generación de biomasa.

7.2 Al menos recolectar un mínimo de 600 mL de muestra en envases de plástico o vidrio y taparse inmediatamente después de la recolecta. Pueden utilizarse muestras compuestas o simples. Evitar llenar los recipientes completamente (hasta el borde) para permitir eficientemente la homogenización por medio de la agitación.

8 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio que utilice este método debe operar un programa de control de calidad en referencia a la norma NMX-AA-115-SCFI (véase 3 Referencias).

9 PROCEDIMIENTO

9.1 Preparación de cápsulas

9.1.1 Introducir las cápsulas al horno a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min como mínimo. Únicamente en el caso de la medición de sólidos volátiles, las cápsulas posteriormente se introducen a la mufla a una temperatura de $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 20 min como mínimo. Después de este tiempo transferirlas al horno.

9.1.2 Trasladar la cápsula al desecador y dejar enfriar por 20 min como mínimo.

NOTA 3: El manejo de la cápsula durante el análisis, debe realizarse en todo momento con las pinzas.

9.1.3 Pesar las cápsulas y repetir el ciclo horno-dsecador (véase 9.1.1 y 9.1.2) hasta obtener una diferencia $\leq 0,0005\text{ g}$ en dos pesadas consecutivas. Registrar como m_1 considerando para los cálculos el último valor de la masa.

9.2 Preparación de dispositivo de filtración y/o soportes de secado.

9.2.1 Utilizar filtro de fibra de vidrio que adapte al dispositivo de filtración y/o secado y/o charola de aluminio, con la ayuda de unas pinzas colocarlo con la cara rugosa hacia arriba en el dispositivo de secado y/o filtración.

NOTA 4: Mojar el filtro con agua para asegurar que se adhiera perfectamente, solo en caso de utilizar crisol Gooch.

9.2.2 El soporte de secado con el filtro se introduce al horno a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min como mínimo, después de este tiempo transferirlo a un desecador.



- 9.2.3** Pesar el dispositivo de filtración y/o soportes de secado y repetir el ciclo horno-**deseCADOR (véase 9.2.2) hasta obtener una diferencia \leq 0,000 5 g** en dos pesadas consecutivas. Registrar como m_2 , considerando para los cálculos el último valor de la masa.
- 9.3** Preparación de la muestra
- 9.3.1** Las muestras deben estar a temperatura ambiente al realizar el análisis. Agitar las muestras para asegurar la homogeneización.
- 9.4** Medición de sólidos totales (ST) y sólidos totales volátiles (STV).
- 9.4.1** Medición de sólidos totales (ST)
- 9.4.1.1** Se recomienda seleccionar el volumen de muestra de tal manera que el residuo seco sobre la cápsula se encuentre en un intervalo de masa de 2,5 mg a 200 mg.
- 9.4.1.2** Transferir la muestra a la cápsula previamente puesta a masa constante (véase 9.1.3) y evaporar a sequedad en el horno de secado a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 9.4.1.3** En caso de utilizar placa de calentamiento llevar a casi sequedad sin llegar a ebullición de la muestra y posteriormente pasar al horno de secado a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su secado total por una hora.
- 9.4.1.4** Trasladar la cápsula al desecador y dejar enfriar por 20 min como mínimo. Llevar la cápsula a masa constante repitiendo el ciclo horno-deseCADOR (véase 9.1.1 y 9.1.2), hasta obtener una diferencia \leq 0,000 5 g en dos pesadas consecutivas.
- 9.4.1.5** Registrar como m_3 , la última masa obtenida.
- 9.4.2** Medición de sólidos totales volátiles (STV)
- 9.4.2.1** Introducir la cápsula conteniendo el residuo (véase 9.4.1.1) a la mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min a 20 min, transferir la cápsula al horno a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min como mínimo. Trasladar la cápsula siguiendo el punto 9.4.1.4, y registre el valor como m_4 .
- 9.5** Sólidos disueltos totales (SDT)

9.5.1 Para la medición de los sólidos disueltos totales véase 10.4; si no se poseen tales datos, pasar al punto 9.5.2.

9.5.2 En la cápsula llevada previamente a masa constante m_1 , filtrar una alícuota de la muestra a través de un filtro de fibra de vidrio en el crisol o dispositivo de filtrado. Verter la alícuota en una cápsula preparada (véase 9.1) y evaporar a sequedad en el horno de secado a $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ o evaporar casi a sequedad sin llegar a ebullición de la muestra, en una parrilla de calentamiento.

Introducir al horno a $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ la cápsula con la muestra, durante al menos 1 h. Pasar la cápsula al desecador para llevar a masa constante (véase 9.4.1.4). Registrar como m_5 .

NOTA 5: Si al cabo de 1 h aún se observa humedad o líquido en la cápsula, continuar secando en el horno.

9.6 Medición de sólidos suspendidos totales (SST) y Medición de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

9.6.1 Medición de sólidos suspendidos totales (SST)

9.6.1.1 Se recomienda seleccionar el volumen de muestra de acuerdo a las características de esta.

9.6.1.2 Homogeneizar la muestra mediante agitación vigorosa del envase, transferir de forma inmediata y en un solo paso un volumen adecuado de muestra a una probeta.

9.6.1.3 Filtrar la muestra:

- a) A través del filtro colocado en el crisol Gooch (véase 9.2) o
- b) A través del filtro que es tomado de la charola de aluminio y colocado en el equipo de filtración con ayuda de unas pinzas (véase 9.2).

Enjuagar la probeta con el volumen suficiente para arrastrar los sólidos y verter en el filtro.

NOTA 6: Algunos tipos de agua contienen materiales que bloquean los poros del filtro o reducen su diámetro. Esto incrementa el tiempo de filtrado y los resultados se relacionan en función del volumen de la

muestra. Si se observa tal bloqueo del filtro, deberá repetirse la medición con menor volumen. Los resultados deberán interpretarse considerando lo anterior.

9.6.1.4 Introducir el soporte de secado con el filtro al horno a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h como mínimo, en caso de usar un soporte de secado diferente al crisol Gooch retirar con cuidado el filtro del equipo de filtrado usando pinzas. Posteriormente llevar a masa constante véase 9.4.1.4 y registrar como m_6 la masa obtenida.

9.6.2 Medición de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

9.6.2.1 Introducir el soporte de secado con el filtro que contiene el residuo m_6 a la mufla a una temperatura de $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min a 20 min.

9.6.2.2 Trasladar el soporte de secado con el filtro al horno a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min como mínimo.

9.6.2.3 Transferir el soporte de secado con el filtro al desecador y llevar a masa constante (véase 9.4.1.4.) Registrar como m_7 .

10 CÁLCULOS

10.1 Calcular el contenido de sólidos totales de las muestras como sigue:

$$ST = \frac{(m_3 - m_1)}{V} 1\ 000\ 000$$

Donde:

ST Son los sólidos totales, en mg/L;
 m_3 es la masa de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en g;
 m_1 es la masa de la cápsula vacía a masa constante, en g, y
 V es el volumen de muestra, en mL.

10.2 Calcular el contenido de sólidos totales volátiles (STV) de las muestras como sigue:

$$STV = \frac{(m_3 - m_4)}{V} 1\ 000\ 000$$

Donde:

- STV** son los sólidos totales volátiles, en mg/L;
 m_3 es la masa de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en g;
 m_4 es la masa de la cápsula con el residuo, después de la calcinación, en g, y
V es el volumen de muestra, en mL.

10.3 Calcular el contenido de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), en miligramos por litro, a partir de las siguientes ecuaciones:

a) SST

$$SST = \frac{(m_6 - m_2)}{V} 1\ 000\ 000$$

b) SSV

$$SSV = \frac{(m_6 - m_7)}{V} 1\ 000\ 000$$

Donde:

- SST** son los sólidos suspendidos totales, en mg/L;
SSV son los sólidos suspendidos volátiles, en mg/L;
 m_2 es la masa del soporte de secado con el filtro antes de la filtración, en g;
 m_6 es la masa del soporte de secado con el filtro, en g;
 m_7 es la masa del soporte de secado con el filtro después de la calcinación, en g, y
V es el volumen de la muestra, en mL.



10.4 Calcular el contenido de sólidos disueltos totales (SDT) de las muestras como sigue:

a) SDT

$$SDT = (ST) - (SST)$$

Donde:

SDT Son los sólidos disueltos totales, en mg/L;
ST son los sólidos totales, en mg/L, y
SST son los sólidos suspendidos totales, en mg/L.

O bien

$$SDT = \frac{(m_5 - m_1)}{V} 1\ 000\ 000$$

Donde:

m₁ Es la masa de la cápsula vacía, en g;
m₅ es la masa de cápsula con el residuo seco de la muestra filtrada, en g, y
V es el volumen de muestra, en mL.

NOTA 7: Los datos obtenidos para sólidos disueltos totales por conductimetría no son conmutables con los obtenidos por este método.

10.5 Calcular el contenido de sólidos disueltos volátiles (SDV) de las muestras como sigue:

$$SDV = STV - SSV$$

Donde:

SDV Son los sólidos disueltos volátiles en mg/L;
STV son los sólidos totales volátiles, en mg/L, y
SSV son los sólidos suspendidos volátiles, en mg/L.

10.6 Calcular el contenido de sólidos disueltos fijos (SDF) de las muestras como sigue:



$$SDF = SDT - SDV$$

Donde:

SDF Son los sólidos disueltos fijos, en mg/L;
SDT son los sólidos disueltos totales, en mg/L, y
SDV son los sólidos disueltos volátiles, en mg/L.

10.7 Calcular el contenido de sólidos suspendidos fijos (SSF) de las muestras como sigue:

$$SSF = SST - SSV$$

Donde:

SSF Son los sólidos suspendidos fijos, en mg/L;
SST son los sólidos suspendidos totales, en mg/L, y
SSV son los sólidos suspendidos volátiles, en mg/L.

10.8 Calcular el contenido de sólidos totales fijos (STF) de las muestras como sigue:

$$STF = ST - STV$$

Donde:

STF Son los sólidos totales fijos, en mg/L;
ST son los sólidos totales, en mg/L, y
STV son los sólidos totales volátiles, en mg/L.

10.9 Informar los resultados, en mg/L

11 INTERFERENCIAS

11.1 La heterogeneidad de la muestra que contiene una o más de dos fases puede provocar errores durante el muestreo en campo y en la toma de alícuotas de la misma para la medición de sólidos.

11.2 Si parte de los sólidos de la muestra se adhieren a las paredes de los contenedores, ya sea en el material de muestreo o en los

instrumentos de trabajo, consignar en las observaciones del informe de resultados.

- 11.3** La temperatura a la cual el residuo se seca, tiene un efecto muy importante sobre los resultados, ya que pueden ocurrir pérdidas en la masa de la materia orgánica presente durante la etapa de secado y/o el desprendimiento de gases por descomposición química y/o por la oxidación del residuo, así como por la oclusión de agua.
- 11.4** Los resultados para las muestras con alto contenido de grasas y aceites son cuestionables debido a la dificultad de secado a masa constante en un tiempo razonable.
- 11.5** La precisión de los datos para la medición del contenido de materiales en suspensión determinados, según esta norma mexicana, depende principalmente de la naturaleza de la muestra y no del procedimiento del análisis.
- 11.6** Las muestras que contienen organismos vivos o materiales viscosos, (por ejemplo, hidratos de carbono polimerizados) que obstruyen los filtros, son especialmente sensibles al transporte y a las condiciones del ensayo.

12 SEGURIDAD

- 12.1** Este método puede no mencionar todas las precauciones de seguridad asociadas con su uso. El laboratorio es responsable de mantener un ambiente de trabajo seguro y un archivo de las normas de seguridad respecto a la exposición y manejo seguro de las sustancias en este método.
- 12.2** Cuando se trabaje este método, debe usarse el equipo de seguridad apropiado, tal como: bata, guantes de látex, guantes de protección térmica, lentes de seguridad y careta de protección.

13 MANEJO DE RESIDUOS

Cada laboratorio debe contemplar el control, manejo y disposición final de los residuos generados durante la medición.



14 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrará en vigor 120 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el **Diario Oficial de la Federación**.

15 BIBLIOGRAFÍA

- NOM-001-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximo permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** en 6 de enero de 1997.
- NOM-008-SCFI-2002 Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 27 de noviembre de 2002.
- NMX-AA-003-1980 Aguas residuales.- Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 25 de marzo de 1980.
- NMX-AA-014-1980 Cuerpos receptores.- Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 5 de septiembre de 1980.
- ISO 11923:1997 Water quality - Determination of suspended solids by filtration through glass-fiber filters
- 2540 Solids, Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, United States of America, Washington, DC 20005, 22th Edition 2012.
- Comisión Nacional del Agua, *Ley Federal de Derechos. Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales 2015*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México 2015. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/LeyFederaldeDerechos.pdf>.



16 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana coincide básicamente con la ISO 11923:1997 Water quality - Determination of suspended solids by filtration through glass-fiber filters, y difiere en los siguientes puntos:

3. Definiciones: Ya que varían los conceptos de la determinación de sólidos.
4. Principio: Debido a que esta norma amplía las determinaciones de los sólidos.
5. Aparatos: Se hacen especificaciones del tipo de filtro y/o dispositivo de secado.
6. Reactivos: Se utiliza una suspensión de referencia de concentración mayor y se pueden elaborar concentraciones menores y diferentes a lo indicado en la ISO.
7. Recolección, preservación y almacenamiento de la muestra. No coincide con la ISO 11923 debido a que el tiempo de almacenamiento se amplía.
8. Procedimiento: De acuerdo a la definición que se establece en la masa constante se realizan el secado y peso constante de acuerdo a los límites establecidos de la NMX-AA-089/2-SCFI (véase 3 Referencias).
9. Muestra control: Se analiza una muestra control de acuerdo a lo establecido en la NMX-AA-115-AA-SCFI (véase 3 Referencias).
10. Cálculos: Se mantiene la forma de cálculo para Sólidos Suspendidos Totales. Se incorporan los cálculos para otras especies que no están contemplados en la ISO.



APÉNDICE INFORMATIVO A

MUESTRAS QUE CONTIENEN ACEITE U OTROS LÍQUIDOS ORGÁNICOS

Se puede retener en el filtro aceite u otros líquidos orgánicos inmiscibles, y solamente volatilizados parcialmente en el secado a $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Donde, sin embargo, el aceite inmisible es importante y será determinado separadamente; el filtrado, residuo lavado con agua deberá estar libre de aceite. Esto se puede hacer lavándose primero con etanol y luego con hexano antes de su secado a $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Cuando este procedimiento se aplica, debe ser registrado con los resultados de la prueba, ya que algunos materiales, excepto aceite inmisible, pueden haberse extraído.

México D.F.

EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS

ALBERTO ULISES ESTEBAN MARINA



**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE DUREZA TOTAL EN
AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES
TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-
072-1981)**

**WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF TOTAL HARDNESS
IN NATURAL, WASTEWATERS AND WASTEWATERS TREATED
- TEST METHOD**

0 INTRODUCCIÓN

Este método especifica el procedimiento para determinación de dureza en agua por titulación. La dureza se entiende como la capacidad de un agua para precipitar al jabón y esto está basado en la presencia de sales de los iones calcio y magnesio. La dureza es la responsable de la formación de incrustaciones en recipientes y tuberías lo que genera fallas y pérdidas de eficiencia en diferentes procesos industriales como las unidades de transferencia de calor. El término dureza se aplicó en principio por representar al agua en la que era difícil (duro) de lavar y se refiere al consumo de jabón para lavado, en la mayoría de las aguas alcalinas esta necesidad de consumo de jabón está directamente relacionada con el contenido de calcio y magnesio.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método de análisis para la determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método se basa en la formación de complejos por la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético con los iones calcio y magnesio. El método consiste en una valoración empleando un indicador visual de punto final, el negro de eriocromo T, que es de color rojo en la presencia de calcio y magnesio y vira a azul cuando estos se encuentran acomplejados o ausentes. El complejo del EDTA con el calcio y el magnesio es más fuerte que el que estos iones forman con el negro de eriocromo T, de manera que la competencia por los iones se desplaza hacia la formación de los complejos con EDTA desapareciendo el color rojo de la disolución y tornándose azul.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Aguas naturales

Se define como agua natural el agua cruda, subterránea, de lluvia, de tormenta, residual y superficial.

3.2 Aguas residuales

Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticos y similares, así como la mezcla de ellas.

3.3 Bitácora

Cuaderno de laboratorio debidamente foliado e identificado, en el cual los analistas anotan todos los datos de los procedimientos que siguen en el análisis de una muestra, así como todas las informaciones pertinentes y relevantes a su trabajo en el laboratorio. Es a partir de dichas bitácoras que los inspectores pueden reconstruir el proceso de análisis de una muestra tiempo después de que se llevó a cabo.

3.4 Blanco analítico o de reactivos

Agua reactivo o matriz equivalente que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos disolventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra problema.

3.5 Calibración

Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones, efectuando una corrección del instrumento de medición para llevarlo a las condiciones iniciales de funcionamiento.

3.6 Descarga

Acción de verter, infiltrar, depositar o inyectar aguas residuales a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita, cuando éste es un bien del dominio público de la Nación.

3.7 Desviación estándar experimental

Para una serie de n mediciones del mismo mensurando, es la magnitud s que caracteriza la dispersión de los resultados, dado por la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

En donde x_i es el resultado de la i -ésima medición y \bar{x} es la media aritmética de los n resultados considerados.

3.8 Disolución estándar

Disolución de concentración conocida preparada a partir de un patrón primario.

3.9 Material de referencia

Material o sustancia en el cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneas y bien definidas, para ser utilizadas para la calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición, o para asignar valores a los materiales.

3.10 Material de referencia certificado

Material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de las propiedades están certificados por un procedimiento que establece la trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad, y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel

declarado de confianza.

3.11 Medición

Conjunto de operaciones que tiene por objeto determinar el valor de una magnitud.

3.12 Mensurando

Magnitud particular sujeta a medición.

3.13 Muestra compuesta

La que resulta de mezclar un número de muestras simples. Para conformar la muestra compuesta, el volumen de cada una de las muestras simples deberá ser proporcional al caudal de la descarga en el momento de su toma.

3.14 Muestra simple

La que se tome en el punto de descarga, de manera continua, en día normal de operación que refleje cuantitativa y cualitativamente él o los procesos más representativos de las actividades que generan la descarga, durante el tiempo necesario para completar cuando menos, un volumen suficiente para que se lleven a cabo los análisis necesarios para conocer su composición, aforando el caudal descargado en el sitio y en el momento de muestreo.

3.15 Parámetro

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

3.16 Patrón (de medición)

Material de referencia, instrumento de medición, medida materializada o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud para utilizarse como referencia.

3.17 Patrón nacional (de medición)

Patrón reconocido por una decisión nacional en un país, que sirve de base para asignar valores a otros patrones de la magnitud concerniente.

3.18 Patrón primario

Patrón que es designado o reconocido ampliamente como un patrón que tiene las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor es aceptado sin referencia a otros patrones de la misma magnitud.

3.19 Patrón secundario

Patrón cuyo valor es establecido por comparación con un patrón primario de la misma

magnitud.

3.20 Patrón de referencia

Patrón, en general de la más alta calidad metrológica disponible en un lugar dado, o en una organización determinada del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar.

3.21 Patrón de trabajo

Patrón que es usado rutinariamente para calibrar o controlar las medidas materializadas, instrumentos de medición o los materiales de referencia.

3.22 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento analítico se aplica repetidamente a diferentes alícuotas o porciones de una muestra homogénea. Usualmente se expresa en términos del intervalo de confianza o incertidumbre:

$$x = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

donde:

\bar{x}	es la media calculada a partir de un mínimo de tres mediciones independientes;
$t_{\alpha/2}$	es el valor de la t de Student para un nivel de significancia del 95 %;
s	es la desviación estándar de la muestra;
n	es el número de réplicas, y
x	es el resultado que incluye el intervalo de confianza.

3.23 Trazabilidad

Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por la cual pueda ser relacionado a referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbres determinadas.

3.24 Verificación de la calibración

Una verificación periódica de que no han cambiado las condiciones del instrumento en una forma significativa.

4 EQUIPO Y MATERIALES

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

4.1 Equipo

4.1.1 Balanza analítica con precisión de 0,1 mg

4.2 Materiales

Todo el material volumétrico utilizado en este procedimiento debe ser clase A con certificado o en su caso debe estar calibrado.

4.2.1 Bureta de 25 mL ó 50 mL

5 REACTIVOS Y PATRONES

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se indique otro grado.

Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características: a) Resistividad, megohm-cm a 25°C: 0,2 min; b) Conductividad, $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C: 5,0 Máx. y c) pH: 5,0 a 8,0.

5.1 Cloruro de amonio (NH_4Cl)

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

5.3 Amoníaco concentrado (NH_3)

5.4 Sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético dihidratado (EDTA)

5.5 Sal de Magnesio de EDTA

5.6 Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

5.7 Hidróxido de sodio (NaOH)

5.8 Indicador de negro de eriocromo T

5.9 2-Aminoetanol (libre de aluminio y metales pesados).



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

- 5.10 Rojo de metilo
- 5.11 Carbonato de calcio anhidro (CaCO_3)
- 5.12 Ácido clorhídrico concentrado (HCl)
- 5.13 Cloruro de sodio (NaCl)
- 5.14 Acido nítrico (HNO_3)
- 5.15 Acido sulfúrico (H_2SO_4)
- 5.16 Acido perclórico (HCl_2O_7)
- 5.17 Disolución amortiguadora. Pesarse aproximadamente y con precisión 16,9 g de cloruro de amonio (ver inciso 5.1) y disolver en 143 mL de amoníaco concentrado (ver inciso 5.3). Añadir aproximadamente 1,25 g de sal de magnesio de EDTA (ver inciso 5.5) y diluir hasta 250 mL con agua.
 - 5.17.1 Si no se dispone de sal de magnesio de EDTA, mezclar, aproximadamente 1,179 g de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético dihidratado (ver inciso 5.4) y 0,780 g de sulfato de magnesio heptahidratado (ver inciso 5.6) o 0,644 g de cloruro de magnesio hexahidratado (ver inciso 5.2), diluir a 50 mL con agua.

Conservar la disolución amortiguadora en un recipiente plástico o de vidrio; se debe desechar la disolución cuando haya transcurrido más de un mes de su fecha de preparación o cuando al añadirse 1 mL ó 2 mL a la muestra, ésta no pueda producir un pH de $10,0 \pm 0,1$. Tapar herméticamente para evitar pérdidas de amoníaco o adsorción de dióxido de carbono (CO_2).
 - 5.17.2 También pueden adquirirse en el mercado disoluciones amortiguadoras inodoras, las cuales constituyen una alternativa satisfactoria. Contienen sal de magnesio de EDTA y tienen la ventaja de ser relativamente inodoras y más estables que las amortiguadoras de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. Por lo general, las disoluciones amortiguadoras inodoras no proporcionan un punto final tan favorable como los de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ a causa de su reacción más lenta y pueden resultar inútiles cuando el método está automatizado. Preparar una de las disoluciones amortiguadoras mezclando 55 mL de ácido clorhídrico concentrado (ver inciso 5.12) con 400 mL de agua destilada y a continuación añadir lentamente y agitando, 300 mL de 2-Aminoetanol (libre de aluminio y metales pesados) (ver inciso 5.9). Agregar aproximadamente 5,0 g de sal de magnesio de EDTA (ver inciso 5.5) y diluir hasta 1 L con agua destilada.
- 5.18 Indicador negro de eriocromo T. Pesarse aproximadamente y con precisión 0,5 g de indicador negro de eriocromo T (ver inciso 5.8) y agregar 100 g de



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

Cloruro de sodio (ver inciso 5.13) y triturar en el mortero hasta formar un mezcla homogénea. Guardar en un frasco color ámbar. Esta mezcla se conserva en buenas condiciones para su uso durante un año.

- 5.19 Indicador Rojo de Metilo. Pesar aproximadamente y con precisión 0,1 g de la sal de sodio del rojo de metilo (ver inciso 5.10) y aforar a 100 mL con agua.
- 5.20 Disolución de EDTA (aproximadamente 0,01 M). Pesar aproximadamente y con precisión 3,723 g de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético dihidratada (ver inciso 5.4); disolver en agua y diluir a 1L. Valorar con una disolución de carbonato de calcio.
- 5.21 Disolución de carbonato de calcio (1mg/ml). Pesar aproximadamente y con precisión 1,0 g de carbonato de calcio anhidro (ver inciso 5.11) (patrón primario o reactivo especial bajo en metales pesados, álcalis y magnesio) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Colocar un embudo en el cuello del matraz y añadir poco a poco el ácido clorhídrico (1:1) (ver inciso 5.23) hasta la disolución total del carbonato de calcio. Añadir 200 mL de agua y llevar a ebullición durante unos minutos para eliminar el CO₂. Enfriar, añadir unas gotas de indicador rojo de metilo (ver inciso 5.10) y ajustar al color naranja intermedio por adición de amoníaco 3N o ácido clorhídrico (1:1), según se requiera. Transferir a un matraz y aforar a 1L con agua (1 mL = 1,0 mg de CaCO₃).
- 5.22 Disolución de hidróxido de sodio (NaOH) (aproximadamente 0,1 N). Pesar aproximadamente 4 g de hidróxido de sodio (ver inciso 5.7) y diluir a 1L
- 5.23 Disolución de ácido clorhídrico (1:1). Tomar 100 mL de ácido clorhídrico (ver inciso 5.12) y diluya en 100 mL de agua

6 RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- 6.1 Recolectar un volumen de muestra, homogéneo y representativo, de aproximadamente 400 mL en un frasco de polietileno o vidrio de borosilicato. Pueden utilizarse muestras simples y/o compuestas.
- 6.2 Acidificar la muestra con ácido nítrico hasta pH 2 o menor inmediatamente después de la recolección. Normalmente 2 mL/L son suficientes.
- 6.3 Mantener la muestra en refrigeración a 4°C hasta el momento del análisis. El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis recomendado es de seis meses.

7 CONTROL DE CALIDAD

- 7.1 Cada laboratorio que utilice este método debe operar un programa de control de calidad (CC) formal.
- 7.2 El laboratorio debe mantener los siguientes registros:
- Los nombres y títulos de los analistas que ejecutaron los análisis y el encargado de control de calidad que verificó los análisis.
 - Las bitácoras manuscritas del analista y del equipo en los que se contengan los siguientes datos:
 - a) Identificación de la muestra;
 - b) Fecha del análisis;
 - c) Procedimiento cronológico utilizado;
 - d) Cantidad de muestra utilizada;
 - e) Número de muestras de control de calidad analizadas;
 - f) Trazabilidad de las calibraciones de los instrumentos de medición;
 - g) Evidencia de la aceptación o rechazo de los resultados, y
 - h) Además el laboratorio debe mantener la información original reportada por los equipos en disquetes o en otros respaldos de información.

De tal forma que permita a un evaluador externo reconstruir cada determinación mediante el seguimiento de la información desde la recepción de la muestra hasta el resultado final.

- 7.3 Cada vez que se adquiriera nuevo material volumétrico debe de realizarse la verificación de la calibración de éste tomando una muestra representativa del lote adquirido.

8 CALIBRACIÓN

Se debe contar con la calibración de los equipos y materiales siguientes:

- 8.1 Material volumétrico
- 8.2 Balanza analítica
- 8.3 Bureta de 25 mL ó 50 mL

9 PROCEDIMIENTO

- 9.1 Tratamiento previo de muestras de aguas contaminadas y residuales:

- 9.1.1 Si la muestra contiene partículas o materia orgánica requiere un tratamiento previo al análisis. Se recomienda llevar a cabo una digestión con ácido nítrico - ácido sulfúrico ó ácido nítrico - ácido perclórico y ajustar posteriormente el pH de la disolución a un valor de 9, utilizando disolución de amoniaco.
- 9.2 Titulación de muestras:
- 9.2.1 Colocar 50 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- 9.2.2 Añadir 1 mL ó 2 mL de disolución amortiguadora (ver inciso 5.15). Generalmente un mL es suficiente para alcanzar un pH de 10,0 a 10,1.
- 9.2.3 Añadir una cantidad adecuada (0,2 g) del indicador eriocromo negro T (ver inciso 5.8). La muestra debe tomar un color vino rojizo.
- 9.2.4 Titular con la disolución de EDTA 0,01 M (ver inciso 5.20) agitando continuamente hasta que desaparezcan los últimos matices rojizos. Añadir las últimas gotas con intervalos de 3 s a 5 s. En el punto final la muestra cambia de color rojizo a azul.

10 CÁLCULOS

- 10.1 Calcular la dureza total como se indica en la siguiente ecuación:

$$\text{Dureza total expresada como CaCO}_3 \text{ (mg/L)} = \frac{(A-B) \times C \times 1,000}{D}$$

donde:

- A son los mL de EDTA gastados en la titulación en la muestra;
B son los mL de EDTA gastados en la titulación en el blanco (si fue utilizado);
C son los mg de CaCO₃ equivalentes a 1 mL de EDTA, y
D son los mL de muestra.

- 10.2 Expresar la dureza total como mg/L CaCO₃ con la precisión correspondiente.

11 INTERFERENCIAS



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

- 11.1 El EDTA forma complejos con hierro, manganeso, cobre, zinc, plomo, cobalto, níquel, bario, estroncio y algunos otros metales.
- 11.2 En la titulación de calcio y magnesio, los estados altos de oxidación del manganeso reaccionan rápidamente con el indicador para formar productos de oxidación incoloros
- 11.3 Los iones ortofosfato y sulfato interfieren en concentraciones que excedan de 500 mg/L y 10 000 mg/L respectivamente.
- 11.4 En presencia de aluminio en concentraciones mayores de 10 mg/L, el color azul que indica el punto final de la titulación puede aparecer y en poco tiempo puede regresar a rojizo.
- 11.5 La materia orgánica coloidal o en suspensión también puede interferir en el punto final.

12 SEGURIDAD

- 12.1 No ha sido determinada la carcinogenicidad de todos los reactivos, por lo que cada sustancia química debe tratarse como peligro potencial a la salud. La exposición a estas sustancias debe reducirse al menor nivel posible. Se sugiere que el laboratorio realice inspecciones de higiene ocupacional de cada reactivo a los que pueda estar expuesto el analista y que dichos resultados estén a su disposición.
- 12.2 Este método puede no mencionar todas las normas de seguridad asociadas con su uso. El laboratorio es responsable de mantener un ambiente de trabajo seguro y un archivo de las normas de seguridad respecto a la exposición y manejo seguro de las sustancias químicas especificadas en éste método. Debe tenerse un archivo de referencia de las hojas de información de seguridad el cual debe estar disponible a todo el personal involucrado en estos análisis.
- 12.3 Este método requiere del uso de ácido clorhídrico. El ácido clorhídrico es un compuesto químico altamente corrosivo que debe manejarse con extremo cuidado.
- 12.4 La preparación de la disolución amortiguadora usada en este método debe realizarse dentro de una campana de extracción. Consultar las hojas de seguridad sobre manipulación y disposición de estos productos.
- 12.5 Cuando se trabaje con cualquiera de los compuestos químicos descritos en este método, debe usar todo el tiempo equipo de seguridad, tal como: batas, guantes de látex y lentes de seguridad.

- 12.6 La preparación de todos los reactivos usados en este método debe efectuarse bajo una campana de extracción. Consulte las hojas de seguridad sobre manipulación y disposición de estos.

13 MANEJO DE RESIDUOS

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

- 13.1 Cada laboratorio debe contemplar dentro de su programa de control de calidad el destino final de los residuos generados durante la determinación.
- 13.2 Los desechos ácidos se deben neutralizar para su posterior desecho.
- 13.3 Todas las muestras que cumplan con la norma de descarga a alcantarillado pueden ser descargadas en el mismo sistema.

14 BIBLIOGRAFÍA

- | | |
|----------------------|--|
| NOM-001-ECOL-1996 | Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997. |
| NOM-008-SCFI-1993 | Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993. |
| NMX-AA-003-1980 | Aguas residuales - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980. |
| NMX-AA-014-1980 | Cuerpos receptores - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de septiembre de 1980. |
| NMX-AA-089/1-1986 | Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario - Parte 1. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de julio de 1986. |
| NMX-AA-115-SCFI-2001 | Análisis de agua - Criterios generales para el |



control de la calidad de resultados analíticos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.

NMX-AA-116-SCFI-2001

Análisis de agua - Guía de solicitud para la presentación de métodos alternos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.

2340 C“ Hardness EDTA Titrimetric Method”, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater American Public Health Association (APHA), American Water Association (AWWA), Water Pollution Control Federation WPCF, 19a Ed., 1995

D 1126-86 (reapproved 1992),“Standard Test Methods for Hardness in water”, American Society for Testing and Materials, USA, ASTM Committee on Standards, Philadelphia PA, 1994.

Criterios Ecológicos de Calidad del Agua, publicados en el Diario Oficial de la Federación el 13 de diciembre de 1989.

15 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

**MÉXICO D.F., A
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS**

MIGUEL AGUILAR ROMO



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

NMX-AA-072-SCFI-2001
14/14

JADS/AFO/DLR/MRG

NMX-AA-072-SCFI-2001

**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE DUREZA TOTAL EN
AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES
TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-
072-1981)**

**WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF TOTAL HARDNESS
IN NATURAL, WASTEWATERS AND WASTEWATERS TREATED
- TEST METHOD**

P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- CASA ROCAS, S.A. DE C.V.
- CENTRO DE SERVICIOS QUÍMICOS DE AGUASCALIENTES
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- COMISIÓN ESTATAL DE AGUA Y SANEAMIENTO
- COMISIÓN FEDERAL DE ELECTRICIDAD
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE
- CORPORACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES
- FISHER SCIENTIFIC MEXICANA, S.A. DE C.V.
- GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica;
Dirección General de Normatividad y Apoyo Técnico.
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA



- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES
Campus Monterrey.
- LABORATORIO DE ECOLOGÍA INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE PEMEX PERFORACIÓN Y MANTENIMIENTO DE
POZOS
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUÍMICO INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE
C.V.
- MERCK- MÉXICO, S.A. DE C.V.
- NOVAMANN, S.A. DE C.V.
Laboratorio Control Químico.
- PERKIN ELMER DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA CANGREJERA, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA MORELOS, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA PAJARITOS, S.A. DE C.V.

- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- SECRETARÍA DE SALUD
- SERVICIOS AMBIENTALES MÚLTIPLES E INGENIERÍA, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE INGENIERÍA Y CONSULTORÍA AMBIENTAL, S.A. DE C.V.
- SISTEMA INTERMUNICIPAL DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Azcapotzalco.
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química;
Instituto de Geofísica;
Instituto de Ingeniería.
- VARIAN, S.A. DE C.V.

ÍNDICE DEL CONTENIDO



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

NMX-AA-072-SCFI-2001

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



**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE CLORUROS
TOTALES EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y
RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A
LA NMX-AA-073-1981)**

**WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF TOTAL CHLORINE IN
NATURAL WATER, WASTEWATERS AND WASTEWATERS
TREATED - TEST METHOD**

0 INTRODUCCIÓN

El ión cloruro es uno de los iones inorgánicos que se encuentran en mayor cantidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, su presencia es necesaria en aguas potables. En agua potable, el sabor salado producido por la concentración de cloruros es variable. En algunas aguas conteniendo 25 mg Cl⁻/L se puede detectar el sabor salado si el catión es sodio. Por otra parte, éste puede estar ausente en aguas conteniendo hasta 1g Cl⁻/L cuando los cationes que predominan son calcio y magnesio.

Un alto contenido de cloruros puede dañar estructuras metálicas y evitar el crecimiento de plantas. Las altas concentraciones de cloruro en aguas residuales, cuando éstas son utilizadas para el riego en campos agrícolas deteriora, en forma importante la calidad del suelo.

Es entonces importante el poder determinar la concentración de cloruros en aguas naturales, residuales y residuales tratadas en un amplio intervalo de concentraciones.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método de análisis para la determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

La determinación de cloruros por este método se basa en una valoración con nitrato de plata utilizando como indicador cromato de potasio. La plata reacciona con los cloruros para formar un precipitado de cloruro de plata de color blanco. En las inmediaciones del punto de equivalencia al agotarse el ión cloruro, empieza la precipitación del cromato. La formación de cromato de plata puede identificarse por el cambio de color de la disolución a anaranjado-rojizo así como en la forma del precipitado. En este momento se da por terminada la valoración.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Aguas naturales

Agua cruda, subterránea, de lluvia, de tormenta, de tormenta residual y superficial.

3.2 Aguas residuales

Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticos y similares, así como la mezcla de ellas.

3.3 Bitácora

Cuaderno de laboratorio debidamente foliado e identificado, en el cual los analistas anotan todos los datos de los procedimientos que siguen en el análisis de una muestra, así como todas las informaciones pertinentes y relevantes a su trabajo en el laboratorio. Es a partir de dichas bitácoras que los inspectores pueden reconstruir el proceso de análisis de una muestra tiempo después de que se llevó a cabo.

3.4 Blanco analítico o de reactivos

Agua reactivo o matriz equivalente que no contiene, por adición deliberada, la

presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos disolventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra problema.

3.5 Calibración

Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones, efectuando una corrección del instrumento de medición para llevarlo a las condiciones iniciales de funcionamiento.

3.6 Descarga

Acción de verter, infiltrar, depositar o inyectar aguas residuales a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita, cuando éste es un bien del dominio público de la Nación.

3.7 Desviación estándar experimental

Para una serie de n mediciones del mismo mensurando, es la magnitud s que caracteriza la dispersión de los resultados, dado por la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

En donde x_i es el resultado de la i -ésima medición y \bar{x} es la media aritmética de los n resultados considerados.

3.8 Disolución estándar

Disolución de concentración conocida preparada a partir de un patrón primario.

3.9 Disolución madre

Corresponde a la disolución de máxima concentración en un análisis. Es a partir de esta disolución que se preparan las disoluciones de trabajo.

3.10 Material de referencia



Material o sustancia en el cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneas y bien definidas, para ser utilizadas para la calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición, o para asignar valores a los materiales.

3.11 Material de referencia certificado

Material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de las propiedades están certificados por un procedimiento que establece la trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad, y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.

3.12 Medición

Conjunto de operaciones que tiene por objeto determinar el valor de una magnitud.

3.13 Mensurando

Magnitud particular sujeta a medición.

3.14 Muestra compuesta

La que resulta de mezclar un número de muestras simples. Para conformar la muestra compuesta, el volumen de cada una de las muestras simples deberá ser proporcional al caudal de la descarga en el momento de su toma.

3.15 Muestra simple

La que se tome en el punto de descarga, de manera continua, en día normal de operación que refleje cuantitativa y cualitativamente él o los procesos más representativos de las actividades que generan la descarga, durante el tiempo necesario para completar cuando menos, un volumen suficiente para que se lleven a cabo los análisis necesarios para conocer su composición, aforando el caudal descargado en el sitio y en el momento de muestreo.

3.16 Parámetro

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

3.17 Patrón (de medición)

Material de referencia, instrumento de medición, medida materializada o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud para utilizarse como referencia.

3.18 Patrón nacional (de medición)

Patrón reconocido por una decisión nacional en un país, que sirve de base para asignar valores a otros patrones de la magnitud concerniente.

3.19 Patrón primario

Patrón que es designado o reconocido ampliamente como un patrón que tiene las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor es aceptado sin referencia a otros patrones de la misma magnitud.

3.20 Patrón secundario

Patrón cuyo valor es establecido por comparación con un patrón primario de la misma magnitud.

3.21 Patrón de referencia

Patrón, en general de la más alta calidad metrológica disponible en un lugar dado, o en una organización determinada del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar.

3.22 Patrón de trabajo

Patrón que es usado rutinariamente para calibrar o controlar las medidas materializadas, instrumentos de medición o los materiales de referencia.

3.23 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento analítico se aplica repetidamente a diferentes alícuotas o porciones de una muestra homogénea. Usualmente se expresa en términos del intervalo de confianza o incertidumbre:

$$x = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

donde:

\bar{x} es la media calculada a partir de un mínimo de tres mediciones independientes;

$t_{\alpha/2}$ es el valor de la t de Student para un nivel de significancia del 95 %;



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

s es la desviación estándar de la muestra;
 n es el número de réplicas, y
 x es el resultado que incluye el intervalo de confianza.

3.24 Trazabilidad

Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por la cual pueda ser relacionado a referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbres determinadas.

3.25 Verificación de la calibración

Una verificación periódica de que no han cambiado las condiciones del instrumento en una forma significativa.

4 EQUIPO Y MATERIALES

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

4.1 Equipo

4.1.1 Balanza analítica con precisión de 0,1 mg

4.1.2 Potenciómetro para medición de pH

4.2 Materiales

Todo el material volumétrico utilizado en este método debe ser de clase A con certificado, o en su caso debe estar calibrado.

4.2.1 Frascos para muestreo de polietileno, polipropileno o vidrio de boca ancha de 500 mL de capacidad.

4.2.2 Bureta con certificado o en su caso debe estar calibrada

5 REACTIVOS Y PATRONES

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se especifique otra cosa.

Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características: a)

Resistividad, megohm-cm a 25°C: 0,2 min; b) Conductividad, $\mu\text{S/cm}$ a 25°C: 5,0 Máx. y c) pH: 5,0 a 8,0.

- 5.1 Nitrato de plata (AgNO_3)
- 5.2 Cloruro de sodio (NaCl)
- 5.3 Cromato de potasio (K_2CrO_4)
- 5.4 Hidróxido de sodio (NaOH)
- 5.5 Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- 5.6 Sulfato de aluminio y potasio dodecahidratado [$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$]
- 5.7 Amoníaco concentrado (NH_3)
- 5.8 Disolución indicadora de cromato de potasio. Pesar aproximadamente y con precisión 50,0 g de cromato de potasio (ver inciso 5.3) y disolver en 500 mL de agua y añadir disolución patrón de nitrato de plata (ver inciso 5.9) hasta que se produzca un precipitado rojo claro. Proteger la disolución de la luz y dejar estabilizar durante 24 h después de la adición de la disolución de nitrato de plata. Filtrar la disolución para remover el precipitado y aforar a 1 L con agua.
- 5.9 Disolución estándar de nitrato de plata (0,014N). Moler aproximadamente 5,0 g de cristales de nitrato de plata (ver inciso 5.1) y secar a 100°C durante 2 h. Pesar aproximadamente y con precisión 2,4 g de los cristales pulverizados de nitrato de plata (ver inciso 5.1) disolverlos en aproximadamente 1 L. Valorar contra la disolución patrón de cloruro de sodio 0,014N (ver inciso 5.10).
- 5.10 Disolución patrón de cloruro de sodio (0,014N). Secar aproximadamente 3,0 g de cloruro de sodio (ver inciso 5.2) a 140°C. Pesar aproximadamente y con precisión 824,1 mg de la sal seca disolver en agua y aforar a 1 L en un matraz volumétrico. Se acepta el uso de patrón certificado.
- 5.11 Disolución de hidróxido de sodio (0,1N). Pesar aproximadamente y con precisión 4,0 g de hidróxido de sodio (ver inciso 5.4) disolver en 1 L de agua.
- 5.12 Disolución de ácido sulfúrico (0,1N). Tomar cuidadosamente 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (ver inciso 5.5) y llevar a 1 L.
- 5.13 Suspensión de hidróxido de aluminio. Pesar aproximadamente y con precisión 125,0 g de sulfato de aluminio y potasio (ver inciso 5.6) o sulfato de aluminio y amonio, y llevar a 1 L con agua. Calentar a 60°C y añadir 55



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

mL de amoníaco (ver inciso 5.7) lentamente y agitando. Permitir reposar la disolución durante unas horas, decantar el agua sobrenadante y lavar el precipitado por adiciones sucesivas de agua, mezclando bien y decantando. Repetir el procedimiento anterior hasta eliminar el olor a amoníaco. Cuando está recién preparada, la suspensión ocupa un volumen aproximado de 1 L.

6 RECOLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- 6.1 Se deben tomar las muestras en envases limpios de polietileno o de vidrio. Pueden utilizarse muestras compuestas o simples. Tomar un volumen de 500 mL
- 6.2 Se debe preservar la muestra a 4°C hasta su análisis.
- 6.3 El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de una semana.

7 CONTROL DE CALIDAD

- 7.1 Cada laboratorio que utilice este método debe operar un programa de control de calidad (CC) formal.
- 7.2 El laboratorio debe mantener los siguientes registros:
 - Los nombres y títulos de los analistas que ejecutaron los análisis y el encargado de control de calidad que verificó los análisis, y
 - Las bitácoras manuscritas del analista y del equipo en los que se contengan los siguientes datos:
 - a) Identificación de la muestra;
 - b) Fecha del análisis;
 - c) Procedimiento cronológico utilizado;
 - d) Cantidad de muestra utilizada;
 - e) Número de muestras de control de calidad analizadas;
 - f) Trazabilidad de las calibraciones de los instrumentos de medición;
 - g) Evidencia de la aceptación o rechazo de los resultados, y
 - h) Además el laboratorio debe mantener la información original reportada por los equipos en disquetes o en otros respaldos de información.

De tal forma que permita a un evaluador externo reconstruir cada determinación mediante el seguimiento de la información desde la recepción de la muestra hasta el resultado final.

- 7.3 Cada vez que se adquiera nuevo material volumétrico debe de realizarse la verificación de la calibración de éste tomando una muestra representativa

del lote adquirido.

8 CALIBRACIÓN

Se debe contar con la calibración de los equipos y materiales siguientes:

- 8.1 Material volumétrico.
- 8.2 Balanza analítica.
- 8.3 Potenciómetro
- 8.4 Bureta

9 PROCEDIMIENTO

- 9.1 Acondicionamiento de la muestra
 - 9.1.1 Utilizar un volumen de muestra de 100 mL. Ajustar el pH entre 7 y 10 utilizando las disoluciones de hidróxido de sodio (0,1N) (ver inciso 5.11) y/o ácido sulfúrico (0,1N) (ver inciso 5.12).
 - 9.1.2 Si la muestra tiene mucho color, añadir de 3 mL a 5 mL de la suspensión de hidróxido de aluminio (ver inciso 5.13) antes de acondicionar. Mezclar, dejar sedimentar y filtrar con papel filtro cualitativo.
- 9.2 Valoración
 - 9.2.1 A 100 mL de muestra acondicionada, adicionar 1 mL de disolución indicadora de cromato de potasio (ver inciso 5.8). Valorar con la disolución patrón de nitrato de plata (ver inciso 5.9) hasta el vire de amarillo a naranja rojizo, manteniendo un criterio constante en el punto final.
 - 9.2.2 Titular un blanco con las muestras.

10 CÁLCULOS

- 10.1 Calcular la concentración de iones Cloruro en la muestra original, en mg/L como sigue:

$$\text{Cl- mg /L} = [(A - B) \times N \times 35,450] / \text{mL de muestra}$$

donde:

- A son los mL de disolución de nitrato de plata gastados en la valoración de la muestra;
- B son los mL de disolución de nitrato de plata gastados en la valoración del blanco, y
- N es la normalidad del nitrato de plata.
- 10.2 Todos los valores obtenidos de control de calidad deben ser reportados junto con los resultados del análisis.
- 10.3 Reportar los resultados en Cl mg/L, con la precisión correspondiente.

11 INTERFERENCIAS

- 11.1 Los iones bromuro, yoduro y cianuro se registran como concentraciones equivalentes de cloruro.
- 11.2 Los iones sulfuro, tiosulfato y sulfito interfieren.
- 11.3 El ortofosfato en concentraciones mayores de 25 mg/L interfiere ya que precipita como fosfato de plata.
- 11.4 El hierro con concentraciones arriba de 10 mg/L interfiere porque enmascara el punto final de la valoración.

12 SEGURIDAD

- 12.1 No ha sido determinada la carcinogenicidad de todos los reactivos con precisión. Por lo que cada sustancia química debe tratarse como peligro potencial a la salud. La exposición a estas sustancias debe reducirse al menor nivel posible. Se sugiere que el laboratorio realice monitoreos de higiene ocupacional de cada reactivo a los que pueda estar expuesto el analista y que dichos resultados se encuentren a su disposición.
- 12.2 Este método puede no mencionar todas las precauciones de seguridad asociadas con su uso. El laboratorio es responsable de mantener un ambiente de trabajo seguro y un archivo de las normas de seguridad respecto a la exposición y manejo seguro de las sustancias químicas



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

especificadas en este método. Debe tenerse un archivo de referencia de las hojas de información de seguridad el cual debe estar disponible a todo el personal involucrado en estos análisis.

- 12.3 Cuando se trabaje con cualquiera de los compuestos químicos descritos en este método, debe usar todo el tiempo equipo de seguridad, tal como: batas, guantes de látex y lentes de seguridad.
- 12.4 La preparación de todos los reactivos usados en este método debe efectuarse bajo una campana de extracción. Consulte las hojas de seguridad sobre manipulación y disposición de estos.

13 MANEJO DE RESIDUOS

Desecho de residuos: Una vez concluida la determinación de los residuos generados deben neutralizarse antes de su disposición final.

- 13.1 Es la responsabilidad del laboratorio cumplir con todos los reglamentos federales, estatales y locales referentes al manejo de residuos, particularmente las reglas de identificación, almacenamiento y disposición de residuos peligrosos.
- 13.2 Los residuos de las titulaciones deben de almacenarse adecuadamente y ser dispuestos conforme lo señala la reglamentación aplicable para residuos peligrosos.

14 BIBLIOGRAFÍA

- | | |
|-------------------|--|
| NOM-001-ECOL-1996 | Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997. |
| NOM-008-SCFI-1993 | Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993. |
| NMX-AA-003-1980 | Aguas residuales - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la |



Federación el 25 de marzo de 1980.

NMX-AA-008-SCFI-2000 Análisis de agua – Determinación del pH – Método de prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de diciembre de 2000.

NMX-AA-014-1980 Cuerpos receptores - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de septiembre de 1980.

NMX-AA-089/1-1986 Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario - Parte 1. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de julio de 1986.

NMX-AA-115-SCFI-2001 Análisis de agua - Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.

NMX-AA-116-SCFI-2001 Análisis de agua - Guía de solicitud para la presentación de métodos alternos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.

ASTM - D 512-89 "Standard Test Methods for Chloride Ion in Water", American Society for Testing and Materials, USA, ASTM Committee on Standards, Philadelphia PA, Diciembre 1989, pp. 481-484.

Método 9253 "Chloride (Titrimetric, Silver Nitrate)", Environmental Protection Agency, "Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes", Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio, 1994, pp. 1- 6.

Método 4500 Cl- B "Argentometric Method", American Public Health Association, "Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater", American Public Health Association, United States of America, Washington, DC 20005, 19th Edition 1995, pp. 4-48, 4-50.

15 **CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES**

Esta norma mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.



**SECRETARÍA DE
ECONOMÍA**

**NMX-AA-073-SCFI-2001
13/13**

**MÉXICO D.F., A
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS**

MIGUEL AGUILAR ROMO

JADS/AFO/DLR/MRG

NMX-AA-073-SCFI-2001

**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE CLORUROS
TOTALES EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y
RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A
LA NMX-AA-073-1981)**

**WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF TOTAL CHLORINE IN
NATURAL WATER, WASTEWATERS AND WASTEWATERS
TREATED - TEST METHOD**



P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- CASA ROCAS, S.A. DE C.V.
- CENTRO DE SERVICIOS QUÍMICOS DE AGUASCALIENTES
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- COMISIÓN ESTATAL DE AGUA Y SANEAMIENTO
- COMISIÓN FEDERAL DE ELECTRICIDAD
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE
- CORPORACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES
- FISHER SCIENTIFIC MEXICANA, S.A. DE C.V.
- GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica;
Dirección General de Normatividad y Apoyo Técnico.
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA



- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES
Campus Monterrey.
- LABORATORIO DE ECOLOGÍA INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE PEMEX PERFORACIÓN Y MANTENIMIENTO DE
POZOS
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUÍMICO INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE
C.V.
- MERCK- MÉXICO, S.A. DE C.V.
- NOVAMANN, S.A. DE C.V.
Laboratorio Control Químico.
- PERKIN ELMER DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA CANGREJERA, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA MORELOS, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA PAJARITOS, S.A. DE C.V.



- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- SECRETARÍA DE SALUD
- SERVICIOS AMBIENTALES MULTIPLES E INGENIERÍA, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE INGENIERÍA Y CONSULTORÍA AMBIENTAL, S.A. DE C.V.
- SISTEMA INTERMUNICIPAL DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Azcapotzalco.
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química;
Instituto de Geofísica;
Instituto de Ingeniería.
- VARIAN, S.A. DE C.V.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo	Página
0 Introducción	1



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

NMX-AA-073-SCFI-2001

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



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA
CONDUCTIVIDAD ELECTROLÍTICA - MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA A LA NMX-AA-093-1984)**

**WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF ELECTROLITICAL
CONDUCTIVITY - TEST METHOD**

0 INTRODUCCIÓN

La conductividad electrolítica es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones, de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentraciones relativas, así como de la temperatura.

La determinación de conductividad es de gran importancia pues da una idea del grado de mineralización del agua natural, potable, residual, residual tratada, de proceso o bien del agua para ser usada en el laboratorio en análisis de rutina o para trabajos de investigación.

El valor de conductividad es un parámetro regulado por límites máximos permisibles en descargas de aguas residuales al alcantarillado o a cuerpos receptores, también es un parámetro de calidad del agua para usos y actividades agrícolas, para contacto primario y para el consumo humano.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método de prueba para la determinación de la conductividad electrolítica en agua y es aplicable para agua potable, natural, tratada, residual, salina y residual tratada.

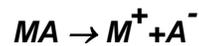


SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

2 PRINCIPIO

Este método se basa en la propiedad que adquiere el agua de conducir la corriente eléctrica cuando tiene iones disueltos.

La conducción de la corriente eléctrica en agua, puede explicarse por medio de la disociación electrolítica. Cuando se disuelve en agua un ácido, una base o una sal, una porción se disocia en iones positivos y otra en negativos



Los iones se mueven independientemente y se dirigen a los electrodos de carga opuesta mediante la aplicación de un campo eléctrico.

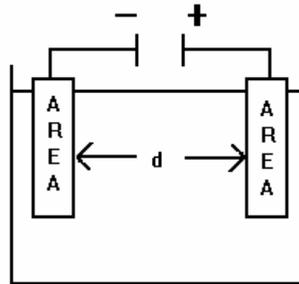
La cantidad de moléculas que se han disociado depende de la concentración de la solución. Las soluciones, al igual que los conductores metálicos obedecen a la Ley de Ohm, excepto en voltajes muy elevados y corrientes de frecuencia muy alta.

Si en una solución electrolítica se colocan dos electrodos de área A separados por una distancia d, y se aplica un campo eléctrico E, la diferencia de potencial V entre los electrodos será proporcional a la distancia d y al campo eléctrico E.

$$V=dE \tag{1}$$

donde:

- V es la diferencia de potencial entre los electrodos en volts;
- E es el campo eléctrico aplicado en amperes, y
- D es la distancia de separación entre las placas en cm.



La conductancia específica o conductividad σ es inversamente proporcional a la resistencia eléctrica y está definida por la relación :

$$\sigma = \frac{J}{E} \quad (2)$$

donde:

J es la densidad de corriente, y
E es la carga eléctrica.

La densidad de corriente J se define a su vez por la ecuación:

$$J = \frac{I}{A} \quad (3)$$

donde:

I es la intensidad de corriente, y
A es el área.

Combinando las ecuaciones (1), (2), y (3) se obtiene que la diferencia de potencial V es:

$$V = \frac{I d}{A} \quad (4)$$



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

Al valor $d/\sigma A$ se le conoce como la resistencia que presenta la disolución al paso de la corriente y se denota por la letra R .

$$R = \frac{d}{\sigma A} \quad (5)$$

Por lo que la ecuación (4) se transforma en la ley de Ohm.

$$V = \frac{IR}{\sigma} \quad (6)$$

De la ecuación (5) se obtiene que las unidades de la conductancia específica son:

$$\sigma = \frac{d}{RA} = \frac{\text{cm}}{\text{ohm} \times \text{cm}^2} = \frac{1}{\text{ohm} \times \text{cm}} = \frac{\text{Siemen}}{\text{cm}} \quad (7)$$

La ecuación anterior permite el cálculo de la conductancia específica de la disolución conociendo su resistencia y las dimensiones de la celda de conductividad.

Se define como constante K de la celda de conductividad a la relación existente entre la distancia de los electrodos d , y su área A

$$K = \frac{d}{A} \quad (8)$$

Por lo que la fórmula de conductividad está dada por :

$$\sigma = \frac{K}{R} \quad (9)$$

Una vez medida la resistencia de la solución o su inverso la conductividad y conociendo la constante de la celda se conoce la conductancia específica de la solución σ .

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Aguas naturales



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

Agua cruda, subterránea, de lluvia, de tormenta, de tormenta residual y superficial.

3.2 Aguas residuales

Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticos y similares, así como la mezcla de ellas.

3.3 Bitácora

Cuaderno de laboratorio debidamente foliado e identificado, en el cual los analistas anotan todos los datos de los procedimientos que siguen en el análisis de una muestra, así como todas las informaciones pertinentes y relevantes a su trabajo en el laboratorio. Es a partir de dichas bitácoras que los inspectores pueden reconstruir el proceso de análisis de una muestra tiempo después de que se llevó a cabo.

3.4 Calibración

Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones, efectuando una corrección del instrumento de medición para llevarlo a las condiciones iniciales de funcionamiento.

3.5 Calibración inicial

El análisis de un mínimo de tres concentraciones distintas de estándares de los analitos de interés. Una concentración deberá estar cerca del límite de detección del método (LDM) y otra cercana al límite del intervalo lineal del método (LIL).

3.6 Conductancia

Es la propiedad que tiene una sustancia de permitir el paso de la corriente eléctrica originada por una diferencia de potencial. Se expresa en siemens (S) equivalente a Ohm a la menos uno (Ω^{-1}).

3.7 Conductividad electrolítica ó conductancia específica.(σ)

Recíproco de la resistencia en Ohms medida entre las caras opuestas de 1 cm^3 de solución acuosa a una temperatura específica.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

$$\sigma = \frac{1}{R_s} = \frac{K}{R_m} \left[\frac{\text{Siemens}}{\text{centímetro}} \right] \frac{\text{S}}{\text{cm}}$$

donde:

R_s es la resistencia específica, y
 R_m es la resistencia medida.

Unidades:

$$1 \frac{\text{S}}{\text{cm}} \left[\frac{\text{S}}{\text{cm}} \right] = 10^4 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}} = 10^3 \frac{\text{mS}}{\text{m}}$$

3.8 Constante de celda(K)

A la relación que existe entre la distancia de los electrodos d , y su área A

$$K = \frac{d}{A} = \frac{1}{\text{cm}} = \text{cm}^{-1}$$

3.9 Descarga

Acción de verter, infiltrar o depositar o inyectar aguas residuales a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita, cuando éste es un bien del dominio público de la Nación.

3.10 Desviación estándar experimental

Para una serie de n mediciones del mismo mensurando, es la magnitud s que caracteriza la dispersión de los resultados, dado por la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

En donde x_i es el resultado de la i -ésima medición y \bar{x} es la media aritmética de los n resultados considerados.

3.11 Disolución estándar

Disolución de concentración conocida preparada a partir de un patrón primario.

3.12 Disolución madre

Corresponde a la disolución de máxima concentración en un análisis. Es a partir de esta disolución que se preparan las disoluciones de trabajo.

3.13 Error aleatorio

Resultado de una medición menos la medida que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad.

3.14 Error de medición

Resultado de un mensurando menos un valor verdadero del mensurando o un valor convencionalmente verdadero.

3.15 Error relativo

Error de medición dividido por un valor verdadero o convencionalmente verdadero del mensurando.

3.16 Error sistemático

Medida que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad menos un valor verdadero del mensurando.

3.17 Exactitud

Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurando.

3.18 Material de referencia



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL

DGN

Material o sustancia en el cual uno o mas valores de sus propiedades son suficientemente homogéneas y bien definidas, para ser utilizadas para la calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición, o para asignar valores a los materiales.

3.19 Material de referencia certificado

Material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de las propiedades están certificados por un procedimiento que establece la trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad, y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.

3.20 Medición

Conjunto de operaciones que tiene por objeto determinar el valor de una magnitud.

3.21 Mensurando

Magnitud particular sujeta a medición.

3.22 Muestra compuesta

La que resulta de mezclar un número de muestras simples. Para conformar la muestra compuesta, el volumen de cada una de las muestras simples deberá ser proporcional al caudal de la descarga en el momento de su toma.

3.23 Muestra simple

La que se tome en el punto de descarga, de manera continua, en día normal de operación que refleje cuantitativa y cualitativamente el o los procesos más representativos de las actividades que generan la descarga, durante el tiempo necesario para completar cuando menos, un volumen suficiente para que se lleven a cabo los análisis necesarios para conocer su composición, aforando el caudal descargado en el sitio y en el momento de muestreo.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

3.24 Parámetro

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

3.25 Patrón (de medición)

Material de referencia, instrumento de medición, medida materializada o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud para utilizarse como referencia.

3.26 Patrón nacional (de medición)

Patrón reconocido por una decisión nacional en un país, que sirve de base para asignar valores a otros patrones de la magnitud concerniente.

3.27 Patrón primario

Patrón que es designado o reconocido ampliamente como un patrón que tiene las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor es aceptado sin referencia a otros patrones de la misma magnitud.

3.28 Patrón de referencia

Patrón, en general de la más alta calidad metrológica disponible en un lugar dado, o en una organización determinada del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar

3.29 Patrón secundario

Patrón cuyo valor es establecido por comparación con un patrón primario de la misma magnitud.

3.30 Patrón de trabajo



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

Patrón que es usado rutinariamente para calibrar o controlar las medidas materializadas, instrumentos de medición o los materiales de referencia.

3.31 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento analítico se aplica repetidamente a diferentes alícuotas o porciones de una muestra homogénea. Usualmente se expresa en términos del intervalo de:

$$x = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

donde:

- \bar{x} es la media calculada a partir de un mínimo de tres mediciones independientes;
- $t_{\alpha/2}$ Se debe emplear el valor de la t de Student para un nivel de significancia del 95 %;
- s es la desviación estándar de la muestra;
- n es el número de réplicas, y
- x es el resultado que incluye el intervalo de confianza.

3.32 Resistencia(R)

Es la propiedad que tiene una sustancia de oponerse al paso de una corriente eléctrica originada por una diferencia de potencial, se expresa en Ohm(Ω). La resistencia de un conductor es inversamente proporcional a su área de sección transversal y directamente proporcional a su longitud.

3.33 Resistividad electrolítica (R)

La resistencia en Ohms medida entre las caras opuestas de 1 cm³ de una solución acuosa a una temperatura específica.

Unidades Ohmcm= Ω ohm-cm

3.34 Trazabilidad



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL

DGN

Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por la cual pueda ser relacionado a referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbres determinadas.

3.35 Verificación de la calibración

Una verificación periódica de que no han cambiado las condiciones del instrumento en una forma significativa.

4 REACTIVOS Y PATRONES

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se especifique otra cosa.

Antes de preparar las disoluciones patrón el agua debe prepararse como a continuación se indica: hervir el agua bidestilada o desionizada durante 15 min y enfriarla en condiciones de protección contra la redisolución de CO₂ atmosférico. Minimizar el contacto con la atmósfera.

- Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características:
a) Resistividad: megohm-cm a 25°C: 0,2 min; b) Conductividad: $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C: 5,0 Máx.; c) pH: 5,0 a 8,0;
- Alcohol, 95% Alcohol Etilico, Alcohol Isopropilico, o Alcohol Metilico;
- Agua regia. Mezclar 3 volúmenes de Acido Clorhídrico concentrado, (HCl, 38%, d= 1,19) con 1 volumen de Acido Nítrico concentrado, (HNO₃, d= 1,42);
- Éter Etilico;
- Ácido Clorhídrico concentrado (HCl, 38 %, d= 1,19);
- Acido Cloroplatínico (H₂PtCl₆ 6H₂O);
- Acetato de Plomo Pb(C₂H₃O₂)₂;
- HCl (1+1). Mezclar 1 volumen de Acido Clorhídrico concentrado con 1 volumen de agua;
- Disolución de platinización. Disolver 1,5 g. de Acido Cloroplatínico en 50 mL de agua conteniendo 0,012 5 g de Acetato de Plomo;
- Cloruro de Potasio;
- Cloruro de Sodio;
- Disolución A, patrón de Cloruro de Potasio 0,1 mol/L: secar el Cloruro de Potasio, disolver 7,456 g en agua a 25 °C y aforar a 1 000mL. La conductividad de la solución a 25°C es de 1 290 mS/m;



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- Disolución B, patrón de Cloruro de Potasio 0,01mol/L. Diluir 100mL de la disolución de 0,1 mol/L con agua a 1 000mL a 25°C. La conductividad de la disolución a 25°C es de 141 mS/m;
- Disolución C, patrón de Cloruro de Potasio 0,001mol/L. Diluir 100 mL de la disolución B con agua a 1 000mL a 25°C. La conductividad de la solución a 25°C es de 14,7 mS/m, y
- Disolución D, patrón de Cloruro de Sodio 1 000mg/L. Secar a 105 °C durante 2 h. Pesar 1,000 0 g de NaCl y disolver en agua a 25 °C, aforar a 1 000mL. La conductividad de la disolución a 25°C es de 199 mS/m.

TABLA 1.- Conductividad electrolítica de disoluciones de Cloruro de Potasio

Concentración de Cloruro de Potasio (KCl) mol/L	Conductividad electrolítica a 25°C mS/m
0,000 5	7,4
0,001	14,7
0,005	72
0,01	141
0,02	277
0,05	670
0,1	1 290
0,2	2 480

TABLA 2.- Conductividad electrolítica de soluciones de Cloruro de Sodio

Concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) mol/L	Conductividad electrolítica a 25°C mS/m
0,001	12,4
0,01	118,6
0,1	1 066
0,5	4 665



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- Todo el material volumétrico utilizado en este procedimiento debe ser clase A con certificado o en su caso debe estar calibrado;
- Termómetro;
- Celda de conductividad;
 - Celda de conductividad tipo electrodo de platino. Este tipo de celda es en forma de pipeta o de inmersión. La elección de la celda depende de la amplitud esperada de conductividad y de la amplitud de resistencia del instrumento.
 - Las celdas de flujo continuo (directo) o en línea deben ser usadas para mediciones de conductividades abajo de $10 \mu\text{S/cm}$, para evitar contaminación de la atmósfera. Se recomienda que el flujo a través de la celda sea de $0,3\text{m/s}$.
- Electrodo de platino o platinizados. Los electrodos platinizados pueden ser usados para todas las determinaciones, excepto para conductividades abajo de $0,1 \mu\text{S/cm}$. No son muy recomendables para agua residual, se contaminan fácilmente, y
- Electrodo hechos de metales comunes duraderos (acero inoxidable entre otros) para mediciones continuas en campo o rutinarias. La calibración de estas celdas debe realizarse mediante el uso de una solución patrón y mediante comparación de la conductividad de la muestra con los resultados obtenidos con un instrumento de laboratorio.

TABLA 3.- Constantes de celda recomendadas para varios rangos de conductividad

Rango de conductividad, $\mu\text{S/cm}$	Constante de celda, cm^{-1}
0,05 a 20	0,01
1 a 200	0,1
10 a 2 000	1
100 a 20 000	10
1 000 a 200 000	50

6 EQUIPO

- Medidor de conductividad (Conductímetro).- Consistente en una fuente de corriente alterna, un puente de Wheatstone o equivalente, un indicador de valor nulo y una celda de conductividad u otro instrumento que mida el índice de corriente alterna y su voltaje a través de la celda, proporcionando una lectura lineal de la conductividad, con compensador de temperatura manual o automático. Para mediciones en campo, se requiere de un equipo portátil que posea las



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL

DGN

- mismas características que el equipo de laboratorio;
- Un instrumento que mida la conductividad con un error que no exceda el 1% o $1\mu\text{S}/\text{cm}$, y
 - Balanza analítica con precisión de 0,1 mg.

7 RECOLECCIÓN, PRESERVACION Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- 7.1 Cuando sea posible, debe efectuarse la determinación de conductividad directamente en el punto de muestreo sin extraer muestra; si no es posible, tome un volumen mínimo requerido según el instrumento empleado en un envase de polietileno limpio y determine la conductividad de inmediato.
- 7.2 La determinación de conductividad debe realizarse lo más pronto posible, en especial cuando existe la posibilidad de un intercambio de gases tales como Dióxido de Carbono (CO_2) y Amonio (NH_4^+) con la atmósfera, o una posible actividad biológica. Si no es posible la determinación en el sitio de muestreo tomar la muestra en un recipiente de polietileno de alta densidad, con sello hermético, y llenar completamente el recipiente

No requiere de ningún conservador, la actividad biológica puede reducirse mediante la refrigeración a 4°C y en la oscuridad. Tomar la temperatura del agua en el sitio de muestreo. Analizar lo más pronto posible o antes de 24 h.

8 CONTROL DE CALIDAD

- 8.1 Cada laboratorio que utilice este método está obligado a operar un programa de control de calidad formal.
- 8.2 Es obligatorio para el laboratorio mantener los siguientes registros:
- Los nombres y títulos de los analistas que ejecutaron los análisis y el encargado de control de calidad que verificó los análisis, y
 - Las bitácoras manuscritas del analista y del equipo en los que se contengan los siguientes datos:
 - a) Identificación de la muestra;
 - b) Fecha del análisis;



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- c) Procedimiento cronológico utilizado;
- d) Cantidad de muestra utilizada;
- e) Número de muestras de control de calidad analizadas;
- f) Trazabilidad de las calibraciones de los instrumentos de medición;
- g) Evidencia de la aceptación o rechazo de los resultados, y
- h) Además el laboratorio debe mantener la información original reportada por los equipos en disquetes o en otros respaldos de información.

De tal forma que permita a un evaluador externo reconstruir cada determinación mediante el seguimiento de la información desde la recepción de la muestra hasta el resultado final.

- 8.3 Las lecturas de la balanza analítica utilizada para efectuar las pesadas de los reactivos deben de ser trazables a los patrones del Centro Nacional de Metrología

9 CALIBRACION

- 9.1 Calibración del medidor de conductividad: Si el equipo no se usa frecuentemente, calibre el instrumento antes de cada determinación.

Para determinaciones frecuentes establezca la frecuencia de calibración dependiendo de la estabilidad del instrumento utilizado.

- 9.1.1 Seguir las instrucciones del fabricante para la operación del instrumento.

- 9.1.2 Para efectuar la calibración la disoluciones patrón deben estar a 25°C preferentemente o a la temperatura ambiente.

- 9.1.3 El instrumento debe ser calibrado con una disolución patrón de Cloruro de Potasio (KCl) o de Cloruro de Sodio (NaCl) cuyo valor de conductividad sea conocido y esté cercano al intervalo de la conductividad esperada y de la amplitud de resistencia del instrumento, cada vez que se cambie de celda, se platinizen los electrodos o exista alguna causa para dudar de la precisión de las lecturas.

NOTA.- Las tablas 1 y 2 muestran concentraciones de disoluciones que pueden ser usadas como patrones para la calibración del instrumento.

- 9.1.4 Enjuagar la celda con porciones de la disolución patrón antes de realizar la calibración para evitar contaminación por electrolitos.



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- 9.1.5 Sumergir la celda en la disolución patrón, el nivel de la disolución debe cubrir los orificios de ventilación de la celda, agitar la celda verticalmente para expulsar las burbujas de aire.
- 9.1.6 Seleccionar el rango adecuado de medición en el instrumento, si la lectura no es la correspondiente a la disolución patrón, ajustar con el control de calibración hasta que la lectura del instrumento corresponda al valor de la disolución.
- 9.2 Determinación de la constante de celda

Enjuagar la celda de conductividad al menos con tres porciones de disolución de Cloruro de Potasio (KCl) 0,01 M. Ajustar la temperatura de la cuarta porción a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, medir la resistencia y anotar el valor de la temperatura. Calcular la constante de celda con la siguiente ecuación:

$$K = (0,001\ 413) (R_{KCl}) + 0,019\ 1 (t - 25)$$

donde:

- R_{KCl} es la resistencia medida en ohms a 25°C ;
 t es la temperatura observada, $^{\circ}\text{C}$;
0,001 413 es la conductividad de la disolución de KCl en S/cm, y^{-1} .
0,019 1 es la constante para corrección de temperatura en $^{\circ}\text{C}^{-1}$.

10 PROCEDIMIENTO

- 10.1 Medición de la conductividad
- 10.1.1 Preparar el equipo para su uso de acuerdo a las instrucciones del fabricante y seleccionar un electrodo con la constante de celda apropiada para el intervalo de medición en que se usará.
- 10.1.2 La cantidad de la muestra depende del equipo por usar.
- 10.1.3 Las muestras y la disolución de calibración deben estar a 25°C de preferencia o a la temperatura ambiente.
- 10.1.4 Determinar la temperatura de la muestra.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- 10.1.5 Enjuagar la celda con porciones de la disolución de prueba antes de realizar la medición para evitar contaminación de la muestra por electrolitos.
- 10.1.6 Sumergir la celda en la disolución de prueba, el nivel de la disolución debe cubrir los orificios de ventilación de la celda, agitar la celda verticalmente para expulsar las burbujas de aire.
- 10.1.7 Seleccionar el rango adecuado de medición en el instrumento, una vez que se estabilice la lectura, anotar el valor de conductividad.
- 10.1.8 Después de cada determinación, retirar la celda de la disolución y enjuagarla con agua desionizada.
- 10.1.9 Reportar los resultados como conductancia específica o conductividad , mS/m a 25°C.

Muchos instrumentos incorporan correcciones de la constante de celda en una función integral y directamente medida de la conductividad obtenida. En su caso multiplicar el valor de la conductancia obtenida por la constante de celda para obtener la conductividad electrolítica.

El factor de conductancia de disoluciones electrolíticas en agua, es casi siempre positivo y de una magnitud de 1 a 3 % por °C, dependiendo de la concentración de los iones electrolíticos y de su naturaleza.

La temperatura de referencia en las mediciones de conductividad es de 25°C por lo que la mayoría de los instrumentos cuentan con compensador de temperatura.

Si no existe en el instrumento el compensador, es necesario ajustar la temperatura de la disolución a prueba a 25°C. No se recomienda efectuar un ajuste matemático por medio de un factor debido a su naturaleza empírica.

Existen factores de corrección por temperatura muy específicos, para la conversión de valores de conductividad de aguas naturales a distintas temperaturas en °C a la temperatura de referencia de 25°C.

10.2 Mantenimiento de electrodos

10.2.1 Preparación de electrodos

Los electrodos pueden estar deteriorados en la superficie o bien si las constantes de



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

celda no concuerdan con los límites razonables o con los valores nominales de las disoluciones patrón es necesario limpiar y replatinizar los electrodos, siempre que las lecturas sean irregulares, cuando no pueda obtenerse un punto final neto, o cuando la inspección muestre que se han desprendido capas de negro de platino.

Los electrodos de platino son usados para determinaciones de precisión.

10.2.2 Limpieza de celda

Mezclar una parte por volumen de Alcohol Isopropílico, 1 parte de etil éter, y una parte de HCl (1+1). Limpiar y enjuagar con agua desionizada.

NOTA.- Los electrodos de la celda no se deben lijar o raspar, ya que se puede desprender la capa de platino.

Para remover el negro de platino restante de los electrodos se limpian con agua regia, o por electrólisis con HCl (d= 1,19).

10.2.3 Replatinización de electrodos

Platinización de electrodos de la celda con la solución ($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$). Se requiere de una celda de platinización que consiste de una fuente de poder de 6 V. d.c., un resistor variable, un miliamperímetro y un electrodo. El depósito de platino es de color negro y debe presentar buena adherencia a la superficie del electrodo. El procedimiento de platinizado no es crítico. Una buena capa de platinizado se obtiene usando de 1,5 a 3 C/cm^2 de área de electrodo. Por ejemplo para un electrodo con 10 cm^2 de área en ambos lados, el tiempo de platinizado a una corriente de 20 mA puede ser o será de 2,5 a 25 min. La densidad de corriente puede ser desde 1 a 4 mA/cm^2 de área del electrodo. Durante el platinizado agitar ligeramente la disolución. Cuando no este en uso llenar las celdas con agua para prevenir el secado de los electrodos mientras permanecen almacenados.

11 CÁLCULOS

11.1 Si se cuenta con un conductímetro con compensador de temperatura no se requiere hacer cálculos.

11.2 Cuando se mide la resistencia de la muestra, la conductividad a 25°C es:

$$\sigma = \frac{(1 \times 10^6)K}{\text{-----}}$$



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

$$Rm1+ 0,019 1(t-25)$$

donde:

- σ es la conductividad, S/cm;
- K es la constante de celda, cm-1;
- Rm es la resistencia medida de la celda, ohms, y
- T es la temperatura de medición, °C

- 11.3 Cuando se mide la conductividad de la muestra, dicha conductividad a 25°C es :

$$\sigma = \frac{m (1X10^6)K}{1+ 0,019 1(t-25)}$$

donde:

- m es la conductividad medida, σ a t°C.

12 INTERFERENCIAS

- 12.1 Cuando el agua contenga grandes cantidades de material en suspensión es preferible dejarla sedimentar antes de medir la conductividad con objeto de disminuir la posibilidad de ensuciar el electrodo de la celda.
- 12.2 Evitar que las grasas y aceites cubran el electrodo, porque afectan la precisión de la lectura.
- 12.3 Eliminar las burbujas de aire presentes en la celda de medición.
- 12.4 La exposición de muestras a la atmósfera puede causar cambios en la conductividad/ resistividad, debido a la pérdida o ganancia de gases disueltos (CO₂ y NH₄). En caso de aguas de bajas concentraciones de materiales disueltos ionizados. El CO₂ , normalmente presente en el aire puede drásticamente cambiar la conductividad/ resistividad del agua pura. El contacto con aire puede evitarse usando celdas en línea o de flujo continuo.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

13 SEGURIDAD

Esta norma no especifica todas las normas de seguridad que deben observarse durante su aplicación. Es responsabilidad del usuario observar las reglas generales y particulares de higiene y seguridad aplicables a las operaciones de muestreo y al manejo de equipos, materiales y reactivos químicos especificados en esta norma.

14 MANEJO DE RESIDUOS

- 14.1 Es responsabilidad del laboratorio cumplir con todos los reglamentos federales, estatales y locales referentes al manejo de residuos, particularmente las reglas de identificación, almacenamiento y eliminación de residuos peligrosos.
- 14.2 En pruebas de campo, después de realizar la determinación, la muestra que se haya tomado se regresa al cuerpo de agua muestreado.

15 BIBLIOGRAFÍA

- NOM-001-ECOL-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997.
- NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993
- NMX-AA-003-1980 Aguas residuales.- Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.
- NMX-AA-007-SCFI-2000 Análisis de agua - Determinación de la temperatura en aguas naturales y residuales - Método de prueba.
- NMX-AA-014-1980 Cuerpos receptores.- Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de septiembre de 1980.
- NMX-AA-089/1-1986 Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario -



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

Parte 1. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de julio de 1986

NMX-AA-115-SCFI-2000 Análisis de agua.- Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos.

NMX-AA-116-SCFI-2000 Análisis de agua - Guía de solicitud para la presentación de métodos alternos.

Draft International Standard ISO/ DIS 7888- 1985 Water Quality- Determination of Electrical Conductivity.

ASTM Designation D 1125-82, Standard Test Methods for Electrical Conductivity and Resistivity of Water

Method 120.1 EPA .Conductancia. revisión 1982.

2510 B "Laboratory Method", American Public Health Association, "Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater", American Public Health Association, United States of America, Washington, DC 20005, 19th Edition 1995. pp. 2-43 - 2-45.

16 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

MÉXICO D.F., A

LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS.

CARMEN QUINTANILLA MADERO.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

JADS/AFO/DLR/MRG.

NMX-AA-093-SCFI-2000

**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA
CONDUCTIVIDAD ELECTROLÍTICA - MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA A LA NMX-AA-093-1984)**

**WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF ELECTROLITICAL
CONDUCTIVITY - TEST METHOD**



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- CASA ROCAS, S.A.
- CENTRO DE SERVICIOS QUIMICOS DE AGUASCALIENTES
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGIA
- COMISION ESTATAL DE AGUA Y SANEAMIENTO
- COMISION FEDERAL DE ELECTRICIDAD
- COMISION NACIONAL DEL AGUA.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE
- CORPORACION MEXICANA DE INVESTIGACION EN MATERIALES
- FISHER SCIENTIFIC MEXICANA S.A. DE C.V.
- GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL.
Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica;
Dirección General de Normatividad y Apoyo Técnico.
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO
- INSTITUTO TECNOLOGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES
Campo Monterrey.
- LABORATORIO DE ECOLOGIA INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE PEMEX PERFORACION Y MANTENIMIENTO DE
POZOS
- LABORATORIO DE QUIMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUIMICO INDUSTRIAL.
- LABORATORIOS ABC QUIMICA, INVESTIGACION Y ANALISIS, S.A. DE
C.V
- MERCK- MÉXICO, S.A.
- NOVAMANN, S.A. DE C.V.
Laboratorio Control Químico.
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PETROQUÍMICA CANGREJERA, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA MORELOS, S.A. DE C.V.
- PETROQUÍMICA PAJARITOS, S.A. DE C.V.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL

DGN

- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.

- SECRETARÍA DE SALUD

- SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA
Instituto Nacional de Ecología;
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

- SERVICIOS AMBIENTALES MULTIPLES E INGENIERIA, S.A. DE C.V.

- SERVICIOS DE INGENIERIA Y CONSULTORIA AMBIENTAL

- SISTEMA INTERMUNICIPAL DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Azcapotzalco.

- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química;
Instituto de Geofísica;
Instituto de Ingeniería.

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

- VARIAN, S.A. DE C.V.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo

Página



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

0	Introducción	1
1	Objetivo y campo de aplicación	1
2	Principio	2
3	Definiciones	4
4	Reactivos y patrones	11
5	Materiales	13
6	Equipo	14
7	Recolección, preservación y almacenamiento de muestras	14
8	Control de calidad	15
9	Calibración	16
10	Procedimiento	17
11	Cálculos	19
12	Interferencias	20
13	Seguridad	20
14	Manejo de residuos	21
15	Bibliografía	21
16	Concordancia con normas internacionales	22

08-16-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-117-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE CADMIO, ARSENICO, PLOMO, ESTAÑO, COBRE, FIERRO, ZINC Y MERCURIO EN ALIMENTOS, AGUA POTABLE Y AGUA PURIFICADA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3o. fracción XXII y XXIV, 13 fracción I, 194 fracción I, de la Ley General de Salud; 3o. fracción XI, 38 fracción II, 40 fracción I, VI, VIII, XI y XIII, 41, 43, y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; y los aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 28 de abril de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el Anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 15 de agosto de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el Proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-117-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE CADMIO, ARSENICO, PLOMO, ESTAÑO, COBRE, FIERRO, ZINC Y MERCURIO EN ALIMENTOS, AGUA POTABLE Y AGUA PURIFICADA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Centro Nacional de Parasitología Animal

Comisión Nacional del Agua

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa
LABORATORIO FERMI, S.A.
LABORATORIO ICCABI, S.A. DE C.V.
INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMEQ, S.A. DE C.V.
SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.
NORMEX

INDICE

0	INTRODUCCION
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2	FUNDAMENTO
3	DEFINICIONES
4	SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5	REACTIVOS Y MATERIALES
6	APARATOS E INSTRUMENTOS
7	PREPARACION DE LA MUESTRA
8	PROCEDIMIENTO
9	EXPRESION DE RESULTADOS
10	INFORME DE LA PRUEBA
11	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
12	BIBLIOGRAFIA
13	OBSERVANCIA DE LA NORMA
14	VIGENCIA

0. Introducción

La presencia de ciertos elementos químicos en alimentos, bebidas, agua potable y agua purificada, constituye un serio problema para la salud del hombre debido a su toxicidad.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. Esta Norma Oficial Mexicana establece los métodos de prueba de espectrometría de absorción atómica para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio presentes en alimentos, bebidas, agua purificada y agua potable.

1.2. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el porcentaje de absorción.

La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 Blanco de calibración del instrumento, es la solución del ácido usado como diluyente.

3.2 Blanco de reactivos, es la solución que contiene todos los reactivos usados en los mismos volúmenes y concentraciones en el procesamiento de la muestra. Este blanco debe seguir los pasos de digestión y preparación de la muestra.

3.3 Blanco de reactivos fortificado, es la solución que se prepara a partir de una alícuota del blanco de reactivos, añadiendo una alícuota de la solución estándar concentrada "solución madre", para dar una concentración final que produzca una absorbancia aceptable (aproximadamente 0,1) para el analito. El blanco de reactivos fortificado debe seguir el mismo esquema de digestión y preparación de la muestra.

3.4 Espectrometría, es una rama de la espectroscopia relacionada con la medición de espectros.

3.5 Espectrometría de absorción atómica, es una rama del análisis instrumental en el cual un elemento es atomizado en forma tal que permite la observación, selección y medida de su espectro de absorción.

3.5.1 Espectrometría de absorción atómica por flama, es el método por el cual el elemento se determina mediante un espectrómetro de absorción atómica, usado en conjunto con un sistema de nebulización y una fuente de atomización.

La fuente de atomización es un quemador que utiliza diferentes mezclas de gases, las más frecuentes son aire-acetileno y óxido nitroso-acetileno.

3.5.2 Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito, es el método mediante el cual el elemento se determina por un espectrómetro de absorción atómica, usado en conjunto con un horno de grafito. El principio es esencialmente el mismo que en absorción atómica de aspiración directa en flama, excepto que se usa un horno en lugar de la flama para atomizar la muestra.

3.5.3 Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros, es un método similar al del vapor frío. Las muestras reaccionan en un dispositivo externo con un agente reductor, generalmente borohidruro. Los productos gaseosos de reacción se llevan a una celda de muestreo que se encuentra en el paso óptico del espectrómetro de absorción atómica, en este caso, los productos de reacción son hidruros volátiles. Estos compuestos moleculares no son capaces de dar una señal de absorción atómica, por lo tanto la celda se calienta para disociar el hidruro gaseoso en átomos libres. Cuando el hidruro gaseoso se disocia en la celda calentada en átomos libres, la absorción atómica crece y cae a medida que se crean los átomos y escapan de la celda de absorción. Se mide el máximo de absorción o altura de pico, como señal analítica. Los elementos que se pueden determinar con esta técnica son: As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Te y Sn.

3.5.4 Espectrometría de absorción atómica por vapor frío, este método es otra aproximación para mejorar la sensibilidad de la absorción atómica, optimizando la eficiencia de muestreo en el quemador de pre-mezcla, en donde el mercurio se reduce químicamente al estado atómico libre haciendo reaccionar la muestra con un reductor fuerte (cloruro estanoico o borohidruro de sodio) en un recipiente de reacción cerrado. El mercurio volátil libre se arrastra del matraz de reacción burbujeando aire o nitrógeno a través de la solución. Los átomos del mercurio que se arrastran son transportados a una celda de absorción que se coloca en el paso de luz del espectrómetro de absorción atómica. A medida que los átomos de mercurio pasan por la celda de muestreo, la absorbancia medida se incrementa indicando el aumento de concentración en el paso de luz.

3.6 Espectroscopia, es una área de la física y la química dedicada al estudio de la generación, medición e interpretación de los espectros de energía (electromagnético o partícula) que resulta ya sea de la emisión o absorción de energía radiante o partículas de una sustancia cuando se le bombardea con radiación electromagnética, electrones, neutrones, protones, iones o bien por calentamiento, excitación con un campo eléctrico magnético, usada para investigar estructura nuclear y atómica.

3.7 Método de adiciones estándar, es el que implica la preparación de estándares en la matriz de la muestra, añadiendo cantidades conocidas de un estándar a una o más alícuotas de la muestra y que compensa los efectos de exaltación o depresión de la señal del analito, pero no corrige interferencias aditivas que causan una desviación de la línea de base y en la cual los resultados obtenidos son válidos si:

La curva analítica es lineal.

La forma química del analito es la misma que en la muestra.

El efecto de interferencia es constante en el intervalo de trabajo.

La señal se corrige por interferencia aditiva.

3.8 Muestra de control de calidad, es una muestra externa al laboratorio, que contiene una alícuota de concentración conocida del analito, cuyos valores de absorbancia deben estar comprendidos en el rango lineal del método.

3.9 Muestra fortificada, es la muestra a la cual se le adiciona una alícuota de concentración conocida del analito, diluida en el ácido apropiado de tal forma que la solución resultante tenga una absorbancia de 0,1 aproximadamente.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

As	arsénico
Bi	bismuto
Cd	cadmio
Cu	cobre
Fe	fierro
Ge	germanio
Hg	mercurio
Pb	plomo
Sb	antimonio
Se	selenio
Sn	estaño
Te	teluro
Zn	zinc
μmho	micromho
°C	grados Celsius
%	por ciento
lb	libra
g	gramo
cm	centímetro
kg	kilogramo
mg	miligramo
l	litro
ml	mililitro
μg	microgramo
seg	segundo
rpm	revoluciones por minuto
nm	nanómetro
RA	reactivo analítico
N	normal
M	molar
p	peso

v	volumen
/	por
LDI	límite de detección del instrumento
MCC	muestra de control de calidad
LDM	límite de detección del método
No.	número

5. Reactivos y materiales

5.1 Reactivos

Soluciones estándares de referencia certificadas de cada uno de los metales.

Agua, debe ser destilada deionizada, con un grado máximo de conductividad de 1 $\mu\text{mho/cm}$ a 25°C.

Acido nítrico (densidad específica 1,41), grado suprapuro.

Acido nítrico (densidad específica 1,41), contenido de mercurio muy bajo.

Acido perclórico (densidad específica 1,67), grado suprapuro.

Acido clorhídrico (densidad específica 1,19), grado suprapuro.

Acido sulfúrico (densidad específica 1,84), grado suprapuro.

Acido sulfúrico 1 N a partir de la solución grado suprapuro.

Acido nítrico 65% v/v grado RA.

Peróxido de hidrógeno (densidad específica 1,12).

Hidróxido de sodio granalla reactivo RA.

Aire comprimido seco y limpio.

Gases: acetileno, óxido nitroso, argón y nitrógeno, grado absorción atómica.

Solución de Nitrato de Magnesio hexahidratado al 7% p/v. Disolver 70 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml de HCl 1 N.

Acido clorhídrico 1 N. Diluir 8,3 ml de HCl y llevar a 100 ml de agua.

Acido nítrico al 50% v/v. Diluir 50 ml de HNO_3 al 65% v/v grado suprapuro en 50 ml de agua.

Acido clorhídrico 8 M. Diluir 66,0 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

Acido clorhídrico 0,5 N. Diluir 4,15 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

Solución de Yoduro de Potasio al 15% p/v. Disolver 15 g de KI en 100 ml de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).

Solución de Yoduro de Potasio al 20% p/v. Disolver 20 g de KI en 100 ml de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).

Solución de Cloruro de Potasio (10 mg/ml de K). Disolver 1,91 g de KCl en agua y diluir a 100 ml con agua.

Solución de Nitrato de Magnesio al 50% p/v. Disolver 50 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua.

Solución de ácido clorhídrico al 1,5% p/v. Diluir 1,5 ml de HCl en 100 ml de agua destilada deionizada.

Solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 1 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 ml con agua destilada deionizada.

Solución de borohidruro de sodio al 4% p/v en solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 4 g de borohidruro de sodio en 100 ml de una solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Filtrar al vacío.

Solución reductora para mercurio. Mezclar 50 ml de ácido sulfúrico concentrado con aproximadamente 300 ml de agua. Enfriar a temperatura ambiente y disolver 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato o cloruro de hidroxilamina y 25 g de cloruro o sulfato estano en solución. Diluir a 500 ml.

Solución de dilución para mercurio. En un matraz de 1 l, conteniendo de 300 a 500 ml de agua destilada deionizada, agregar 58 ml de ácido nítrico concentrado de muy baja concentración de mercurio y 67 ml de ácido sulfúrico concentrado. Diluir al volumen con agua.

Solución de trabajo de As de 1 µg/ml. Diluir 1 ml de la solución patrón de 1000 µg/ml a 1 l con ácido sulfúrico 1N preparada a partir de la solución grado suprapuro. Preparar fresca cada día.

5.2 Materiales

Matraces Kjeldahl de 500 ml y 800 ml.

Sistema de reflujo con refrigerante.

Crisoles Vycor de 40 a 50 ml de capacidad.

Crisoles de platino de 40 a 50 ml de capacidad.

Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.

Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

Matraces redondos de fondo plano de 50 ml.

Bombas Parr.

Micropipetas o pipetas de Eppendorf de diferentes capacidades.

Puntas de plástico para micropipetas.

Papel filtro Whatman N° 2.

Perlas de ebullición.

Varillas de plástico.

Tubos de ensayo graduados de propilen o propileno de 15 ml.

Recipientes de propilen o propileno.

Embudos de filtración de diferentes capacidades.

Material común de laboratorio.

Todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones.

El jabón que se use debe ser de preferencia neutro.

Enjuagar perfectamente con agua corriente.

Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia plástico) que contenga una solución de ácido nítrico grado RA al 30 %.

Dejarlo tapado y reposando por un lapso de 24 horas.

Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) con agua deionizada.

Dejar escurrir y secar.

Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire.

6. Aparatos e instrumentos

6.1 Aparatos

Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar arsénico, cadmio, cobre, estaño, hierro, mercurio, plomo y zinc.

Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga.

Automuestreador y recirculador de agua.

Placa de calentamiento con regulador que alcance una temperatura de 400 a 450 °C.

Horno de microondas.

Autoclave que alcance 121 ± 5°C o 15 lb de presión.

Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

6.2 Instrumentos

Los instrumentos que a continuación se indican deben estar calibrados y ajustados antes de su operación.

Espectrómetro de absorción atómica equipado con los accesorios para flama, horno de grafito, generador de hidruros o vapor frío, dependiendo del método a seguir.

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

Mufla capaz de mantener una temperatura de $550 \pm 10^{\circ}\text{C}$.

Horno de calentamiento (estufa) con intervalo de temperatura de $120 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

7. Preparación de la muestra

7.1 Digestión para la determinación de Cd, Cu, Fe, Pb y Zn.

7.1.1 Digestión por vía húmeda.

7.1.1.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, una cantidad apropiada de muestra.

Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos o semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

7.1.1.2 Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión.

7.1.1.3 Usar matraz de Kjeldhal o matraz conectado al sistema de refrigerantes.

7.1.1.4 Calentar suavemente.

7.1.1.5 Digerir la muestra 3 horas o más tiempo si es necesario (algunas muestras requieren la adición de mayor cantidad de ácido nítrico) hasta la aparición del color traslúcido, si queda ámbar, adicionar peróxido de hidrógeno gota a gota con agitación continua (reacción exotérmica).

7.1.1.6 Enfriar.

7.1.1.7 Recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico.

7.1.1.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

7.1.1.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica por flama u horno de grafito).

7.1.2 Digestión por vía seca.

7.1.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, una cantidad apropiada de muestra.

Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos y semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

7.1.2.2 Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión. En productos con alta concentración de proteínas adicionar una solución de nitrato de magnesio al 7,0% p/v y mezclar completamente, llevar a sequedad aproximadamente durante 6 horas en estufa a una temperatura de 90 a 95°C .

7.1.2.3 Colocar la muestra en una mufla y elevar la temperatura lentamente de 2 a 4°C por minuto hasta 350°C . Mantener la temperatura hasta que cesen los humos.

7.1.2.4 Elevar gradualmente la temperatura de 500 a 550°C para evitar que la muestra se incinere y mantener esa temperatura durante 16 horas o toda la noche.

7.1.2.5 Apagar la mufla y dejar enfriar.

7.1.2.6 Un segundo paso de calcinación puede ser requerido para remover algunos residuos de carbón, mediante el siguiente procedimiento:

Lavar las paredes del crisol con 2 ml de ácido nítrico al 50%. Colocar la muestra en una placa de calentamiento puesta a 120°C para remover el exceso de ácido. Colocar la muestra en una mufla fría y elevar la temperatura gradualmente de 500 a 550°C, manteniéndola por el tiempo necesario. Repetir este procedimiento cuantas veces sea necesario hasta que quede libre de carbón remanente.

7.1.2.7 Disolver las cenizas completamente en 5 ml de ácido clorhídrico 1N, transferir la muestra disuelta a un tubo de propileno o a un matraz de volumen conocido, enjuagar el crisol con dos alícuotas de 5 ml de ácido clorhídrico 1 N y transferir al mismo tubo o matraz para obtener un volumen de 15 ml en el primero y llevar al aforo en el segundo, tapar y mezclar, si existe presencia de partículas o materia insoluble, filtrar en papel Whatman No. 2, antes de la determinación.

7.1.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

7.1.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

7.2 Digestión por vía húmeda para la determinación de Sn.

7.2.1 Proceder igual que en el punto 7.1.1.1.

7.2.2 No adicionar ácido nítrico si no se lleva cabo la digestión total en el mismo día.

7.2.3 Adicionar 30 ml de ácido nítrico concentrado al matraz y calentar suavemente por 15 minutos en campana para iniciar la digestión, evitando una excesiva producción de espuma.

7.2.4 Hervir suavemente hasta tener un remanente de 3 a 6 ml o hasta que la muestra empiece a secarse en el fondo. No dejar que la muestra se calcine.

7.2.5 Retirar la muestra del calor.

7.2.6 Al mismo tiempo correr dos blancos de reactivos.

7.2.7 Adicionar 25 ml de ácido clorhídrico concentrado, calentar suavemente durante aproximadamente 15 minutos, hasta que todo el cloro sea liberado. Aumentar la temperatura gradualmente hasta ebullición.

7.2.8 Evaporar hasta obtener de 10 a 15 ml, usando un matraz similar con 15 ml de agua como patrón de volumen.

7.2.9 Adicionar aproximadamente 40 ml de agua.

7.2.10 Agitar y pasar a un matraz de 100 ml y enjuagar con 10 ml de agua.

7.2.11 Cuando el ácido clorhídrico está presente en la digestión, las muestras se pueden quedar toda la noche o por más tiempo.

7.2.12 Agregar 1 ml de solución de cloruro de potasio en cada matraz.

7.2.13 Enfriar a temperatura ambiente.

7.2.14 Diluir con agua y agregar más agua para compensar el volumen de grasa en el matraz.

7.2.15 Mezclar perfectamente y filtrar de 30 a 50 ml a través de un papel filtro Whatman No. 2 y recoger el filtrado en un recipiente de propileno, polipropileno o polietileno.

7.2.16 No filtrar los blancos. Tapar las botellas durante el análisis. Las soluciones son estables por varios meses.

7.2.17 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

7.2.18 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

7.3 Digestión por vía húmeda para la determinación de Hg.

7.3.1 Sistema de reflujo.

7.3.1.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en un matraz de digestión y adicionar perlas de ebullición.

7.3.1.2 Conectar el matraz al sistema de reflujo y agregar poco a poco la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado y calentar durante media hora o hasta que no se observen cambios en la digestión.

7.3.1.3 Dejar enfriar y agregar una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1 + 1).

7.3.1.4 Calentar y agregar más ácido nítrico gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color oscuro de la solución desaparezca.

7.3.1.5 Enfriar.

7.3.1.6 Si existe grasa o cera filtrar la solución.

7.3.1.7 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

7.3.1.8 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

7.3.2 Sistema cerrado.

7.3.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en el recipiente de digestión.

7.3.2.2 Agregar la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado.

7.3.2.3 Tapar y sellar perfectamente el recipiente de digestión.

7.3.2.4 Si el recipiente de digestión es un matraz Erlenmeyer, colocar éste en una autoclave a 15 lb por 30 minutos. Si se utiliza bomba Parr, calentar en parrilla controlando la temperatura a un máximo de 300°C por 30 minutos.

7.3.2.5 Enfriar a temperatura ambiente.

7.3.2.6 En caso de que la digestión no sea completa adicionar peróxido de hidrógeno y repetir la digestión.

7.3.2.7 Filtrar en caso de que exista grasa o cera y analizar el contenido de Hg.

7.3.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

7.3.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

7.4 Digestión para la determinación de As.

7.4.1 Digestión por vía húmeda-seca.

7.4.1.1 Proceder como en el punto 7.3.2 hasta que la digestión sea completa y posteriormente continuar con los siguientes pasos.

7.4.1.2 Con una pipeta tomar una alícuota de la solución de muestra digerida y colocarla en un crisol Vycor o vaso de precipitados.

7.4.1.3 Añadir 1 ml de solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y calentar en una parrilla a temperatura baja, hasta sequedad.

7.4.1.4 Incrementar el calor de la placa a un máximo de 375°C.

7.4.1.5 Colocar el matraz en la mufla a 450°C para oxidar cualquier residuo de carbón y descomponer el exceso de nitrato de magnesio, por un tiempo mayor o igual a 30 minutos.

7.4.1.6 Enfriar y disolver el residuo en 2,0 ml de ácido clorhídrico 8 M.

7.4.1.7 Añadir 0,1 ml de yoduro de potasio al 20% p/v para reducir el As(V) a As(III).

7.4.1.8 Dejar reposar por un tiempo mayor a 2 minutos y transferir a un matraz y llevar al aforo con agua.

7.4.1.9 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

7.4.1.10 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

7.4.2 Digestión por vía seca.

7.4.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad necesaria de muestra en un crisol Vycor o de platino.

7.4.2.2 Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v.

7.4.2.3 Homogeneizar con una varilla limpia de plástico extendiendo la mezcla en el crisol.

7.4.2.4 Colocar la muestra en una mufla subiendo gradualmente la temperatura hasta 300°C por 2 horas. Posteriormente subir gradualmente la temperatura hasta 500°C por 16 horas o durante toda la noche.

7.4.2.5 Enfriar a temperatura ambiente y humedecer las cenizas con ácido nítrico al 50% v/v.

7.4.2.6 Calentar en parrilla hasta la eliminación del ácido.

7.4.2.7 Llevar los crisoles a una mufla elevando gradualmente la temperatura de 23 a 500°C, manteniendo ésta 30 min hasta evaporación total.

7.4.2.8 Transferir las cenizas del crisol a un matraz aforado usando una porción de 10 ml de ácido clorhídrico 0,5 N.

7.4.2.9 Enjuagar los crisoles con 5 ml de agua destilada y transferir al matraz, añadir 1 ml de solución de yoduro de potasio al 15% y mezclar.

7.4.2.10 Dejar reposar durante 15 minutos y llevar al aforo.

7.4.2.11 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

7.4.2.12 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

7.5 Digestión para la determinación de Cd, As, Pb, Sn, Cu, Fe, Zn y Hg por horno de microondas.

Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, 0,500 g como máximo de muestra, añadir 6 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de agua oxigenada al 30%, cerrar perfectamente el envase de reacción y proceder según el manual del fabricante.

7.6 Determinación de metales en agua potable y agua purificada.

Las muestras incoloras, transparentes e inodoras y de una sola fase, pueden analizarse directamente por espectrometría de absorción atómica, sin digestión.

Previo a dicho análisis, adicionar a 100 ml de muestra, 1 ml de ácido nítrico, en caso de que se observe un precipitado, realizar una digestión adicionando 1 ml más de ácido nítrico concentrado, calentar a 85°C hasta reducir el volumen a 20 ml cuidando de que no hierva. Calentar a reflujo 30 minutos y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml. Centrifugar a 1600 rpm por 30 minutos o dejar reposar toda la noche y analizar el sobrenadante.

8. Procedimiento

8.1 Espectrometría de absorción atómica por flama.

8.1.1 Calibración. Es necesario comprobar que se tiene una calibración inicial y periódica aceptable.

8.1.1.1 Se inicia la configuración operacional del instrumento y en el sistema de adquisición de datos. Permitir un periodo no menor a 30 minutos para el calentamiento de las lámparas de descarga sin electrodos.

8.1.1.2 Se debe verificar la estabilidad del instrumento mediante el análisis de una solución estándar 20 veces más concentrada que el límite de detección del instrumento (LDI) para el analito, leída un mínimo de cinco veces y calculando la desviación estándar resultante, la cual debe ser menor al 5%.

8.1.1.3 El instrumento debe calibrarse para el analito a determinar usando el blanco de calibración y los estándares de calibración preparados a 3 o 4 niveles de concentración dentro del intervalo dinámico de concentración del analito.

8.1.1.4 Ajustar el instrumento a 0 con el blanco de calibración. Introducir los estándares de calibración del analito de menor a mayor concentración y registrar al menos tres réplicas de la absorbancia de cada uno.

8.1.1.5 Elaborar una curva de calibración graficando absorbancia en función de la concentración.

Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

8.1.2 Operación del instrumento.

El desempeño del instrumento se verifica mediante el empleo de blancos de calibración, estándares de calibración y una muestra de control de calidad (MCC).

8.1.2.1 Después de que se ha realizado la calibración, se debe verificar que el instrumento trabaje adecuadamente para el analito. Para ello se analiza una muestra de control de calidad. Si las mediciones varían en $\pm 10\%$ o más, al valor establecido para la MCC, el análisis debe interrumpirse y buscar la posible causa de error, el instrumento se debe recalibrar y verificar la nueva calibración.

8.1.2.2 Para verificar que el instrumento no presenta deriva, por cada 10 análisis se debe analizar el blanco de calibración. Si el valor verdadero del analito difiere $\pm 10\%$ o más, el instrumento debe recalibrarse. Si el error persiste debe identificarse el problema y corregirse.

Si la matriz de la muestra es responsable de la deriva o afecta la respuesta del analito puede ser necesario trabajar por adiciones estándar.

8.1.2.3 La demostración de la operatividad inicial del instrumento se hace estableciendo los límites de detección del método (LDM) para el analito y el intervalo de calibración lineal. Para determinar el LDM se usa un blanco de reactivos fortificado con una concentración del analito equivalente de 2 a 5 veces el límite de detección estimado. Se hacen al menos 4 réplicas de lectura de absorbancia del blanco de reactivos fortificado procesado a través de todo el método analítico. Los LDM se calculan de acuerdo a:

$$\text{LDM} = t \times s$$

t = valor de la "T" de Student a un intervalo de confianza de 99% y una desviación estándar estimada para n-1 grados de libertad. t = 3,14 para 7 réplicas.

s = desviación estándar de las réplicas del análisis.

El intervalo lineal de calibración se establece a partir de por lo menos 4 estándares de diferente concentración, uno de los cuales debe estar próximo al límite superior del intervalo lineal.

8.1.3 Determinación

8.1.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito de acuerdo a las indicaciones del manual del instrumento.

8.1.3.2 Introducir el blanco de reactivos y la muestra a analizar y registrar los valores de absorbancia. Se debe analizar al menos un blanco de reactivos con cada grupo de muestras. Los valores obtenidos ponen de manifiesto la calidad de los reactivos usados y el grado de contaminación del laboratorio.

8.1.3.3 En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en las unidades de concentración utilizadas.

8.1.3.4 Se debe analizar al menos un blanco de reactivos fortificado para cada grupo de muestras. Se calcula la exactitud como el porcentaje de recuperación (de acuerdo al apartado 8.1.3.6).

8.1.3.5 Se debe fortificar al menos una muestra por grupo o el 10% de ellas lo que resulte mayor. La concentración añadida debe ser de aproximadamente 0,1 unidades de absorbancia.

8.1.3.6 Se debe calcular el porcentaje de recuperación para el analito, de acuerdo a:

$$R = \frac{\text{CM} - \text{C}}{\text{CA}} \times 100$$

R = % recuperación

CM = Concentración de la muestra fortificada

C = Concentración de la muestra

CA = Concentración equivalente de analito añadido a la muestra.

Si la recuperación del analito en la muestra fortificada está fuera del intervalo previamente establecido y el blanco de reactivos fortificado está correcto, puede existir un problema relacionado con la matriz de la muestra. Los datos se deben verificar por el método de las adiciones estándar.

8.2 Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito.

8.2.1 Calibración.

8.2.1.1 Proceder de acuerdo a los puntos 8.1.1.1 a 8.1.1.4.

8.2.1.2 Elaborar una curva de calibración graficando área de pico o altura máxima contra concentración del analito.

La calibración mediante el uso de una computadora o una calculadora basada en el ajuste sobre los datos de concentración respuesta es aceptada.

Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

8.2.2 Operación del instrumento.

8.2.2.1 Proceder de acuerdo a 8.1.2.1 a 8.1.2.3.

8.2.3 Determinación.

8.2.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito, de acuerdo a las recomendaciones del manual del instrumento.

El programa de temperaturas para el horno de grafito puede variar dependiendo de la matriz de la muestra. En el caso de existir interferencias no específicas (absorción molecular o dispersión de la luz), se recomienda consultar la bibliografía existente en cuanto a los métodos disponibles para eliminarlas, así como en el caso de interferencias de matriz.

8.3 Espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros.

8.3.1 Calibración.

8.3.1.1 Proceder de acuerdo a los puntos 8.1.1.1 a 8.1.1.4.

8.3.1.2 A partir de la solución estándar de As de 1000 mg/l, preparar una solución de As de 1 mg/l en ácido clorhídrico de concentración apropiada al método. Trazar una curva de calibración de absorbancia (máximo de la altura de pico) en función de la concentración del analito para un intervalo de concentración de 0 a 10 µg/l de As bajo las mismas condiciones de la matriz de la muestra.

8.3.2 Operación del instrumento.

8.3.2.1 Proceder de acuerdo a los puntos 8.1.2.1 a 8.1.2.3.

8.3.3 Determinación.

8.3.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de As: longitud de onda de 193,7 nm y lámpara de descarga sin electrodos. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

8.3.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración de ácido clorhídrico al 1,5% siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

8.3.3.3 Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito (por lo general, 10 ml de una solución de 5 µg/l de As da una absorbancia de 0,2), ajustando el tiempo de purga I, el tiempo de reacción y el tiempo de purga II.

8.3.3.4 Tomar un volumen conocido de la muestra dirigida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

8.4 Espectrometría de absorción atómica por vapor frío.

8.4.1 Calibración.

8.4.1.1 Proceder igual que en los puntos 8.1.1.1 a 8.1.1.4.

8.4.1.2 A partir de la solución de trabajo de 1 µg/ml preparar estándares de calibración que contengan 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 µg de Hg a frascos de reacción. A cada frasco agregar 100 ml de la solución de dilución y 20 ml de la solución de reducción. Trazar la curva de calibración de absorbancia (altura máxima de pico) en función de la concentración del analito.

8.4.2 Operación del instrumento.

8.4.2.1 Proceder de acuerdo a los puntos 8.1.2.1 a 8.1.2.3.

8.4.3 Determinación.

8.4.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de Hg: longitud de onda de 253,6 nm, slit 0,7 nm y lámpara de cátodo hueco. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

8.4.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración (solución de dilución y de reducción) siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

8.4.3.3 Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito.

8.4.3.4 Tomar 25 ml de la muestra digerida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

9. Expresión de resultados

Método de cálculo.

Interpolar los valores de absorbancia o altura de pico de la muestra analizada en la curva de calibración y obtener los mg/kg del elemento en la muestra y realizar los cálculos empleando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ kg} = \frac{A \times B}{C}$$

en donde:

A = Concentración en mg/kg de la muestra a interpolar en la curva de calibración.

B = Volumen final al que se llevó la muestra (ml).

C = Peso de la muestra (g) o volumen de la muestra (ml) en el caso de agua.

En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en mg/kg o µg/kg.

10. Informe de la prueba

Los resultados se informarán en mg/kg o µg/kg del elemento a determinar.

11. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional.

12. Bibliografía

12.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.

12.5 Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. 1971. The Perkin-Elmer, Corp-March. USA.

12.6 Boudene C. 1979. Food contamination by metals, in Trace Metals. Exposure and Health Effects. Pergamon Press, Oxford, p 163.

12.7 Clesceri L.S., Green A. E., Rhodes B. R. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17a. Ed. M-3030 p. 3-1 a 3-6.

12.8 Dalton E.F. y Malanoski A.J. 1971. Atomic Absorption Newsletter, Vol. 10, No.4.

12.9 Determination of Mercury in Fish (Atomic Absorption Spectrophotometric Method). 1970. Dow Chemical Company. Method CAS-AM-70.10. Midland. MI 48640.

12.10 Determination of Mercury in Liver, Muscle, Kidney or Hair by Atomic Absorption Spectrophotometry. 1986. Chemistry Laboratory Guidebook, Science, USDA, FSIS. 5.007.

12.11 Determination of Metals Trace in Liver, Muscle, Kidney of Hair by Atomic Absorption Spectrophotometry. 1986. Chemistry Laboratory Guidebook, Science, USDA, FSIS.

12.12 Kahn H.L. y Schallis J.E. 1968. Atomic Absorption Newsletter, Vol. 7, No. 5 (1968).

12.13 Kothandaramon P. y Dallmeyer J.F. 1976. Improved Desiccator for Mercury Cold Vapor Technique. Atomic Absorption Newsletter, Vol.15, No.5.

12.14 Manning, D.C. 1970. Compensation for Broad-Band Absorption Interference in the Flameless Atomic Absorption Determination of Mercury. Atomic Absorption Newsletter. Vol. 9, No.5 p. 109.

12.15 Matthews P.J. 1984. Control of metal application rates from sewage Sludge utilization in agriculture. Crit. Rev. Environ. Control. Vol. 14, No. 199.

12.16 MHS-10 Mercury/Hydride System. 1976. Operators Manual Perkin-Elmer. Instrument Division, Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Ct 06856, USA.

12.17 Nieboer E. y Richardson D.H.S. 1980. The replacement of the mondescript term "heavy metals" by a biologically and Chemilally significant classification of metal ions. Environ. Pollot. Ser. B., Vol. 1-3.

12.18 NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

12.19 Norma ISO 2447 (E). 1974. Determination of Tin. International Organization for Standardization.

12.20 Norma ISO 6561 (E). 1983. Fruits, Vegetables and Derived Products- Determination of Cadmiun Content. Flameless Atomic Absorption Spectrometric Method. International Organization for Standardization.

12.21 Norma ISO 6633. 1984. Fruit, Vegetables and Derived Products Determination of head content- Flameless Atomic Absorption Spectrometric Method. International Organization for Standardization.

12.22 Norma ISO 6637 (E). 1984. Fruits, Vegetables and Derived Products. Determination of Mercury Content. Flameless Atomic Absorption Method. International Organization for Standardization.

12.23 Norma ISO 6636/2 (E). 1984. Fruits, Vegetables and Derived Products. Determination of Zinc Content. Part 2, Atomic Absorption Spectrometric Method. International Organization for Standardization.

12.24 Norma ISO/DIS 7952. 1991. Fruits, Vegetables and Derived Products- Determination of copper content- Method by flame atomic absorption Spectrometry. Draft International Standard.

12.25 Official Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 15 th Edition. USA. Volumen I. Chapter 9 p. 237 a 273.

12.26 Swayer R., Kirk R.S. y Egan H. 1987. Manual de Análisis Químicos de Alimentos de Pearson. Cía. Editorial Continental. 1a. ed. en español. México, D.F. p. 125-140.

13. Observancia de la Norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

14. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México,D.F., a 29 de junio de 1995.- El Director General, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.

ORMA Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39, de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4, de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o., fracción XXII, 13, Apartado A, fracciones I, II y IX, 116, 118, fracciones II, IV y VII, 119, fracción II, 120, 122, 194, 205 y 207, de la Ley General de Salud; 40, fracciones III, VII y XI, 41, 43, 44 y 47, fracción IV, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 31, del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4o., 15, 20, 25, 30, 101, 102 y 103, del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2o., fracciones I, inciso a), 12, 209, 210, 211, 213, 215, 216, 217, 220, 221, 222, 223, 224 y 1336, del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 36, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud y 3o., fracción I, incisos b), e), i) y k) y 10, fracciones IV y VIII, del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46, fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el 18 de diciembre de 2013, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, aprobó el anteproyecto de la presente Norma;

Que con fecha 12 de febrero de 2014, en cumplimiento a lo previsto en el artículo 47, fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación, el proyecto de la presente Norma, a efecto de que dentro de los 60 días naturales siguientes al de su publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario;

Que con fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación, las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47, fracción III, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, y

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, he tenido a bien expedir y ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación, de la siguiente

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-201-SSA1-2015, PRODUCTOS Y SERVICIOS. AGUA Y HIELO PARA CONSUMO HUMANO, ENVASADOS Y A GRANEL. ESPECIFICACIONES SANITARIAS

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma Oficial Mexicana participaron las unidades administrativas, instituciones y organismos siguientes:

SECRETARÍA DE SALUD.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

ANALYSIS AND RESEARCH LAB, S.A. DE C.V.

ASOCIACIÓN NACIONAL DE PRODUCTORES DE REFRESCOS Y AGUAS CARBONATADAS, A.C.

ASOCIACIÓN NACIONAL DE PRODUCTORES Y DISTRIBUIDORES DE AGUA PURIFICADA, A.C.

BONAFONT S.A. DE C.V.

COCA COLA DE MÉXICO.

CORPORATIVO DE SERVICIOS EN AGUA Y AMBIENTE, S.A. DE C.V.

GRUPO CENCON.

GRUPO EMBOTELLADORAS UNIDAS, S.A.B. C.V.

GRUPO PEÑAFIEL S.A. DE C.V.

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE RIESGOS DEL D.F.

LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES.

NESTLÉ MÉXICO S.A. DE C.V.
SERVICIOS PROFESIONALES QUÍMICOS BIOLÓGICOS S.A. DE C.V.
SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY S.A. DE C.V.
TECNOLOGÍA AMBIENTAL INTEGRAL S.A. DE C.V.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
Facultad de Química.

ÍNDICE

1. Objetivo y campo de aplicación.
2. Referencias.
3. Definiciones.
4. Símbolos y abreviaturas.
5. Disposiciones sanitarias.
6. Control Sanitario del agua y hielo para consumo humano.
7. Procedimiento de evaluación de la conformidad.
8. Etiquetado.
9. Concordancia con normas internacionales.
10. Bibliografía.
11. Observancia de la Norma.
12. Vigencia.

Apéndice normativo A. Métodos de pruebas microbiológicas y fisicoquímicas.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma establece las características y especificaciones sanitarias que deben cumplir el agua y el hielo para consumo humano que se comercialice preenvasado o a granel y los establecimientos que se dediquen al proceso o importación de dichos productos.

1.2 Esta Norma es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican al proceso o importación de agua y hielo para consumo humano que se comercialicen preenvasados o a granel.

2. Referencias

Para la correcta aplicación de esta Norma, se sugiere consultar las siguientes Normas Oficiales Mexicanas o las que las sustituyan:

2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida.

2.2 Norma Oficial Mexicana NOM-026-STPS-2008, Colores y señales de seguridad e higiene, e identificación de riesgos por fluidos conducidos en tuberías.

2.3 Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria.

2.4 Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

2.5 Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 **A granel:** al producto que debe pesarse, medirse o contarse en presencia del consumidor por no encontrarse preenvasado al momento de su venta.

3.2 Agua para consumo humano: a toda aquella cuya ingestión no cause efectos nocivos a la salud. Se considera que no causa efectos nocivos a la salud, cuando se encuentra libre de gérmenes patógenos y de sustancias tóxicas, y cumpla, además con los requisitos que se señalan en la presente Norma.

3.3 Agua mineral natural: a la que se caracteriza por un contenido determinado de sales minerales y sus proporciones relativas. Se obtiene directamente de manantiales o fuentes perforadas procedentes de estratos acuíferos. En los perímetros protegidos de estos estratos deberán adoptarse las medidas pertinentes para evitar que la calidad química o física del agua sufra algún tipo de contaminación, esto es, que mantenga su composición y calidad constantes. Se debe envasar cerca del punto desurgencia de la fuente, en condiciones que garanticen la pureza microbiológica y la composición química original en sus constituyentes esenciales y no se debe someter a otros tratamientos que no estén permitidos por esta Norma y que puede estar o no carbonatada.

3.4 Agua mineralizada: al agua purificada que ha sido adicionada de sales, y que puede estar o no carbonatada.

3.5 Aislado: a la separación física de un área de otras por medio de material sanitario, resistente y permanente.

3.6 Área de llenado: a la zona donde se envasa y tapa el producto.

3.7 Área de producción: a la zona del establecimiento donde se realizan las operaciones para procesar agua y hielo para consumo humano.

3.8 Carbono orgánico: a todo aquel carbono enlazado covalentemente a moléculas orgánicas.

3.9 Cisterna: al depósito que sirve para almacenar el producto o materia prima en establecimientos o en transporte.

3.10 Carbono orgánico purgable: al grupo de parámetros analíticos que comprende a los compuestos orgánicos volátiles no halogenados.

3.11 Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos: al grupo de parámetros analíticos que comprende a los halogenados no volátiles como las dioxinas y furanos, herbicidas clorados, bifenilos policlorados, plaguicidas clorados y semivolátiles clorados.

3.12 Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables: al grupo de parámetros analíticos que comprende a los halogenados volátiles como los halometanos, hidrocarburos clorados de bajo peso molecular y volátiles clorados.

3.13 Compuestos orgánicos no halogenados: al grupo de parámetros analíticos que comprende a los carbamatos, hidrocarburos poliaromáticos, plaguicidas fosforados, compuestos orgánicos semivolátiles no clorados, endotal, glifosato y plaguicidas derivados de la urea.

3.14 Consumidor: a la persona física o moral que adquiere o disfruta como destinatario final los productos regulados en esta norma

3.15 Desinfección: a la reducción del número de microorganismos presentes, por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad o la aptitud del alimento, bebida o suplemento alimenticio.

3.16 Establecimientos: a los locales y sus instalaciones, dependencias y anexos, estén cubiertos o descubiertos, sean fijos o móviles, en los que se desarrolla el proceso de los productos, actividades y servicios a los que se refiere esta Norma.

3.17 Etiqueta: a cualquier rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra materia descriptiva o gráfica, escrita, impresa, estarcida, marcada, grabada en alto o bajo relieve, adherida, sobrepuesta o fijada al envase del producto preenvasado o, cuando no sea posible por las características del producto, al embalaje.

3.18 Envase: a cualquier recipiente, o envoltura en el cual está contenido el producto preenvasado para su venta al consumidor.

3.19 Evaluación de la conformidad: a la determinación del grado de cumplimiento con las normas oficiales mexicanas o la conformidad con las normas mexicanas, las normas internacionales u otras especificaciones, prescripciones o características. Comprende, entre otros, los procedimientos de muestreo, prueba, calibración, certificación y verificación; la cual se encuentra en la Ley Federal de Metrología y Normalización.

3.20 Expendio: al área o establecimiento donde se exhiben o comercializan los productos objeto de esta Norma.

3.21 Fuente de abastecimiento: al lugar a partir del cual se obtiene el agua como materia prima, incluye pero no limita a pozos, manantiales, entre otros, sin considerar los sistemas de abastecimiento de agua potable.

3.22 Hielo para consumo humano: al producto obtenido por congelación del agua para consumo humano.

3.23 Inocuo: a lo que no hace o causa daño a la salud.

3.24 Límite máximo permisible: a la cantidad establecida de los parámetros que no se debe exceder en el producto terminado.

3.25 Limpieza: a la acción que tiene por objeto quitar la suciedad.

3.26 Lote: a la cantidad de un producto elaborado en un mismo ciclo, integrado por unidades homogéneas e identificadas con un código específico.

3.27 Máquina automática para la producción de agua o hielo: a la que cuenta con todo el equipo necesario para el tratamiento y expendio de agua o hielo para consumo humano a granel o envasado.

3.28 Materia extraña: a la sustancia, resto o desecho orgánico o no, que se presenta en el producto, sea por contaminación o por manejo no higiénico del mismo durante su elaboración, o comercialización, considerándose entre otros: excretas, pelos de cualquier especie, huesos e insectos.

3.29 Materia prima: a todas las sustancias que se emplean en la producción o elaboración y que forman parte del producto terminado.

3.30 Material sanitario: al que no cede sustancias tóxicas a los productos, que entran en contacto con él y es de fácil limpieza y desinfección.

3.31 Personal: a todo aquel individuo que interviene en cualquier etapa del proceso.

3.32 Proceso: al conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de los productos.

3.33 Producto preenvasado: al producto que fuera del punto de venta es colocado en un envase de cualquier naturaleza, en ausencia del consumidor final, y la cantidad de producto contenido en él no puede ser alterada a menos que el envase sea abierto o modificado perceptiblemente.

3.34 Producto terminado: al producto que se ofrecerá al consumidor final, ya sea preenvasado o a granel.

3.35 Riesgo: a la probabilidad de que se desarrolle cualquier propiedad biológica, química o física que cause daño a la salud del consumidor.

3.36 Salmuera: a la solución saturada de cloruro de sodio y que puede contener aditivos.

3.37 Tratamiento: a la operación o serie de operaciones a la que es sometida el agua o el hielo durante su elaboración, con el propósito de eliminar o reducir su contaminación.

4. Símbolos y abreviaturas

4.1 Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entenderá por:

4.1.1 ACUERDO	Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias.
4.1.2 Sb	Antimonio.
4.1.3 As	Arsénico.
4.1.4 Bq/L	Bequerel por litro.
4.1.5 CO₂	Bióxido de carbono.
4.1.6 B	Boro
4.1.7 Cd	Cadmio.
4.1.8 cm	Centímetro.
4.1.9 cm²	Centímetro cuadrado.
4.1.10 Co	Cobalto

4.1.11 AOX	Compuestos orgánicos halogenados absorbibles
4.1.12 Cu	Cobre.
4.1.13 DGN	Dirección General de Normas.
4.1.14 SPA	Establecimientos Salud por Agua.
4.1.15 h	Hora.
4.1.16 F-	Ión fluoruro.
4.1.17 Ley	Ley General de Salud.
4.1.18 L	Litro.
4.1.19 Hg	Mercurio.
4.1.20 P-A	Método de presencia ausencia.
4.1.21 μ	Microohm.
4.1.22 μg	Microgramo.
4.1.23 mL	Mililitro.
4.1.24 mg	Miligramo.
4.1.25 mg/L	Miligramo por litro.
4.1.26 mm	Milímetro.
4.1.27 μS/cm	MicroSiemens sobre centímetro.
4.1.28 No.	Número.
4.1.29 NMP	Número Más Probable.
4.1.30 %	Por ciento
4.1.31 Pt	Platino.
4.1.32 Pb	Plomo.
4.1.33 pH	Potencial de hidrógeno.
4.1.34 Reglamento	Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.
4.1.35 Se	Selenio.
4.1.36 UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
4.1.37 UNT	Unidades Nefelométricas de Turbiedad.

5. Disposiciones sanitarias

Los establecimientos, además de cumplir con lo establecido en la Ley, el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana citada en el punto 2.5, del capítulo de Referencias, de esta Norma, deben observar las disposiciones siguientes:

5.1 Agua.

5.1.1 Abastecimiento sanitario del agua. En caso de que la materia prima se obtenga directamente de una fuente de abastecimiento:

5.1.1.1 No deben construirse obras de captación en fuentes de abastecimiento cuyas cargas de contaminantes por su magnitud y peligrosidad pongan en riesgo la salud humana.

5.1.1.2 La fuente de abastecimiento y las obras de captación deben protegerse mediante separación física, con la altura o distancia suficiente que impida la deposición de desechos sólidos, líquidos o excretas y el paso de animales. Sólo se permitirá el acceso a personal autorizado.

5.1.1.3 Las tuberías, bombas y otros dispositivos que estén en contacto con el agua para consumo humano y que sean utilizados para la captación, deben ser de material sanitario.

5.1.2 Establecimientos.

5.1.2.1 Además de lo establecido en la Norma Oficial Mexicana citada en el punto 2.2, del capítulo de Referencias, de esta Norma, las tuberías que conduzcan agua en distintas etapas del proceso o fluidos diferentes de ésta, se deben identificar de acuerdo con el código propio de la empresa, que

debe proporcionarse durante la verificación. Cualquier forma de identificación debe ser visible para el personal desde el inicio de las áreas del proceso.

5.1.2.2 El agua que se utilice para propósitos no relacionados con el producto, debe transportarse por tuberías diferentes, separadas, sin que haya alguna conexión ni sifonado de retroceso con las tuberías que transportan la de proceso y el agua lista para envasarse.

5.1.2.3 Las áreas de lavado y desinfección, llenado y de producción deberán cumplir con lo siguiente:

5.1.2.3.1 El área de llenado debe estar completamente aislada de las demás áreas, durante dicha operación, los accesos de recepción y salida del envase deben mantenerse cerrados o protegidos de manera que se evite la contaminación del producto.

5.1.2.3.2 Las boquillas de llenado, así como las válvulas y el maneral deben ser de material sanitario, limpiarse y desinfectarse al inicio de la operación.

5.1.2.3.3 Al paro de operaciones, el agua no debe permanecer en reposo en las tuberías. En caso de no haber un sistema que permita su desalojo, deben existir los procedimientos y sistemas para garantizar que el agua que permaneció en las tuberías regrese al principio del proceso donde se le someta a las operaciones necesarias que garanticen su inocuidad.

5.1.2.3.4 Para el caso de envases retornables, éstos deben ser sometidos a procesos de lavado y desinfección interna, lavado externo, así como enjuague. Después de estas operaciones no deben quedar residuos de las sustancias utilizadas.

5.1.2.4 Los establecimientos con venta directa a granel deberán contar con:

5.1.2.4.1 Además de los puntos señalados anteriormente, deberá contar con un área cerrada para el lavado de garrafones, quedan exentas las máquinas automáticas.

5.1.2.4.2 Un área de llenado ubicada fuera de tránsito vehicular, completamente aislada de las demás áreas y el inicio de operación de llenado no debe hacerse en tanto la puerta no esté cerrada. Preferentemente el dispositivo de llenado debe contar con un mecanismo de cierre automático que garantice lo anterior.

5.1.2.4.3 En caso que el establecimiento ponga envases vacíos o tapas a disposición del consumidor, éstos deberán ser nuevos, estar limpios, desinfectados y empacados.

5.1.2.4.4 Letreros visibles que señalen el riesgo que representa para la salud el llenado de envases sucios o que hayan contenido sustancias tóxicas y su manejo inadecuado. Las letras deben tener un tamaño de 5 cm de altura como mínimo y ser de colores contrastantes, refiriéndose a alguno de los siguientes temas: "TRANSPORTA TUS ENVASES Y GARRAFONES BIEN TAPADOS" o "NO UTILICES ENVASES QUE HAYAN CONTENIDO SUSTANCIAS TÓXICAS" o "LAVA Y DESINFECTA TU GARRAFÓN ANTES DE LLENARLO".

5.1.3 Transporte.

5.1.3.1 Cuando se lleven a cabo las operaciones de carga y descarga, tanto para el caso de materia prima como producto terminado, las conexiones entre la cisterna, válvulas y mangueras de distribución, así como el equipo en general del transporte de agua a granel, no debe presentar fugas. Durante el recorrido las bocas de las mangueras de las cisternas deben mantenerse protegidas con dispositivos de material sanitario, a fin de evitar su contaminación con el medio ambiente.

5.1.3.2 Las cisternas para el agua destinada al envasado no deberán ser utilizados para transportar otro tipo de agua.

5.1.3.3 El agua para consumo humano transportada a granel no deberá ser comercializada directamente al consumidor final por este medio.

5.1.4 Condiciones sanitarias de los envases y tapas.

5.1.4.1 Las tapas deberán ser nuevas y de material inocuo. En caso de duda de la condición higiénica de envases o tapas deberán lavarse y desinfectarse con soluciones que no modifiquen, reaccionen o alteren sus características y evitando la contaminación por arrastre.

5.1.5 Especificaciones sanitarias del producto terminado.

5.1.5.1 Límites máximos permisibles del agua para consumo humano.

5.1.5.1.1 Organolépticas y físicas.

ESPECIFICACIÓN.	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE.
-----------------	---------------------------

Color.	15 (Pt/Co).
Turbiedad.	3,0 (UNT).

5.1.5.1.2 Microbiológicas.

ESPECIFICACIÓN.	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE ¹⁾		
	(NMP/100 mL)	UFC/100 mL	Organismos/100mL
Coliformes Totales.	<1,1	CERO	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ²⁾ .	<1,1	CERO	No aplica
Enterococos fecales ³⁾ .	<1,1	CERO	Ausencia
Esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductores ^{2) 3)} .	<1,1	CERO	No aplica

¹⁾ La unidad a informar será de acuerdo al método utilizado.

²⁾ Especificaciones sólo para agua mineral natural.

³⁾ La autoridad sanitaria establecerá los casos en que se realizará la determinación de estas especificaciones.

5.1.5.1.3 Metales, metaloides y compuestos inorgánicos.

ESPECIFICACIÓN	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE (mg/L)
Antimonio.	0,005
Arsénico.	0,01
Bario.	0,70
Borato como B.	5,00
Cadmio.	0,003
Cromo total.	0,05
Cobre.	1,00
Cianuro.	0,07
Fluoruros como F ⁻ .	0,70 ⁵⁾ 2,0 ⁶⁾
Manganeso.	0,40
Mercurio.	0,001
Níquel.	0,02
Nitrógeno de nitratos.	10,00
Nitrógeno de nitritos.	0,06
Plomo.	0,01
Selenio.	0,01

⁵⁾ No aplica para aguas minerales naturales.

⁶⁾ Aplica para aguas minerales naturales, ver apartado de Etiquetado.

5.1.5.1.4 Compuestos orgánicos sintéticos.

ESPECIFICACIÓN.	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE (mg/L).
Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos.	0,0005
Compuestos orgánicos nohalogenados.	0,01

Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables.	0,001
Carbono Orgánico Purgable.	0,01
Sustancias activas al azul de metileno.	0,5

5.1.5.1.5 Desinfectantes.

ESPECIFICACIÓN.	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE (mg/L).
Cloro residual libre.	0,1

5.1.5.1.6 Subproductos de desinfección.

DESINFECTANTE UTILIZADO.	ESPECIFICACIÓN.	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE (mg/L).
Cloro	Formaldehído.	0,9
	Bromodiclorometano.	0,06
	Bromoformo.	0,1
	Dibromoclorometano.	0,1
	Cloroformo.	0,2
Ozono	Formaldehído.	0,9
	Bromato.	0,01

5.1.5.1.6.1 En aguas minerales naturales, los subproductos de desinfección deberán estar ausentes.

5.1.5.1.7 Radiactivos.

ESPECIFICACIÓN.	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE (Bq/L).
Radiactividad beta total ⁷ .	1,85
Radiactividad alfa total ⁷ .	0,56

⁷ Aplica para aguas minerales naturales.

5.1.5.2 Aditivos y coadyuvantes de proceso.

Cuando se adicione al producto dióxido de carbono o anhídrido del ácido carbónico, nitrógeno o poliacrilamida se deberá sujetar a lo especificado en el ACUERDO.

5.1.5.3 Materia Extraña.

5.1.5.3.1 Ausente en cualquier presentación del producto terminado.

5.2 Hielo.

5.2.1 El proceso de fabricación de hielo debe cumplir con las especificaciones sanitarias del agua para consumo humano, además de las siguientes disposiciones:

5.2.1.1 Establecimientos.

5.2.1.1.1 Se debe contar con un dispositivo con solución suficiente para desinfección de calzado al ingreso de las áreas de llenado de moldes, desmoldado, corte, almacenamiento y envasado. Las personas que ingresen deberán desinfectar su calzado en estos dispositivos.

5.2.1.1.2 El andén de despacho debe ser desinfectado al inicio de las operaciones.

5.2.1.1.3 En los casos en que por operación sea necesario desplazar el hielo sobre el piso o cualquier otra superficie en las áreas de proceso o almacenamiento, éstas deberán limpiarse diariamente y desinfectarse con la frecuencia que sea necesaria, de tal forma que durante el manejo del hielo se evite el riesgo de contaminación del producto.

5.2.1.1.4 El llenado de los moldes debe hacerse a través de tubería fija.

5.2.1.1.5 Los moldes no deben sumergirse por completo en la salmuera.

5.2.1.1.6 Para el despegue del producto se deberá usar agua que se utiliza como materia prima.

5.2.2 Especificaciones sanitarias del producto.

5.2.2.1 El producto terminado deberá cumplir con las especificaciones establecidas para el agua de consumo humano de esta Norma y comercializarse preenvasado.

6. Control Sanitario del agua y hielo para consumo humano

6.1 Se debe contar con un programa de muestreo, el cual debe indicar como mínimo, el número de muestras que deben examinarse, el tamaño de esas muestras, el método de análisis empleado y su sensibilidad, el número de muestras y cantidad de microorganismos que harán que el lote se considere inaceptable o fuera de especificaciones.

6.2 La frecuencia mínima de análisis de las especificaciones del producto terminado debe ser de acuerdo a los requisitos establecidos en el Cuadro 1 de esta Norma y deberá documentarse en bitácoras o registros.

Cuadro 1. Frecuencia mínima de análisis de agua y hielo.

ESPECIFICACIÓN.	FRECUENCIA.
Organolépticos y físicos.	Mensual.
Coliformes totales.	Semanal.
Metales, metaloides y compuestos inorgánicos.	Anual.
Compuestos orgánicos sintéticos.	Anual.
Desinfectantes.	Cada cuatro horas.
Subproductos desinfección.	Anual.
Radiactivos.	Cada cinco años.

6.3 Para metales, metaloides y compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos sintéticos y radiactivos, se modificará la frecuencia de muestreo señalada en el Cuadro 1 de esta Norma a trimestral, cuando se compruebe que la fuente de abastecimiento contenga niveles más altos de los límites máximos permisibles señalados en esta Norma.

6.4 En la prueba de *Pseudomonas aeruginosa* la frecuencia debe ser mensual y cuando se demuestre mediante información asentada en bitácora que se encuentra ausente a lo largo de 12 meses, la frecuencia será trimestral.

7. Procedimiento de evaluación de la conformidad

7.1 La evaluación de la conformidad podrá ser solicitada por el representante legal o la persona que tenga facultades para ello, ante la autoridad competente o las personas acreditadas y aprobadas para tales efectos.

8. Etiquetado

8.1 La información sanitaria que debe figurar en la etiqueta de los productos preenvasados objeto de esta Norma, así como en los envases que pongan las empresas a disposición del consumidor, además de cumplir con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana citada en el punto 2.3, del capítulo de Referencias, de esta Norma, deberá ajustarse a lo siguiente:

8.2 Se debe declarar:

8.2.1 Cuando se utilice anhídrido carbónico, éste debe reportarse con el nombre común o los sinónimos establecidos en el ACUERDO, el agua adicionada con anhídrido carbónico podrá nombrarse como agua carbonatada o gasificada.

8.2.2 En el caso del hielo deberá ostentar la leyenda "Hielo para consumo humano".

8.2.3 Para el agua mineral natural, si el producto contiene más de 0.7 mg/L de fluoruro, en la etiqueta debe aparecer como parte del nombre del producto o en un lugar visible muy cerca de éste, la siguiente frase: "**Contiene fluoruro**". Además, cuando el producto contenga más de 1.5 mg/L de fluoruro, se debe incluir en la etiqueta la siguiente frase: "**Este producto no es apto para lactantes y niños menores de siete años**".

8.3 No se permite, además de lo especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010 (véase punto 2.3, del capítulo de Referencias, de esta Norma), lo siguiente en el etiquetado y la publicidad del producto terminado:

8.3.1 Declaraciones que indiquen que el producto ha adquirido un valor especial o superior gracias a la adición de minerales o la modificación de sus propiedades tales como pH, estructura molecular, conductividad, cantidad de oxígeno, entre otros.

8.3.2 Ostentar leyendas de que el producto por sí solo sirve para adelgazar, variar las proporciones del cuerpo o bien para el control de peso.

8.3.3 Declarar u ostentar de forma escrita, gráfica o descriptiva, que los productos, su uso, ingredientes o cualquier otra característica, están recomendados, respaldados o aceptados por centros de investigación, asociaciones, entre otros.

8.4 Se podrán utilizar aquellas declaraciones de calidad de índole ecológico, religioso o de certificaciones de calidad de producto respecto a una Norma Mexicana o Norma Oficial Mexicana, siempre y cuando no se utilicen para hacer declaraciones superlativas o comparativas con otros productos equivalentes.

9. Concordancia con normas internacionales

9.1 Esta Norma es parcialmente equivalente con la CODEX STAN 108-1981. Revisiones: 1997, 2008.

10. Bibliografía

10.1 Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias.

10.2 ISO 7704: 1985 Water quality-Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses.

10.3 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 21th Ed. Washington D.C. 2005. EUA.

10.4 WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. 3th Edition, Vol. 1. World Health Organization. Geneva, 2004.

11. Observancia de la Norma

11.1 La vigilancia del cumplimiento de esta Norma Oficial Mexicana corresponde a la Secretaría de Salud y a los Gobiernos de las Entidades Federativas en sus respectivos ámbitos de competencia.

12. Vigencia

12.1 Esta Norma entrará en vigor a los 120 días naturales después de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

TRANSITORIO

ÚNICO.- La entrada en vigor de esta norma, deja sin efectos a la Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados a granel. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de octubre de 2002.

SEGUNDA SECCION
PODER EJECUTIVO
SECRETARIA DE SALUD

NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39, de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4, de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o., fracciones XXII y XXIV, 13, apartado A, fracciones I y II, 17 bis, 194, fracción I, 195, 197, 199 y 214, de la Ley General de Salud; 38, fracción II, 40, fracciones I, III, VII, XI y XIII, 41 y 47, fracción IV, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28, del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4, 15 y Quinto Transitorio, del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 36, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, así como 3, fracciones I, literal s) y II, y 10, fracciones IV y VIII, del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46, fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el 10 de abril de 2013, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, aprobó el anteproyecto de la presente Norma;

Que con fecha del 6 de mayo de 2013, en cumplimiento a lo previsto por el artículo 47, fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma, a efecto de que dentro de los sesenta días naturales siguientes a su publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario;

Que con fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación, las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47, fracción III, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, y

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, he tenido a bien expedir y ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación, de la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-210-SSA1-2014, PRODUCTOS Y SERVICIOS. MÉTODOS DE PRUEBA MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron las siguientes Instituciones y Organismos.

SECRETARÍA DE SALUD.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA.

Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Chiapas.

Laboratorio Estatal de Salud Pública Coahuila.

Laboratorio de Análisis de Riesgo del Distrito Federal.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Morelos.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nayarit.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sinaloa.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tamaulipas.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tlaxcala.

SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO DE PUEBLA.

Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Tratamiento

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Facultad de Química.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
Facultad de Ciencias Biológicas.

CÁMARA NACIONAL DE INDUSTRIALES DE LA LECHE.
Organismo Nacional de Normalización de Productos Lácteos, A.C.

RED DE TERCEROS AUTORIZADOS.

Analysis & Research Lab, S.A. de C.V.

Centro de Capacitación en Calidad Sanitaria, S.A. de C.V.

Centro de Control Total de Calidades, S.A. de C.V.

Centro de Diagnóstico Microbiológico, S.A. de C.V.

Centro Estatal de Laboratorios. Zapopan, Jalisco.

Grupo Cencon Centro de Control, S.A. de C.V.

Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos.

Laboratorio de Control de Calidad de Aguas, Bebidas y Alimentos.

Laboratorio Bio-Tekax.

Laboratorios del Sureste Cencon-Baquin, S.A. de C.V.

Laboratorio Industrial de Control para Alimentos, S.A. de C.V.

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

Laboratorios Valdés, S.A. de C.V.

Microlab Industrial, S.A. de C.V.

Silliker México, S.A. de C.V. Unidad Querétaro.

Cámara Nacional de la Industria de Transformación (CANACINTRA). Industria Láctea.

DUPONT, S.A de C.V.

Grupo Jumex, S.A de C.V.

3M México, S.A. de C.V.

ÍNDICE

1. Objetivo y campo de aplicación.
2. Referencias.
3. Definiciones.
4. Símbolos y abreviaturas.
5. Consideraciones generales.
6. Equipos.
7. Medios de cultivo.
8. Cepas de referencia
9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas.
10. Bibliografía.
11. Vigilancia de la norma.
12. Vigencia.
13. Apéndices.

Apéndice A Normativo. Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Apéndice B Normativo. Método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*.

Apéndice C Normativo. Método de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes*.

Apéndice D Normativo. Método alternativo para la estimación de Enterococos fecales en agua. Técnica de tubos múltiples.

Apéndice E Normativo. Método de referencia "Sustrato cromogénico definido y fluorogénico para determinar Enterococos en agua".

Apéndice F Normativo. Método aprobado para la determinación de Enterococos fecales en agua. Técnica de filtración por membrana.

Apéndice G Normativo. Método aprobado para el monitoreo de Enterococos fecales recomendado para el monitoreo de aguas para uso recreativo.

Apéndice H Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Apéndice I Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de *E. coli* por la técnica del NMP, para productos de la pesca.

Apéndice J Normativo. Método de referencia para la Enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa a 44°C utilizando 5-Bromo-4-cloro-Indol β -D-Glucurónido.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma tiene por objeto establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano:

- *Salmonella* spp.
 - Apéndice A Normativo.
- *S. aureus*.
 - Apéndice B Normativo.
- *L. monocytogenes*.
 - Apéndice C Normativo.
- Enterococos.
 - Apéndice D Normativo.
 - Apéndice E Normativo.
 - Apéndice F Normativo.
 - Apéndice G Normativo.
- Coliformes Fecales.
 - Apéndice H Normativo.
- *E. coli*.
 - Apéndice H Normativo.
 - Apéndice I Normativo.
 - Apéndice J Normativo.

1.2 Esta Norma es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican a efectuar los métodos a que se refiere el punto anterior en alimentos para consumo nacional o de importación y productos de exportación.

2. Referencias

2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002. Sistema General de Unidades de Medida.

2.2 Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 Caso epidemiológico: al que es reportado por la autoridad sanitaria y se realiza para detectar el agente etiológico de una enfermedad transmitida por alimentos.

3.2 Ciclo de esterilización: a la secuencia de parámetros definidos de operación (por ejemplo: tiempo, temperatura y presión) y las condiciones requeridas para obtener un producto estéril. Un ciclo de esterilización se considera válido cuando el laboratorio cuenta con un programa documentado, que proporciona la seguridad de que todas las unidades esterilizadas cumplen las especificaciones de esterilidad. Siendo un conjunto de ensayos que asegura que el proceso de esterilización funciona en la forma esperada todas las veces que se lleva a cabo.

3.3 Coliformes fecales: a los bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas dentro de las 48h a 44.5°C \pm 0.2°C en agua y a 45.5°C \pm 0.2°C en alimentos usualmente en caldo *E. coli*.

3.4 Colonias: al agrupamiento de células en forma de masas visibles, en un medio sólido que provienen de una unidad formadora de colonia.

3.5 Dilución decimal: a la solución, suspensión o emulsión obtenida después de pesar o medir una cantidad del producto bajo examen y mezclarla con una cantidad de nueve veces en proporción de diluyente.

3.6 Diluciones decimales adicionales: a las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.

3.7 *Escherichia coli* (*E. coli*): al microorganismo que está presente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, por lo que su presencia en una muestra de alimento no es deseable ya que indica la presencia de materia fecal. Este microorganismo es miembro de la familia *Enterobacteriaceae* que incluye diferentes géneros de interés sanitario (*Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, entre otras). La mayoría de los aislamientos de *E. coli* no son considerados como patógenos aunque pueden causar severas infecciones en personas inmunocomprometidas, en niños pequeños y ancianos. Ciertas cepas al ser ingeridas, pueden causar enfermedades gastrointestinales en individuos sanos. Se considera como un microorganismo común en intestino, pero existen cepas patógenas que afectan al ser humano como el serotipo O157:H7, ocasionando graves cuadros clínicos que pudieran ocasionar la muerte. Produce ácido en agar que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D glucuronido y es β -glucuronidasa positivo incubado a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $22\text{h} \pm 2\text{h}$.

3.8 *E. coli* β -glucuronidasa positiva: a la bacteria que a 44°C forma colonias típicas de color azul en el medio triptona-bilis-glucuronido.

3.9 Enterococos intestinales: a los miembros de la familia *Enterococcaceae* que incluye a *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus hirae*. Son cocos Gram positivos que al crecer se agrupan en cadenas cortas o en pares de cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, inmóviles, catalasa negativos. Al desarrollarse en los medios adecuados son capaces de reducir el 2, 3, 5- trifeniltetrazolio e hidrolizar la esculina a 44°C .

3.10 Grupo Coliforme: a los bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, sin formación de espora, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las 48h cuando se incuban a 35°C .

3.11 Hemólisis: a la zona transparente alrededor de la colonia debida a la lisis total del eritrocito, puede ser hemólisis α , en donde la lisis es parcial, la hemólisis β es una lisis completa.

3.12 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*): al bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, móvil, aerobio facultativo, β -hemolítico catalasa positivo, oxidasa negativa, capaz de crecer en condiciones de microaerofilia o psicofilia.

3.13 Métodos de referencia: a aquéllos utilizados en casos de controversia nacional o internacional y en ausencia de un método aprobado.

3.14 Métodos aprobados: a aquéllos que pueden emplearse para fines de control, inspección, reglamentación o por un programa específico y para decisiones en la protección contra riesgos sanitarios.

3.15 Métodos alternativos aprobados: a aquéllos que se encuentran referidos en las referencias internacionales como AOAC Internacional, AFNOR, ISO, FDA, CODEX, entre otras y que cuentan con validación internacional y verificación en el laboratorio de prueba, sólo pueden ser usados en el análisis del producto para el cual fue validado.

3.16 Mesofílico aerobio: al microorganismo capaz de crecer en presencia de oxígeno y cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20°C y 37°C .

3.17 *Micrococcus*: al género de bacterias Gram-positivas con células esféricas de diámetro comprendido entre 0.5 y 3 micras que típicamente aparecen en tétradas. *Micrococcus* tiene una gruesa pared celular que puede abarcar tanto como el 50% de materia celular. Su genoma es rico en guanina y citosina, típicamente en porcentaje del 65% al 75% de contenido Guanina-Citosina.

3.18 Muestra: a la cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.

3.19 Patógeno: al microorganismo capaz de producir una enfermedad.

3.20 *Salmonella* spp: al bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulado, generalmente lactosa negativa y móvil. Es una bacteria patógena para el hombre y algunos animales.

3.21 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*): a la bacteria en forma de coco, que mide de 0.8µm a 1.2µm, Gram positiva, anaerobia facultativa, no esporulada, inmóvil, catalasa positiva, capaz de producir toxinas y otras enzimas relacionadas con su patogenicidad.

3.22 Temperatura Ambiental: a la que oscila entre 18°C y 27°C.

3.23 Toxina: a la sustancia de origen microbiano que da lugar a cuadros clínicos bien definidos, en ausencia de microorganismo o que se produce dentro del huésped.

3.24 Unidades Formadoras de Colonias (UFC): a la célula o conjunto de células que dan origen a una colonia en un medio sólido.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

4.1	ABE	Agar Bilis Esculina.
4.2	ABEA	Agar Bilis Esculina Azida
4.3	AFNOR	Asociación Francesa de Normalización (Por sus siglas en francés Association Française de Normalisation).
4.4	AOAC Internacional	Asociación de Comunidades Analíticas (Por sus siglas en inglés Association of Analytical Communities).
4.5	ASB	Agar Sulfito de Bismuto.
4.6	AST	Agar Soya Trypticasa.
4.7	ASTEL	Agar triptona soya con extracto de levadura.
4.8	ATCC	Colección de Cultivos de Tipo Americano (Por sus siglas en inglés American Type Culture Collection).
4.9	β	Beta.
4.10	BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón.
4.11	Caldo A-1	Caldo de pre enriquecimiento para coliformes.
4.12	caldo EC-MUG	Caldo Escherichia coli - 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucuronido.
4.13	Caldo Fraser	Caldo pre-enriquecimiento selectivo secundario.
4.14	Caldo Fraser medio	Caldo pre-enriquecimiento selectivo primario.
4.15	CCAyAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura.
4.16	CENAM	Centro Nacional de Metrología.
4.17	CIP	Colección del Instituto Pasteur (Por sus siglas en inglés The Collection of Institut Pasteur)
4.18	cm	Centímetro.
4.19	CODEX	Normas Alimentarias Internacionales (Por sus siglas en inglés Codex Alimentarius, International Food Standards).
4.20	COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
4.21	CST	Caldo Soya Trypticaseina.
4.22	CSTEL	Caldo Triptona Soya con Extracto de Levadura.
4.23	CTT	Caldo Tetratoato sin verde Brillante.
4.24	CO ₂	Dióxido de carbono.
4.25	°C	Grados Celsius.
4.26	°	Grados.
4.27	EC	Caldo <i>E. coli</i> .
4.28	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
4.29	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> .
4.30	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i> .

4.31	EH	Agar Entérico de Hektoen.
4.32	EMB-L	Agar Azul de Metileno de Levin.
4.33	FDA	Administración de drogas y alimentos (Por sus siglas en inglés Foods and Drugs Administration).
4.34	g	Gramos.
4.35	GUD	Beta-glucuronidasa.
4.36	h	Hora.
4.37	HCl	Ácido clorhídrico.
4.38	ICMSF	Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (Por sus siglas en inglés International Commission on Microbiological Specifications for Foods).
4.39	IMViC	Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer, citrato.
4.40	ISO	Organización Internacional para la Estandarización (Por sus siglas en inglés International Organization for Standardization).
4.41	1/d	Inverso de la dilución.
4.42	KOH	Hidróxido de Potasio.
4.43	L	Litro.
4.44	±	Más menos.
4.45	>	Mayor que.
4.46	<	Menor que.
4.47	µm	Micrómetro.
4.48	Medio MA-1	Medio de pre enriquecimiento para coliformes.
4.49	min	Minuto.
4.50	MKTTn	Caldo de Muller-Kauffmann tetratonato novobiocina.
4.51	mL	Mililitro.
4.52	mm	Milímetro.
4.53	MMGB	Caldo Glutamato con Minerales Modificado.
4.54	MUG	4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido.
4.55	MU	4-metilumbelliferona.
4.56	N	Normal.
4.57	NaCl	Cloruro de Sodio.
4.58	NCTC	Colección Nacional de Cultivos (Por sus siglas en inglés National Collection of Type Culture).
4.59	nm	Nanómetro.
4.60	NMP	Número Más Probable.
4.61	ONPG	O-Nitrofenil β-D-galactopiranosido.
4.62	PALCAM	Medio PALCAM para determinar <i>Listeria</i> .
4.63	/	Por.
4.64	%	Por ciento.
4.65	pH	Potencial de Hidrógeno.
4.66	<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i> .
4.67	RM	Rojo metilo.
4.68	RPBI	Residuo Peligroso Biológico Infeccioso.
4.69	rpm	Revoluciones por minuto.

4.70	RVS	Medio de Rappaport-Vassiliadis con soya.
4.71	<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .
4.72	s	Segundos.
4.73	spp	Especies plurales.
4.74	TBX	Medio Triptona-Bilis-Glucuronido.
4.75	TBGA	Agar bilis glucuronido.
4.76	TSI	Agar triple azúcar y Hierro.
4.77	WHO	Organización Mundial de la Salud (Por sus siglas en inglés World Health Organization).

5. Consideraciones Generales

5.1 Los laboratorios de prueba que realicen estas determinaciones o análisis deberán cumplir con los requisitos establecidos en la Norma Mexicana citada en el punto 2.2, del Capítulo de Referencias de esta Norma.

5.2 Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones en que se llevan a cabo estos métodos.

5.3 Para aquellos casos en los que las personas físicas o morales que soliciten la validación de los métodos que utilicen para fines de control, inspección o programa específico, la COFEPRIS, los validará conforme a lo dispuesto en las "Guías para la aprobación de métodos alternativos", disponibles para su consulta en el portal de internet <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Paginas/Terceros-Autorizados.aspx> <http://www.cofepris.gob.mx>.

5.4 Todo el material que este en contacto con las muestras deberá estar estéril utilizando un ciclo de esterilización validado.

6. Equipos

6.1 Todos los equipos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

6.2 Los potenciómetros deben tener una precisión de verificación mínima de ± 0.1 pH a 20°C-25°C. Deben verificarse el día de uso con soluciones amortiguadoras trazables al CENAM u otro patrón nacional emitido por un Instituto Nacional de Metrología incorporado al Arreglo de Reconocimiento Mutuo del Comité Internacional de Pesas y Medidas.

6.3 Las balanzas deberán ser verificadas el día de uso utilizando un marco de pesas calibrado o verificado.

6.4 Los equipos para incubación tales como incubadoras y baños de agua, deberán demostrar muestreando diferentes puntos de la cámara, durante un tiempo determinado, que asegure las condiciones de incubación de la prueba que pueden trabajar a los intervalos de temperatura indicados en los métodos.

6.5 Cuando se indique el uso de un termómetro, éste deberá estar dentro de un programa de calibración y/o verificación vigente, esta última contra un termómetro patrón.

6.6 Las autoclaves y hornos, que se utilicen para la esterilización de material y medios de cultivo, deberán contar con instrumentos de medición calibrados. Cada ciclo de esterilización debe estar controlado paramétricamente (temperatura y presión) y con indicadores biológicos o contar con un programa de monitoreo con indicadores biológicos, considerando la frecuencia de uso y las condiciones de mantenimiento. El laboratorio debe contar con ciclos de esterilización que garanticen la esterilidad de los materiales sometidos a esterilización sin afectación de sus características, con el propósito de demostrar la distribución y la penetración del calor.

6.7 Los equipos de incubación deberán contar con termómetros calibrados con división mínima de la mitad de la variación permitida al equipo por el método, por ejemplo cuando se indique una variación de $\pm 1^\circ\text{C}$, el termómetro deberá tener una división mínima de 0.5°C .

6.8 La calibración de los equipos deberá ser trazable a un patrón nacional (CENAM).

7. Medios de Cultivo

7.1 Todos los medios de cultivo deberán usarse hasta haber aprobado el control de calidad adecuado para su uso, con excepción de los medios de cultivo que tengan como restricción el tiempo de uso, en esos casos los resultados del análisis no podrán ser emitidos hasta haber completado el control de calidad de los medios de cultivo.

7.2 Pueden utilizarse medios de cultivo preparados en el laboratorio por ingrediente, medios de cultivo preparado en polvo o listo para su uso, siempre que éstos cumplan con la formulación descrita en el método.

7.3 Debe realizarse control de calidad de los medios de cultivo. De acuerdo a un método científico.

7.4 Los reactivos a emplear en el método objeto de esta Norma deben ser grado analítico.

8. Cepas de referencia

8.1 Debido a la variabilidad inherente de los materiales biológicos es necesario demostrar que las cepas control utilizadas proceden de una colección de microorganismos que asegure la identidad y las características de los microorganismos para su uso como patrones biológicos. Las cepas control utilizadas deberán demostrar trazabilidad a una colección de microorganismos reconocida y deberán demostrar la pureza y viabilidad de las mismas.

9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

Esta Norma es totalmente equivalente con las siguientes normas internacionales.

9.1 Norma Internacional ISO 16649-3. Microbiología de los alimentos y alimento de animales. Método horizontal para el recuento de *E. coli* β -glucuronidasa positivo. Parte 3. Técnica utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronido. Primera edición (2005).

9.2 Norma Internacional ISO 7899-2 Calidad del agua. Detección y enumeración de Enterococos intestinales. Parte 2: Método de Filtración por membrana.

9.3 Norma Internacional ISO 8199 Calidad del agua. Guía general sobre la enumeración de microorganismos por cultivo. (06-2005).

9.4 Norma Internacional ISO 11290 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección y recuento de *L. monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. 1a. edición (1996). 9.5 Norma Internacional ISO 6888. Microbiología - Guía general para la enumeración de *S. aureus* - técnica de recuento de colonias, 1a. edición (05-1983).

9.6 Norma Internacional ISO 6579 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. 4a. edición (2002).

10. Bibliografía

10.1 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 21a. edición. Washington, DC. (2005).

10.2 Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant. Manual Analítico Bacteriológico, Capítulo 4, La enumeración de *E. coli* y las bacterias coliformes, marzo de 2012. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>.

10.3 Asociación Americana de Salud Pública. Compendio de métodos de análisis microbiológico de los alimentos. 4a. edición de Washington, DC. (2001).

10.4 Asociación Americana de Salud Pública. Procedimientos recomendados para el examen del agua de mar y mariscos. 4a edición. Washington, DC. (1970).

10.5 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos estándar para el examen de los productos lácteos. 16ª edición. Washington, DC. (1992).

10.6 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 20a. edición. Washington, DC. (1998).

10.7 Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. Manual de Control de Calidad Alimentaria Análisis Microbiológico. 4 revisiones (1992).

10.8 AOAC Método Oficial de Análisis. Métodos microbiológicos. Capítulo 17. 18a. edición (1995).

10.9 AOAC Método Oficial de Análisis. Métodos microbiológicos. Capítulo 17. 18a. edición (2007).

10.10 MacFaddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana (2002).

10.11 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 21a. edición. Washington, DC. (2005). Págs. 9-10.

10.12 Directiva Europea relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. 98/83/CE.

10.13 Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1, 3a. Edición.

10.14 ASTM Método de prueba Internacional estándar para Enterococos en agua usando Enterolert. D6503-99 (2009).

10.15 EPA de EE.UU. Método 1600: Enterococos en agua por filtración de membrana Usando indoxilo- β -D-glucósido Agar (MEI) (septiembre de 2002).

10.16 FDA EE.UU. Administración de Alimentos y Drogas. Programa Nacional de Sanidad de Moluscos. Guía para el control de los moluscos. Capítulo II. Zonas de cultivo. Sección IV. (2007).

10.17 FSIS USDA MLG 8.08 Aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de carnes rojas, aves de corral y huevos, y muestras ambientales.

10.18 Wallace H. Andrews, Andrew Jacobson, y Thomas Hammack. Manual Analítico Bacteriológico. Capítulo 5 *Salmonella* 8a. revisión (noviembre de 2011) <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>

10.19 Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006, "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".

10.20 Norma Internacional ISO/TS 11133-1: 2009 Microbiología de los alimentos y alimento de animales- Directrices para la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 1: Directrices generales sobre la garantía de calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio (2009).

10.21 Norma Internacional ISO/TS 11133-2: 2003. Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Directrices para la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 2: Directrices prácticas sobre las pruebas de rendimiento de los medios de cultivo.

10.22 Guía sobre la calificación de equipo de instrumentos analíticos. CENAM. Abril 2004. http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/GUIA_CALIFICACION_EQUIPOS-2004.pdf

10.23 Guía para la industria, la validación del proceso: Principios y prácticas generales.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM070336.pdf>

10.24 Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Comité de expertos de la OMS en especificaciones de preparaciones farmacéuticas. Reporte 44 Ginebra. Organización Mundial de la Salud. Serie de reportes técnicos No. 957, 2010. http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS957/TRS957_annex1_SPANISH.pdf 10.25 Buenas Prácticas de la OMS para los laboratorios farmacéuticos de microbiología. Er/09.297.2 bar. 2010. http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS961/TRS961_Annex2.pdf

10.26 Norma Internacional ISO 16649-2 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para el recuento de *E. coli*-glucuronidasa positiva - Parte 2: Técnica de recuento de colonias a 44°C utilizando 5-bromo -4-cloro-3-indol-D-glucurónido. Número de referencia ISO 16649-2: © 2001 (E) ISO 2001.

10.27 Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales. 22a. edición. Asociación Americana de Salud Pública/Asociación Americana de Obras de Agua/Federación Ambiental del Agua. 9230 B. Técnica de Tubos Múltiples.

10.28 Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales. 22a. edición. Asociación Americana de Salud Pública/Asociación Americana de Obras de Agua/Federación Ambiental del Agua. 9230 C. Técnicas de Filtración por membrana.

10.29 Norma Internacional ISO 16649-2 Primera edición 2001-04-15 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para el recuento de *E. coli*-glucuronidasa positiva - Parte 2: Técnica de recuento de colonias a 44°C utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol-D-glucurónido. Número de referencia ISO 16649-2: © 2001 (E) ISO 2001.

11. Vigilancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de esta Norma corresponde a la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y a los gobiernos de las Entidades Federativas, en el ámbito de sus respectivas competencias.

12. Vigencia

12.1 Esta Norma entrará en vigor a los 180 días naturales contados a partir del día siguiente al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

12.2 Los Apéndices Normativos de esta Norma entrarán en vigor en los plazos que se señalan en la siguiente tabla:

Apéndice Normativo	Entrada en Vigor
Apéndices C y J	A los 180 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.
Apéndices H e I	A los 270 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.
Apéndices A, B y F	A los 360 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.
Apéndices D, E y G	A los 450 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.

TRANSITORIOS

PRIMERO.- La entrada en vigor de los Apéndices **C** y **J** Normativos, dejarán sin efectos la Norma Oficial Mexicana y los capítulos de los Apéndices Normativos de las Normas Oficiales Mexicanas siguientes:

- La Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de noviembre de 1997.
- El capítulo B.16. MÉTODO DE PRUEBA MICROBIOLÓGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE *L. monocytogenes*. del APÉNDICE NORMATIVO B, de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

El capítulo B.13 Determinación de *Listeria monocytogenes*, del APÉNDICE NORMATIVO B, de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

SEGUNDO.- La entrada en vigor de los Apéndices **H** e **I**, Normativos, dejarán sin efectos la Norma Oficial Mexicana y los capítulos de los Apéndices Normativos de las Normas Oficiales Mexicanas siguientes:

- La Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias Coliformes. Técnica del número más probable, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de octubre de 1995.
- Los capítulos B.2 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE y B.6 DETERMINACIÓN DE LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* POR LA TÉCNICA DE DILUCIONES EN TUBO MÚLTIPLE, del APÉNDICE NORMATIVO B. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS, de la Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba.
- Los capítulos B 7.5 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable y B 7.6 De la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable. Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple, del APÉNDICE NORMATIVO B Métodos de Prueba, de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba., Los capítulos B.12. DETERMINACIÓN DE

BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE y B.17. DE LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* POR LA TÉCNICA DE DILUCIONES EN TUBO MÚLTIPLE, del APÉNDICE NORMATIVO B, de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

- El capítulo B.18 Estimación de la Densidad Microbiana por la Técnica del Número Más Probable de Bacterias Coliformes, Coliformes fecales y *Escherichia coli*, por la Técnica de Diluciones en Tubo Múltiple, del APÉNDICE NORMATIVO B MÉTODOS DE PRUEBA, de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

TERCERO.- La entrada en vigor de los Apéndices A y B Normativos, dejarán sin efectos las Normas Oficiales Mexicanas y los capítulos de los Apéndices Normativos de las Normas Oficiales Mexicanas siguientes:

- La Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de septiembre de 1995.
- La Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de septiembre de 1995.
- El capítulo B.4 DETERMINACIÓN DE *Salmonella* EN ALIMENTOS, del APÉNDICE NORMATIVO B. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS, de la Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba.
- Los capítulos B 7.4 Método para la determinación de *Salmonella* spp. en alimentos y B 7.8 Método para la determinación de *Staphylococcus aureus*, del APÉNDICE NORMATIVO B. MÉTODOS DE PRUEBA, de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de Prueba.
- De la NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

Únicamente del APÉNDICE NORMATIVO B, el B.14. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Salmonella* EN ALIMENTOS, y el B.15 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS.

- De la NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Únicamente del APÉNDICE NORMATIVO B, el B.11 Determinación de *Staphylococcus aureus*, y el B.12 Determinación de *Salmonella* spp.

De la NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Únicamente del APÉNDICE NORMATIVO B, los numerales, 4. Análisis microbiológico de productos objeto de esta norma; 4.4. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, y 4.5. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en productos objeto de esta norma.

CUARTO.- La entrada en vigor de la presente Norma deja sin efectos el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-210-SSA1-2002, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de septiembre de 2003.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 3 de octubre de 2014.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Mikel Andoni Arriola Peñalosa**.- Rúbrica.

13. Apéndices

Apéndice A Normativo.

Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Este método es aplicable para la detección de *Salmonella* spp en productos para consumo humano, así como de áreas de producción y manejo de alimentos especialmente en productos donde las condiciones ambientales permiten la contaminación de estos productos por microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*.

A.1 INTRODUCCIÓN.

Los miembros del género *Salmonella* spp han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección.

Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos. Las modificaciones a los métodos consideraron dos aspectos principales, el primero es el debilitamiento o daño a las células bacterianas presentes en un alimento debido al proceso a que está sujeto (por ejemplo: tratamiento térmico, secado, etc.) y segundo, la variabilidad inherente a la naturaleza del producto bajo estudio.

La determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp, en cierta cantidad de masa o volumen específico de producto, se lleva a cabo acorde a lo descrito en el presente método, requiriendo 4 etapas sucesivas. Las cuales son:

- Etapa de pre-enriquecimiento;
- Enriquecimiento selectivo;
- Aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales, e
- Identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos.

Nota: *Salmonellaspp* puede presentarse en concentraciones bajas y en algunas ocasiones ir acompañada de una gran cantidad de biota microbiana y de otras enterobacterias y otros géneros bacterianos. Es por lo que se hace necesario el pre-enriquecimiento para permitir la detección de un número bajo de bacterias o células estresadas de *Salmonella* spp.

A.2 EQUIPO.

A.2.1 Autoclave;

A.2.2 Horno que alcance 180°C;

A.2.3 Incubadora capaz de operar a 36°C ± 1°C;

A.2.4 Baño de agua capaz de operar a 41.5°C ± 1°C o incubadora capaz de trabajar a 41.5°C ± 1°C;

A.2.5 Baño de agua capaz de operar a 45°C ± 2°C;

A.2.6 Baño de agua capaz de operar a 37°C ± 1°C;

A.2.7 Potenciómetro;

A.2.8 Balanza granataria con sensibilidad de 0.1g verificada el día de uso;

A.2.9 Homogeneizador peristáltico o licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio, aluminio o acero inoxidable);

A.2.10 Equipo de filtración con trampa, y

A.2.11 Bomba de vacío.

A.3 MATERIALES.

A.3.1 Asa de platino, níquel o desechables de aproximadamente 3mm de diámetro o 10µL (microlitros);

A.3.2 Pipetas graduadas o pipetas automáticas, de diferentes capacidades 10mL, 5mL, graduadas respectivamente en divisiones de 0.5mL y 0.1mL protegidas con tapón de algodón;

A.3.3 Pipetas de 1mL, con graduaciones de 0.1mL;

A.3.4 Matraces Erlenmeyer de 500mL y/o capacidad apropiada;

A.3.5 Cajas Petri estériles de vidrio o desechables de diámetro 15mm x 100mm y/o de un diámetro mayor a 140mm;

A.3.6 Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas;

A.3.7 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm y de 20mm x 100mm o de capacidades adecuadas;

A.3.8 Gradillas para tubos de ensaye;

A.3.9 Mecheros Bunsen o Fisher;

A.3.10 Papel Indicador de pH;

A.3.11 Pinzas estériles para membrana;

A.3.12 Matraces Kitazato de 1000mL;

A.3.13 Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45µm, y

A.3.14 Manguera de hule para equipo de filtración.

Nota: El material desechable puede utilizarse como alternativa aceptable a la cristalería reutilizable si cumple las especificaciones adecuadas.

A.4 MEDIOS DE CULTIVO.

A.4.1 Agua Peptonada amortiguada;

A.4.2 RVS;

A.4.3 MKTTn;

A.4.4 XLD;

A.4.5. EH;

A.4.6 ASB;

A.4.7 Agar Verde Brillante;

A.4.8 Agar nutritivo;

A.4.9 TSI;

A.4.10 LIA;

A.4.11 Agar Urea de Christensen;

A.4.12 Medio L-Lisina descarboxilasa;

A.4.13 Solución salina fisiológica;

A.4.14 Caldo Triptona al 1%;

A.4.15 CTT;

A.4.16 CST;

A.4.17 Caldo Nutritivo;

A.4.18 Caldo Dey-Engley;

A.4.19 Leche descremada, y

A.4.20 Caldo Lactosado.

A.5 REACTIVOS.

A.5.1 Reactivos para la reacción VP (α -naftol y KOH);

A.5.2 Reactivos para la reacción de indol. Reactivo de Kovac o Erlich;

A.5.3 Antisero somático (O) polivalente de *Salmonella* spp;

A.5.4 Tolueno;

A.5.5 α -naftol;

A.5.6 Solución de creatina;

A.5.7 KOH;

A.5.8 *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (*S. Typhimurium*);

A.5.9 *Salmonella diarizonae* ATCC 12325. (*S. diarizonae*);

A.5.10 *Salmonella abortus equi* ATCC 9842. (*S. abortus equi*);

A.5.11 ONPG;

A.5.12 Novobiocina (sal sódica);

A.5.13 Yodo;

A.5.14 Yoduro de Potasio;

A.5.15 Alcohol etílico 96%;

A.5.16 4-Dimetilaminobenzaldehído;

A.5.17 HCl, r = 1.18g/mL a 1.19g/mL;

A.5.18 2-metilbutan-2-ol;

A.5.19 Cloruro de sodio;

A.5.20 Monohidrato de creatina;

A.5.21 Solución acuosa de verde brillante al 1%;

A.5.22 Tergitol/Aniónico;

A.5.23 Triton X-100;

A.5.24 NaOH 1N;

A.5.25 Alcohol al 70%;

A.5.26 Sulfato Ferroso, y

A.5.27 K₂ SO₃ Sulfato de Potasio.

A.6 CONDICIONES DE PRUEBA.

A.6.1 Muestreo.

Es importante que el laboratorio se cerciore de recibir una muestra representativa y que no haya tenido daños o cambios durante el transporte y/o almacenamiento.

El muestreo no es parte del método especificado aquí, es recomendable que las partes involucradas en este punto lleguen a un acuerdo al respecto, pueden utilizarse diversos estándares internacionales tales como los planes de muestreo del CODEX alimentarios o las guías del ICMSF.

A.6.2 Preparación de la muestra de ensayo.

Lineamientos generales para la preparación de las muestras.

A.6.2.1 General.

La preparación de la suspensión inicial requiere 25g de la muestra en 225mL del medio de pre-enriquecimiento, para obtener una dilución 1:10.

En una situación atípica y justificada, si la porción de muestra utilizada en el ensayo es distinta a 25g, se deberá utilizar la cantidad necesaria de medio de pre-enriquecimiento para obtener una dilución 1:10.

En casos excepcionales, cuando es necesario analizar más de una porción de 25g de un lote específico de alimento y teniendo evidencia de que si hay mezcla de tales porciones no afecta el resultado, las muestras pueden ser compuestas; es decir, si 10 muestras de 25g serán examinadas, combinar las 10 porciones para obtener 250g y adicionar 2.25L del caldo de pre-enriquecimiento precalentado a 36°C ± 1°C.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que para inocular el caldo selectivo RVS y MKTTn aumentarán las porciones de 10mL a 100mL teniendo que inocular 1mL y 10mL respectivamente. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.2 Productos que contienen cacao.

Agregar al agua peptonada amortiguada 50g/L de caseína (no usar caseína ácida) o 100g/L de leche descremada en polvo, incubar a 36°C ± 1°C por 2h, añadir 0.018g/L de verde brillante. Continuar como se indica en el punto A.7.

A.6.2.3 Productos ácidos y acidificantes.

Asegurarse de que el pH no se encuentre por debajo de 4.5 durante el pre-enriquecimiento, puede utilizarse agua peptonada amortiguada a doble concentración. En caso de que se requiera subir el pH a más de 4.5 utilizando NaOH 1N, registrar esta cantidad para alcanzar un pH entre 5 y 7. Continuar como se indica en el punto A.7.

A.6.2.4 Preparación de la muestra para moluscos en concha.

En general, deben tomarse un mínimo de 10 a 12 moluscos bivalvos, a fin de obtener una muestra representativa y permitir la selección de animales completos disponibles para su desconche. Con la mayoría de las especies, esto permite una adecuada selección y se obtendrán aproximadamente 200g de licor y carne. Por otro lado diez a doce piezas de ciertas especies pequeñas de moluscos bivalvos, pueden producir mucho menos que 100g de licor y carne por lo que se deben usar de veinte piezas a treinta piezas de estas especies para obtener el peso adecuado.

Limpieza de la concha. Lavarse las manos con agua potable y jabón antes de comenzar. Enjuagar el exceso de suciedad de las conchas y cepillar con un cepillo estéril, ocupando uno para la muestra completa; bajo el chorro de agua potable poniendo particular atención en las hendiduras de las conchas. Colocar las conchas limpias en toallas de papel absorbente o gasas limpias. Desechar los moluscos que tengan las conchas dañadas o con las valvas abiertas.

Remoción del contenido. Lavarse las manos con agua, jabón y enjuagarse con alcohol al 70%. Se puede utilizar guantes para evitar lesionarse. Sostener el molusco en la mano sobre una gasa dirigiendo la unión de las valvas o bisagra hacia el analista apoyándose sobre la mesa. Con un cuchillo desconchador estéril, insertar la punta entre las valvas y hacer palanca para cortar el músculo abductor. Drenar el licor de la concha dentro de un recipiente estéril. Cortar el músculo abductor de las conchas y vaciar el cuerpo del animal dentro del mismo recipiente. Continuar como se indica en el punto A.6.2.5

A.6.2.5 Procedimiento para moluscos, desconchados y congelados.

Pesar el total de la muestra, máximo 200g (carne y licor) y adicionar igual cantidad de agua peptonada amortiguada para obtener una dilución 1:2. Licuar por 2 min. Continuar como se indica en el punto A.7.

A.6.2.6 Yema de huevo en polvo, clara de huevo en polvo, huevo en polvo, leche fluida, leche descremada, leche con 2% de grasa, entera y suero de leche. Mezclas preparadas en polvo (Harinas para pastel, galletas, donas, biscoques y pan) Fórmulas infantiles y alimentos para administración por cánula u oral, que contengan huevo. Si las muestras no están en polvo, agregar 225mL de agua peptonada amortiguada. Si el producto es un polvo, agregar aproximadamente 15mL de agua peptonada y agitar con una varilla de vidrio, cuchara o abate lenguas, hasta obtener una suspensión homogénea. Agregar tres porciones más de 10mL, 10mL y 190mL para un total de 225mL. Agitar suficientemente hasta que la suspensión no contenga grumos. Tapar el frasco y dejar en reposo durante 60 min \pm 5 min a temperatura del laboratorio promedio que oscila entre 18°C y 27°C. Mezclar por agitación, aflojar la tapa a 1/4 de vuelta, e incubar a 36°C \pm 1°C 18h \pm 2h. Continuar como se indica en el punto A.7.2..

A.6.2.7 Huevos.

A.6.2.7.1 Huevo en cascarón. Eliminar cualquier material ajeno adherido a la superficie del cascarón. Desinfección del cascarón: Preparar la solución desinfectante (1:3) que consiste en adicionar tres partes de una solución de etanol o isopropanol al 70% a una parte de solución de yodo/yoduro de potasio. Preparar una solución de alcohol al 70% diluyendo 700mL de etanol al 100% hasta completar un volumen final de 1000mL de agua destilada estéril o bien diluir 700mL de alcohol al 95% con agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 950mL. La solución de yodo/yoduro de potasio se prepara como sigue: Pesar 100g de yoduro de potasio y disolver en 200mL-300mL de agua destilada estéril. Adicionar 50g de yodo y calentar suavemente con agitación constante hasta disolver el yodo. Disolver esta solución hasta completar un volumen final de 1000mL de agua destilada estéril y almacenar en una botella ámbar con tapón de vidrio en la oscuridad. Sumergir los huevos en esta solución por al menos 10s, sacarlos y dejar secar al aire. Cada muestra consiste de 20 huevos, en un total de 50 muestras por cada gallinero. Abrir los huevos en condiciones asépticas con guantes estériles y pasar a un recipiente estéril, cambiar guantes entre cada muestra. Evitar que fragmentos del cascarón caigan en el contenedor. Mezclar completamente las yemas y claras con una cuchara o cualquier otro instrumento estéril. Mantener las muestras a temperatura ambiente (20°C-24°C) por 96h \pm 2h. Después de este tiempo, tomar 25mL o 25g de la mezcla anterior y 25mL de un CST de prueba (testigo) en un contenedor de 500mL y agregar 225mL de CST suplementado con sulfato ferroso (35mg de sulfato ferroso a 1000mL de CST). Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante 60 min \pm 5min a temperatura ambiente. Mezclar nuevamente por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH, si es necesario, a 6.8 \pm 0.2. Incubar 24h \pm 2h a 36°C \pm 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.7.2 Huevo entero líquido (homogeneizado). Combinar 15 porciones de 25mL cada una para dar una muestra combinada de 375mL en un matraz Erlenmeyer de 6L. Mantener esta mezcla a temperatura ambiente (20°C -25°C) por 96h ± 2h. Después de este tiempo, adicionar 3375mL de CST suplementado con sulfato ferroso. Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante 60 min ± 5 min a temperatura ambiente. Mezclar nuevamente por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH, si es necesario, a 6.8 ± 0.2. Incubar 24h ± 2h a 36°C ± 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.7.3 Huevo cocido o hervido (de pollo, pato u otros). Si el cascarón del huevo se encuentra intacto, desinfectar como se describe en el inciso A.6.2.7.1 y separar en condiciones asépticas el cascarón. Pulverizar la yema y la clara y pesar 25g en un matraz Erlenmeyer de 500mL u otro recipiente apropiado. Agregar 225mL CST (sin sulfato ferroso). Mezclar bien por agitación y continuar como se describe para huevo en cascarón. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.8 Leche descremada en polvo y Caseína. Pesar 50g de producto en 1L de agua peptonada amortiguada, incubar a 36°C ± 1°C por 24h ± 2h, después de 2h de incubación, adicionar 2mL de solución verde brillante 1% si el alimento tiene alta probabilidad de estar contaminado con microbiota Gram Positivo. Incubar durante 18h ± 2h a 36°C ± 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.9 Productos que contienen huevo (pastas, rollos de huevo, macarrones, espagueti), quesos, ensaladas preparadas a base de: jamón, huevo, pollo, atún, pavo; frutas y verduras frescas congeladas o secas; frutas secas, carne, crustáceos (camarones, cangrejo, cangrejo de río, langosta, langostinos) y pescado. De preferencia, no descongelar muestras congeladas, antes de someterlas al análisis. Si la muestra está congelada para obtener una submuestra para el análisis, descongelar en un baño de agua con temperatura controlada y flujo continuo a 45°C ± 0.2°C durante 15min, o mantener la muestra durante 18h de 2°C-5°C. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra en un vaso de licuadora. Agregar 225mL de agua peptonada amortiguada y licuar por 2 min. Pasar a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL. Mezclar por agitación, aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante 18h ± 2h a 36°C ± 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.10 Levadura seca (levadura activa e inactiva). Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL. Agregar 225mL de CST. Mezclar bien hasta formar una suspensión homogénea. Dejar en reposo, a la temperatura del laboratorio, durante 60 min ± 5 min, con la tapa bien cerrada. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2. Mezclar bien antes de ajustar el pH final. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante 24h ± 2h a 36°C ± 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.11 Mezclas para repostería o cremas pasteleras. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL. Agregar 225mL de caldo nutritivo y mezclar bien. Dejar en reposo a la temperatura del laboratorio, durante 60 min ± 5 min, con la tapa bien cerrada. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2 mezclar bien, antes de ajustar el pH final. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante 24h ± 2h a 36°C ± 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.12 Especies.

A.6.2.12.1 Pimienta negra, pimienta blanca, semillas de apio en hojuelas, chile en polvo, cominos, paprika, hojuelas de perejil, romero, semilla de ajonjolí, tomillo y yerbas en hojuelas. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL. Agregar 225mL de CST. Mezclar bien. Dejar en reposo con la tapa bien cerrada, durante 60 min ± 5 min a temperatura de laboratorio. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2. Mezclar bien, antes de ajustar el pH final. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante 24h ± 2h a 36°C ± 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.12.2 Cebolla en hojuelas, cebolla en polvo, ajo en hojuelas. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL. Pre-enriquecer la muestra en CST adicionado con K₂SO₃ (5g K₂SO₃ por 1000mL de CST, resultando una concentración final de 0.5% de K₂SO₃). Agregar el K₂SO₃ al caldo antes de esterilizar, distribuir en volımenes de 225mL en matraces Erlenmeyer de 500mL esterilizar a 121°C por 15 min. Después de esterilizar, determinar el pH asépticamente, ajustando de 5 a 7. Incubar a 36°C ± 1°C durante 24h ± 2h. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.12.3 Pimienta de Jamaica, canela, clavo y orégano. Hasta ahora, no se conocen métodos para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Lo que se recomienda para su análisis, es diluirlas más allá de su nivel tóxico. En el caso de la pimienta de Jamaica, canela y orégano; preparar diluciones con una relación 1:100 muestra/CST; y para el clavo, una relación 1:1000. En el caso de condimentos en hojas secas, preparar diluciones cuya relación sea mayor a 1:10, debido a las dificultades que se han encontrado para que

el caldo se absorba en productos deshidratados. Analizar estas especias como se describe para la pimienta negra, manteniendo las relaciones muestra/CST, recomendadas. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto en A.7.2.

A.6.2.13 Dulce, cubierta de dulce (incluyendo chocolate). Pesarse en condiciones asépticas, 25g de muestra en un vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico tipo Stomacher. Agregar 225mL de leche descremada, reconstituida, estéril y licuar por 2 min. Pasar la mezcla homogeneizada a un frasco de boca ancha, con tapón de rosca de 500mL y dejar en reposo durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada, a temperatura del laboratorio. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador y/o potenciómetro. Ajustar el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2 . Agregar 0.45mL de solución acuosa de verde brillante al 1% y mezclar bien. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.14 Coco. Pesarse, en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Agregar 225mL de caldo lactosado estéril. Agitar bien y dejar en reposo a la temperatura del laboratorio durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2 . Agregar hasta 2.25mL de Tergitol/Aniónico (pasado por vapor fluente durante 15min) y mezclar bien. Alternativamente se puede usar Triton X-100 (pasado por vapor fluente durante 15min). Limitar el uso de estos surfactantes a la cantidad mínima necesaria para evitar la formación de espuma. En el caso de Triton X-100, con dos gotas a tres gotas es suficiente. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.15 Colorantes y sustancias coloridas para alimentos. En el caso de colorantes con pH mayor a 6.0 (suspensiones acuosas al 10%), aplicar el método descrito para huevo entero desecado.

A.6.2.16 Colorante (lacas) o colorantes con pH abajo de 6.0. Pesarse en condiciones asépticas, 25g de muestra en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Agregar 225mL de CTT sin verde brillante. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH. Agitar bien y dejar en reposo a la temperatura ambiente durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada. Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 y agregar 2.25mL de solución al 0.1% de verde brillante mezclar completamente, por agitación. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.17 Gelatina. Pesarse, en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Agregar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril, agregar 5mL de solución acuosa de papaína al 5% y mezclar bien. Colocar la tapa bien cerrada e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $60\text{min} \pm 5\text{min}$. Mezclar bien y aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.18 Carnes, substitutos de carne, productos cárnicos, sustancias de origen animal, glándulas y otros alimentos (pescado, carne y hueso). Pesarse, en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un vaso de licuadora. Agregar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2min. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.19 Ancas de rana. Colocar 15 pares de ancas de rana en una bolsa de plástico estéril y cubrirlas con agua peptonada amortiguada en una proporción 1:9 muestra/caldo (g/mL). Si se estima que un solo par de ancas, pesa un promedio de 25g o más, analizar un solo par, por cada 15 pares. Colocar la bolsa en un vaso de plástico grande o cualquier otro recipiente. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar el análisis, como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.20 Conejo en canal. Introducir el conejo en una bolsa de plástico estéril y colocarlo en un vaso u otro contenedor de tamaño suficiente para sumergir la canal. Adicionar agua peptonada amortiguada en una proporción 1:9 muestra/caldo (g/mL) para cubrir la muestra. Mezclar bien con agitación. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar el análisis como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.21 Jugo de naranja (pasteurizado y sin pasteurizar), jugo de manzana (pasteurizado y sin pasteurizar). En condiciones asépticas, agregar 25mL de la muestra y 225mL de agua peptonada amortiguada, en un frasco de boca ancha estéril, con tapa de rosca de 500mL u otro recipiente apropiado. Agitar para mezclar completamente. Incubar con la tapa suelta por $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.22 Orejas de puerco. Colocar en un bolsa de plástico una pieza (de dos a tres piezas si éstas son pequeñas) por cada unidad analítica. Introducir la bolsa en un vaso o en un contenedor adecuado. Adicionar agua peptonada amortiguada en una proporción 1:9 de muestra/caldo (g/mL) para cubrir las piezas. Mezclar bien con agitación e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.23 Melones. Preferentemente no descongelar las muestras antes del análisis. Si la muestra está congelada atemperar las muestras para obtener la porción analítica. Descongelar en un baño de agua con temperatura controlada con termostato, a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a 2°C - 5°C durante 18h. Para la fruta picada o cortada, pesar 25g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2 min. Pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Aflojar la tapa e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.24 Para melones enteros. No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar los melones en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente agua peptonada amortiguada que permita que el melón flote. El volumen del agua peptonada amortiguada puede ser una y media veces el peso del melón. Por ejemplo los melones pesan 1500g probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 2250mL de agua peptonada amortiguada. Adicionar más agua peptonada amortiguada si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los melones y el agua en un vaso u otro contenedor de tamaño suficiente para sumergir los melones. Doblar el extremo de la bolsa de plástico de forma segura pero no apretada para que permita el paso de aire durante la incubación. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2

A.6.2.25 Mangos. De preferencia, no descongelar las muestras antes de su análisis. Si están congeladas, atemperar las muestras para obtener la porción analítica. Descongelar en un baño de agua con temperatura controlada y termostato, a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a 2°C - 5°C durante 18h. Para la fruta picada o cortada, pesar 25g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2 min. En condiciones asépticas, pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente de tamaño suficiente para sumergir los mangos. Aflojar la tapa 1/4 de vuelta e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.26 Para mangos enteros. No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar el mango en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente agua peptonada amortiguada que permita que el mango flote. El volumen del agua peptonada amortiguada puede ser una vez el peso los mangos. Por ejemplo los mangos pesan 500g, probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 500mL de agua peptonada amortiguada para que floten. Adicionar más agua peptonada amortiguada si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los mangos y el agua peptonada amortiguada en un vaso u otro contenedor de 5L. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2

A.6.2.27 Tomates (tomates rojos o jitomates). Para la fruta picada o cortada, pesar 25g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2 min. En condiciones asépticas, pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente de tamaño adecuado para sumergir los tomates. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en A.7.2.

A.6.2.28 Para tomates enteros. No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar los tomates en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente agua peptonada amortiguada que permita que los tomates floten. El volumen del agua peptonada amortiguada puede ser una vez el peso de los tomates. Por ejemplo los tomates pesan 300g probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 300mL de agua peptonada amortiguada. Adicionar más agua peptonada amortiguada si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los tomates y el caldo en un vaso u otro contenedor adecuado. Doblar el extremo de la bolsa de plástico de forma segura pero no apretada para que permita el paso de aire durante la incubación. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como en el punto A.7.2.

A.6.2.29 Muestras ambientales. Muestrear superficies ambientales con hisopos o esponjas estériles. Colocarlos en una bolsa estéril que contenga suficiente caldo Dey-Engley o solución de fosfatos para cubrir los hisopos o esponja. Transportar las muestras protegidas en un contenedor con paquetes de gel congelado para mantener las muestras frías, pero no congeladas. Si las muestras no pueden ser procesadas inmediatamente, refrigerarlas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Analizar las muestras dentro de las siguientes $48\text{h} \pm 2\text{h}$ después de haber sido muestreadas, agregar a la bolsa o contenedor que contiene los hisopos o esponjas 225mL de agua peptonada amortiguada estéril. Agitar bien el contenido. Cerrar el contenedor, mezclar, por movimientos circulares vigorosos, mantener a temperatura ambiente por $60\text{min} \pm 5\text{min}$. Mezclar con movimientos circulares y medir el pH con papel indicador, cuando sea necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 , aflojar la tapa o la boca de la bolsa e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.30 Semillas de alfalfa y frijoles. En condiciones asépticas pesar 25g de semillas de alfalfa y frijoles en un matraz Erlenmeyer. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada agitar el matraz. Cubrir la boca del matraz con papel aluminio estéril. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.31 Agua para consumo humano. Debido a que el agua para consumo humano pasa por procesos de potabilización y purificación, los niveles de microorganismos viables son bajos, por lo que es necesario utilizar métodos de concentración.

A.6.2.31.1 Filtración por membrana. Este método es recomendable para aguas con baja turbiedad. Filtrar 1L o más de la muestra de agua. Retirar la membrana y colocarla en 50mL de agua peptonada amortiguada. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se describe en el punto A.7.2.

Nota: Para porciones grandes de agua peptonada amortiguada precalentar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes de la inoculación de la muestra a analizar.

A.7 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

A.7.1 Pre-enriquecimiento.

En caso de uso general utilizar como medio de pre-enriquecimiento agua peptonada amortiguada incubar la dilución inicial a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

Para moluscos en concha, desconchados y congelados. Inocular a temperatura ambiente 50g del homogenizado (dilución 1:2) a 200mL de agua peptonada amortiguada e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

A.7.2 Enriquecimiento selectivo.

Transferir 0.1mL del cultivo de pre-enriquecimiento a un tubo del 10mL de caldo RVS y 1mL a un tubo conteniendo 10mL de caldo MKTTn.

Incubar el caldo RVS a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$ y el caldo MKTTn a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

A.7.3 Aislamiento e identificación.

Para el aislamiento, inocular a partir de los cultivos obtenidos en el punto anterior, 3 medios selectivos en placa como sigue:

Agar XLD para el aislamiento de colonias típicas y ASB para aislamiento de colonias lactosa positivas y cualquier otro medio selectivo sólido complementario. El laboratorio puede seleccionar que medio utilizar. Por ejemplo, se pueden elegir el EH, Agar Verde Brillante, entre otros incluidos agares cromogénicos.

El agar XLD se incuba a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$, el segundo y tercer agar selectivo incubar de acuerdo a las recomendaciones contenidas en los manuales de medios de cultivo de los fabricantes.

A.7.3.1 Morfología Colonial Típica de *Salmonella* spp.

Seleccionar 1 o más colonias de *Salmonella* spp de acuerdo con las características siguientes, en cada agar selectivo:

A.7.3.1.1 XLD. Colonias rosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras.

A.7.3.1.2 EH. Colonias azul-verdes o azules, con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras, después de haber sido incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

A.7.3.1.3 ASB. Colonias café, grises o negras; algunas veces pueden presentar brillo metálico y el medio circundante a la colonia generalmente es café al principio y a medida que se prolonga el tiempo de incubación, pueden aparecer de color negro. Después de haber sido incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$ o hasta 48h.

A.7.3.1.4 Agar VB. Colonias incoloras rosadas o fúshua, transparentes u opacas, sobre el medio coloreado de rosado a rojo, las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Si se presentan colonias típicas en ASB después de $24\text{h} \pm 2\text{h}$ de incubación, seleccionar al menos 1 colonia. Si por el contrario, no se observan colonias típicas a las $24\text{h} \pm 2\text{h}$, re-incubar las placas de ASB, otras $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Después de $48\text{h} \pm 2\text{h}$ de incubación, seleccionar si están presentes, al menos 1 colonia típica. Si las colonias seleccionadas, no dan reacciones típicas en TSI y LIA, el cultivo se considera como negativo a *Salmonella* spp.

A.7.3.2 Morfología Colonial Atípica de *Salmonella* spp.

En ausencia de colonias típicas sospechosas de *Salmonella* spp, buscar colonias atípicas con las características siguientes:

A.7.3.2.1 Agares EH y XLD. Muy pocos cultivos atípicos de *Salmonella* spp, producen colonias rosa salmón o amarillas respectivamente con o sin centro negro. En ausencia de colonias típicas, en EH y XLD, seleccionar 2 o más colonias atípicas.

Nota: Existen algunas cepas de *Salmonella* spp con un comportamiento bioquímico diferente al resto del género, por ejemplo *S. Paratyphi A* al crecer en XLD genera colonias rosas con el centro más oscuro y no produce H₂S. Otras salmonelas atípicas producen ácido a partir de la lactosa y al crecer en XLD dan colonias amarillas con o sin el centro negro.

A.7.3.2.2 ASB. Algunos cultivos producen colonias verdes con un halo oscuro muy pequeño. Si después de 48h de incubación (como se explicó anteriormente), no hay colonias típicas sospechosas en ASB, seleccionar 2 o más colonias atípicas.

A.7.3.3 Cultivos Control Sugeridos.

Además de los cultivos control positivos (*Salmonella* Typhimurium ATCC14028), deben usarse controles adicionales para ayudar a la selección de colonias atípicas, se recomiendan: *S. diarizonae* (ATCC 12325) lactosa positivo, H₂S positivo y *S. abortus equi* (ATCC 9842), lactosa-negativo, H₂S-negativo; o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa-positivo, H₂S-negativo.

A.7.3.4 Selección de colonias para su confirmación.

Para la confirmación, tomar de cada agar selectivo al menos 1 colonia considerada como típica o en total 3 colonias sospechosas si no existe la primera posibilidad.

En casos epidemiológicos, identificar al menos 5 colonias sospechosas, si en una placa se encuentran menos de 5 colonias típicas o sospechosas, confirmar todas las colonias que se encuentren en el medio.

Estriar cada colonia seleccionada en cualquier agar nutritivo, preferiblemente sin agua de condensación, de tal manera que permita el aislamiento de colonias. Incubar las placas inoculadas a 36°C ± 1°C durante 24h ± 3h.

Utilizar cultivos puros para la confirmación por pruebas bioquímicas y serología.

A.7.3.5 Confirmación Bioquímica.

A partir del agar nutritivo, con un asa recta estéril, tocar ligeramente el centro de la colonia seleccionada e inocular en tubos de agar inclinado de TSI y LIA. Sembrar por picadura en el fondo y estría en la superficie inclinada. Debido a que la reacción de descarboxilación de la lisina, es estrictamente anaerobia, el fondo del medio de LIA, debe medir 4cm y el bisel de al menos 2.5cm.

Mantener las placas de agares selectivos y nutritivos entre 2°C-8°C, hasta la conclusión del análisis.

Incubar los tubos de TSI y LIA a 36°C ± 1°C por 24h ± 3h. Dejar los taponetes flojos de los tubos para mantener condiciones de aerobiosis mientras se incuban evitando excesiva producción de H₂S. Interpretar los cambios de color como se describe a continuación:

TSI: Fondo del medio;

- Amarillo, glucosa positiva.
- Rojo o sin cambio de color, glucosa negativa.
- Negro, formación de sulfuro de hidrógeno.
- Burbujas o grietas en el medio, formación de gas debido a la utilización de la glucosa.

TSI: Superficie inclinada.

- Amarillo, lactosa y/o sacarosa positivos.
- Rojo o sin cambio de color, lactosa y/o sacarosa negativa.

Las colonias típicas de *Salmonella* spp, producen alcalinidad (color rojo) en la parte inclinada del medio y ácido (color amarillo) en el fondo; con producción de gas y cerca del 90% de los casos producen H₂S (ennegrecimiento del agar). Cuando alguna *Salmonella* spp lactosa positiva es aislada, el agar de TSI se torna completamente amarillo.

En LIA, *Salmonella* spp produce reacción alcalina (color púrpura) considerar como negativos los cultivos que produzcan claramente un color amarillo en el fondo del tubo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* spp producen H₂S en LIA.

Todos los cultivos que den reacción alcalina en el fondo del medio de LIA, independientemente de la reacción que hayan dado en TSI, deben retenerse como aislamientos presuntivos de *Salmonella* spp, para someterlos a pruebas bioquímicas adicionales y pruebas serológicas.

Para los cultivos de TSI que se consideran presuntivos para *Salmonella* spp, continuar como se indica en Identificación de *Salmonella* spp para determinar la especie, incluyendo *Salmonella arizonae*.

a) Prueba de ureasa (convencional).

Con un asa estéril inocular tubos de agar urea de Christensen. Debido a que algunas veces los tubos de agar urea de Christensen sin inocular, pueden virar a rojo púrpura (prueba positiva), debe incluirse, un tubo de este agar sin inocular como control en una prueba negativa. Para *Salmonella* spp no se produce cambio en la coloración (amarillo anaranjado). Incubar 24h ± 2h a 36°C ± 1°C.

b) Caldo L-lisina descarboxilasa.

Si la prueba de LIA fue satisfactoria, no es necesario repetirla. Si la reacción de LIA fue dudosa, utilizar caldo lisina descarboxilasa para la determinación final de lisina descarboxilasa. Inocular el caldo con pequeña cantidad de cultivo. Cerrar la tapa fuertemente e incubar a 36°C ± 1°C por 24h ± 3h. Las especies de *Salmonella* spp dan reacción alcalina por descarboxilación de la lisina (color púrpura del medio). La prueba negativa se interpreta por un color amarillo del medio. Si el medio aparece descolorido (ni púrpura, ni amarillo), agregar unas gotas de colorante púrpura de bromocresol al 0.2% y leer nuevamente la reacción.

c) Detección de β-galactosidasa.

Colocar la colonia seleccionada en un tubo conteniendo 0.25mL de solución salina, agitar para obtener una suspensión homogénea. Adicionar una gota de tolueno y agitar. Colocar el tubo en un baño de agua a 36°C ± 1°C dejar reposar por aproximadamente 5 min. Adicionar 0.25mL del agente de detección de la β-galactosidasa y mezclar. Colocar nuevamente el tubo en el baño de agua a 36°C ± 1°C y dejar por 24h ± 3h. Examinar el tubo a intervalos de tiempo. Un color amarillo es indicativo de reacción positiva, la cual se hace evidente en aproximadamente 20 min. Si se utilizan discos comerciales, seguir las instrucciones del fabricante.

d) Prueba de Indol.

Inocular un tubo conteniendo 5mL del caldo triptona con una suspensión homogénea de la colonia sospechosa.

Incubar a 36°C ± 1°C por 24h ± 3h después de la incubación adicionar de 0.2mL a 0.3 mL de reactivo de Kovac, sin agitar y resbalando por las paredes.

La formación de un anillo de color rojo indica una reacción positiva. Un anillo de color amarillo indica una reacción negativa.

e) Prueba de VP.

Re-suspender una asada de la colonia seleccionada en un tubo estéril conteniendo 3mL del medio VP. Incubar 36°C ± 1°C por 24h ± 3h.

Después de la incubación adicionar dos gotas de solución de creatina, tres gotas de solución á-naftol y al final dos gotas de solución de KOH, agitar después de cada reactivo.

f) Identificación presuntiva del género *Salmonella* spp.

Alternativamente se pueden utilizar pruebas bioquímicas miniaturizadas o métodos de biología molecular disponibles en el mercado para la identificación presuntiva de género *Salmonella* spp, se deberá utilizar un sistema adecuado basado en el sistema bioquímico descrito en esta sección. Estos sistemas bioquímicos deberán contar con validación y no deben ser usados como sustitutos de las pruebas serológicas. Inocular e incubar estos sistemas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A.7.3.5.1 Interpretación de las pruebas bioquímicas.**Tabla A.1 Interpretación de pruebas bioquímicas.**

Pruebas ^a	Cepas de <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>		<i>S. Paratyphi C</i>		Otras cepas	
	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	Reacción	% ^c	Reacción	% ^c	Reacción	% ^b
TSI producción de ácido de la glucosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI formación de gas de la glucosa	- ^d	0	+	100	+		+		+	92
TSI producción de ácido de la lactosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI producción de ácido de sucrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI producción de sulfuro de hidrogeno	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Descarboxilación de la lisina	-	98	-	0	+		+		+	95
Reacción de β-galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 ^e
Reacción Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Producción de indol	-	0	-	0	-		-		-	1
^a Ewing, W.h. y Ball, M. M. The biochemical reactions of the genus <i>Salmonella</i> . National Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1996. ^b este porcentaje indica que no todas las cepas de <i>Salmonella</i> muestran la reacción indicada puede ser más o menos. Estos porcentajes pueden variar dependiendo de los serotipos de intoxicación alimentaria y su lugar de procedencia. ^c los porcentajes no han sido encontrados en la literatura. ^d <i>Salmonella Typhi</i> es anaerobio. ^e La <i>Salmonella</i> entérica subespecie <i>Arizonae</i> puede ser positiva o negativa a la lactosa pero siempre será β-galactosidasa positiva.										

S. diarizonae (ATCC 12325) lactosa positivos, H₂S positivo y *S. abortus equi* (ATCC 9842), lactosa-negativo, H₂S-negativo; o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa-positivo, H₂S-negativo.

A.7.3.5.2 Pruebas Serológicas.**A.7.3.5.3 General.**

La aglutinación con el antisuero polivalente Poly A-I & Vi, puede usarse como resultado confirmatorio de la presencia de *Salmonella* spp para las cepas probadas por TSI y LIA, existen cepas que no aglutinan con el polivalente, pero que dan reacciones típicas en TSI y LIA, para éstas es necesario confirmar usando la batería completa de bioquímicas.

A.7.3.5.4 Eliminación de las cepas autoaglutinables.

Deposite una gota de solución salina, en un portaobjetos perfectamente limpio. Disperse con un asa, parte de la colonia a probar en la gota, de manera que se obtenga una suspensión homogénea y turbia. Rote suavemente la lámina por 30s a 60s. Observe el resultado sobre un fondo oscuro, preferiblemente con la ayuda de una lupa. Si las bacterias se agrupan en grumos de diferentes tamaños, la cepa se considera como autoaglutinable deberán identificarse por pruebas bioquímicas complementarias y no someterse a la serotipificación.

NOTA: También es posible dispersar parte de la colonia a analizar en una gota de agua y luego mezclar esta solución con una gota de la solución salina.

A.7.3.5.5 Detección de los antígenos Poly A-I & Vi.

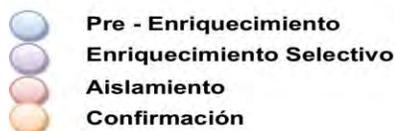
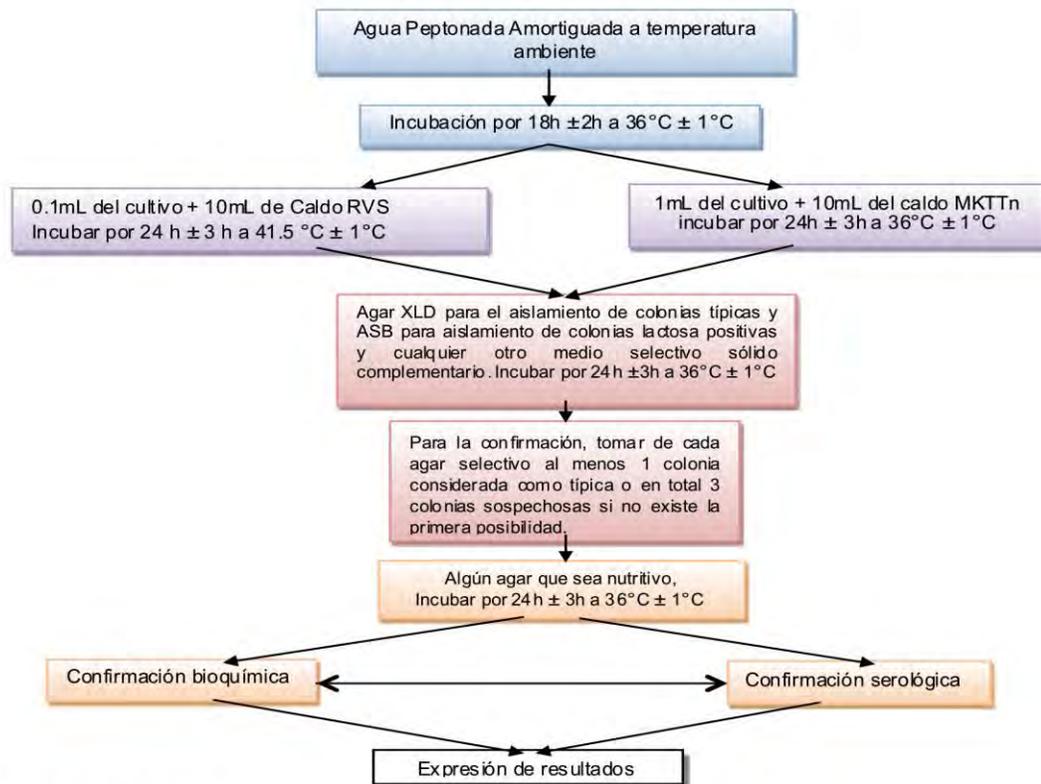
Empleando una colonia pura no autoaglutinable, proceda, empleando una gota de la solución salina en una lámina de vidrio, disperse con el asa hasta obtener una suspensión homogénea y agregue una gota del antisuero O. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva del antisuero O en lugar de la solución salina. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva.

Para fines de vigilancia sanitaria, enviar el cultivo al laboratorio de referencia CCAyAC de la COFEPRIS para su identificación serológica o molecular.

A.8 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

a) Los cultivos determinados como presuntivos con las pruebas bioquímicas y confirmados por la serología, informar como:

Salmonella spp en 25g: PRESENCIA.



b) Descartar los cultivos con resultados atípicos a partir de las pruebas bioquímicas miniaturizadas clasificadas como no *Salmonella* spp, informar:

Salmonella spp en 25g: AUSENCIA.

c) Placas con agar XLD, ASB y el tercer medio selectivo sin desarrollo y/o colonias atípicas, informar:

Salmonella spp en 25g: AUSENCIA.

d) En caso de que la cantidad sea menor a 25g se debe reportar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp en la porción de ensayo (g o mL) de producto utilizado.

e) Para los casos en los que se analiza una pieza de producto reportar como presencia o ausencia por piezas analizadas.

A.9 AYUDA VISUAL.**A.10 FORMULACIONES Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**

Alternativamente pueden utilizarse medios comerciales con excepción del medio RVS ya que en punto A.10.2.1.2 se indica que debe prepararse por ingredientes

La caducidad de los medios de cultivo una vez preparado deberá ser demostrada en el laboratorio bajo las condiciones de almacenamiento particulares con excepción del medio RVS y que en el punto **A.10.2.4.2 indica que debe ser usado el día de su preparación, el Caldo MKTTn para el que se indica en el punto A.10.3.4.2 que el medio deben usarse el mismo día de su preparación, el medio XLS para el que se indica que no debe usarse por más de 5 días.**

A.10.1 Agua peptonada amortiguada.**A.10.1.1 Fórmula.**

Digerido enzimático de caseína	10.0g
NaCl	5.0g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9.0g
KH ₂ PO ₄	1.5g
Agua	1 000mL

A.10.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria para obtener las porciones de prueba. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

A.10.2 Caldo RVS.**A.10.2.1 Solución A.****A.10.2.1.1 Fórmula.**

Digerido enzimático de soya	5.0g
NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄	1.4g
K ₂ HPO ₄	0.2g
Agua	1000mL

A.10.2.1.2 Preparación: Preparar por ingredientes y disolverlos en el agua, es necesario calentar aproximadamente a 70°C. La solución debe prepararse el día de la preparación del medio de RVS completo.

A.10.2.2 Solución B.**A.10.2.2.1 Fórmula.**

MgCl ₂ .6H ₂ O	400.0g
Agua	1000mL

A.10.2.2.2 Preparación: Disolver el cloruro de magnesio en el agua. Como esta sal es muy higroscópica, es aconsejable disolver el contenido completo de un frasco nuevo de MgCl₂.6H₂O de acuerdo a la fórmula. Por ejemplo, agregando 250g de MgCl₂.6H₂O a 625mL de agua, dará un volumen total de solución de 788mL y una concentración de 31.7g por cada 100mL de MgCl₂.6H₂O aproximadamente.

La solución puede almacenarse en un frasco ámbar con tapa hermética a temperatura ambiente por 2 años.

A.10.2.3 Solución C.**A.10.2.3.1 Fórmula.**

Oxalato de verde malaquita	0.4g
Agua	100mL

A.10.2.3.2 Preparación: Disolver el oxalato de verde malaquita en el agua. La solución puede almacenarse en frasco ámbar a temperatura ambiente por 8 meses.

A.10.2.4 Medio Completo.

A.10.2.4.1 Fórmula.

Solución A	1000mL
Solución B	100mL
Solución C	10mL

A.10.2.4.2 Preparación: Agregar 1000mL de la solución A, 100mL de la solución B y 10mL de la solución C. Ajustar el pH, si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5.2 ± 0.2 . Antes de su uso, distribuir porciones de 10mL a cada tubo. Esterilizar a 115°C por 15 min. Almacenar el medio preparado a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizar el medio el mismo día de su preparación.

Nota: La composición final del medio completo será de: Digerido enzimático de soya, 4.5g/L; NaCl, 7.2g/L; $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$, 1.44g/L; MgCl_2 , 13.4g/L o $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 28.6g/L; oxalato de verde malaquita, 0.036g/L.

A.10.3 Caldo MKTTn.

A.10.3.1 Medio Base.

A.10.3.1.1 Fórmula.

Extracto de carne	4.3g
Digerido enzimático de caseína	8.6g
NaCl	2.6g
CaCO_3	38.7g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	47.8g
Ox sales biliares uso bacteriológico	4.78g
Verde brillante	0.0096g
Agua	1000mL

A.10.3.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes deshidratados básicos de la fórmula o el medio completo deshidratado en el agua, hervir por 5 min. Ajustar el pH, si es necesario, a 8.2 ± 0.2 a 25°C . El medio base puede almacenarse por 4 semanas a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A.10.3.2 Solución de Yodo–Yoduro

A.10.3.2.1 Fórmula.

Yodo	20.0g
Yoduro de potasio (KI)	25.0g
Agua	100mL

A.10.3.2.2 Preparación: Disolver completamente el yoduro de potasio en 10mL de agua, agregar el yodo y diluir a 100mL con agua estéril. No calentar.

Almacenar la solución en la oscuridad a temperatura ambiente en un frasco bien cerrado.

A.10.3.3 Solución de Novobiocina.

A.10.3.3.1 Fórmula.

Novobiocina (sal sódica)	0.04g
Agua	5.0mL

A.10.3.3.2 Preparación: Disolver la novobiocina (sal sódica) en el agua y esterilizar por filtración. Puede almacenar la solución por no más de 4 semanas a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A.10.3.4 Medio Completo.

A.10.3.4.1. Fórmula.

Medio base	1000mL
Solución de yodo-yoduro	20mL
Solución de novobiocina	5mL

A.10.3.4.2. Preparación: Agregar asépticamente 5mL de solución de novobiocina a 1000mL de medio base. Mezclar, después agregar 20mL de la solución de yodo-yoduro. Mezclar bien. Distribuir el medio asépticamente en recipientes estériles de suficiente capacidad para contener las porciones necesarias de prueba. El medio completo deberá utilizarse el mismo día de la preparación.

A.10.4 Agar XLD.

A.10.4.1 Medio Base.

A.10.4.1.1 Fórmula.

Extracto de levadura en polvo	3.0g
NaCl	5.0g
Xilosa	3.5g a 3.75g
Lactosa	7.5g
Sacarosa	7.5g
L-Lisina	5.0g
Tiosulfato de sodio	6.8g
Citrato férrico amónico	0.8g
Rojo de fenol	0.08g
Desoxicolato de sodio	1.0g a 2.5g
Agar	9.0g a 18.0g
Agua	1000mL

A.10.4.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes básicos deshidratados de la fórmula o el medio completo deshidratado en el agua por calentamiento, con agitación frecuente, hasta que el medio comience a hervir. Evitar el sobrecalentamiento. Ajustar el pH, si es necesario, a 7.4 ± 0.2 a 25°C .

A.10.4.1.3 Preparación de las placas de agar: Transferir el medio inmediatamente a un baño de agua a $44^{\circ}\text{C} - 47^{\circ}\text{C}$ y esperar a que el medio se atempere, agitar y vaciar en las placas, dejar solidificar. Antes de su uso las placas deberán estar completamente secas, se recomienda secar las placas en horno entre 37°C y 55°C con las tapas parcialmente abiertas o en campana de flujo laminar hasta que la superficie del agar este seca. El medio se puede almacenar por no más de 5 días a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A.10.5 Agar nutritivo.

A.10.5.1 Fórmula.

Extracto de carne	3.0g
Peptona	5.0g
Agar	15.0g
Agua	1000mL

A.10.5.2 Preparación: Disolver los ingredientes o el medio completo deshidratado en el agua, por calentamiento. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 6.8 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio de cultivo a tubos o botellas de capacidad apropiada. Esterilizar por 15 min a 121°C .

A.10.5.2.1 Preparación de las placas de agar nutritivo: Transferir el medio inmediatamente a un baño de agua a 44°C – 47°C y esperar a que el medio se atempere, agitar y vaciar 15mL del medio fundido a placas estériles, dejar solidificar. Las superficies de las placas deben estar completamente secas antes de su uso, se recomienda secar las placas en un horno entre 37°C y 55°C con las tapas parcialmente abiertas o en campana de flujo laminar hasta que la superficie del agar este seca.

A.10.6 Agar TSI.

A.10.6.1 Fórmula.

Extracto de carne	3.0g
Extracto de levadura	3.0g
Peptona	15.0g a 20.0g
NaCl	5.0g
Lactosa	10.0g
Sacarosa	10.0g
Glucosa	1.0g
Citrato de fierro (III)	0.2g a 0.3g
Tiosulfato de sodio	0.3g
Rojo de fenol	0.024g
Agar	12.0g a 15.0g
Agua	1000mL

A.10.6.2 Preparación: Disolver los ingredientes o el medio completo deshidratado en el agua por calentamiento. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 7.4 ± 0.2 a 25°C. Distribuir 10mL del medio en tubos de ensaye. Esterilizar por 15 min a 121°C. Dejar solidificar en posición inclinada para obtener un fondo de 4cm y un bisel de al menos 2.5cm.

A.10.7 Agar Urea de Christensen.

A.10.7.1 Medio Base.

A.10.7.1.1 Fórmula.

Peptona	1.0g
Glucosa	1.0g
NaCl	5.0g
Fosfato dihidrogenado de potasio (KH ₂ PO ₄)	2.0g
Rojo de fenol	0.012g
Agar	15.0g
Agua	1000mL

A.10.7.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes o el medio completo deshidratado por calentamiento. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 6.8 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar por 15 min a 121°C.

A.10.7.2 Solución de urea.

A.10.7.2.1 Fórmula.

Urea	400g
Agua, para un volumen final de	1000mL

A.10.7.2.2 Preparación: Disolver la urea en el agua. Esterilizar por filtración.**A.10.7.3 Medio Completo.****A.10.7.3.1 Fórmula.**

Medio base	950mL
Solución de Urea	50mL

A.10.7.3.2 Preparación: Agregar bajo condiciones asépticas, la solución de urea al medio base, previamente fundido y mantenido de 44°C – 47°C en el baño de agua. Distribuir 10mL del medio completo a tubos de ensaye.

A.10.8 Reactivo de β -Galactosidasa.**A.10.8.1 Solución amortiguadora.****A.10.8.1.1 Fórmula.**

NaH ₂ PO ₄	6.9g
NaOH, 10mol/L solución	≈ 3mL
Agua, para un volumen final de	50mL

A.10.8.1.2 Preparación: Disolver el fosfato dihidrogenado de sodio en ≈ 45mL de agua en un matraz volumétrico. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C con la solución de hidróxido de sodio. Agregar agua para un volumen final de 50mL.

A.10.8.2 Solución de ONPG.**A.10.8.2.1 Fórmula.**

ONPG	0.08g
Agua	15mL

A.10.8.2.2 Preparación: Disolver el ONPG en el agua a aproximadamente 50°C. Enfriar la solución.

A.10.8.3 Reactivo Completo.**A.10.8.3.1 Fórmula.**

Solución amortiguadora	5mL
Solución de ONPG	15mL

A.10.8.3.2 Preparación: Agregar la solución amortiguadora a la solución de ONPG.

A.10.9 Reactivos para la prueba VP.**A.10.9.1 Medio de RM-VP.****A.10.9.1.1. Fórmula.**

Peptona	7.0g
Glucosa	5.0g
K ₂ HPO ₄	5.0g
Agua	1000mL

A.10.9.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH de tal forma que después de la esterilización quede a 6.9 ± 0.2 a 25°C. Transferir 3mL de volumen a tubos de ensaye y esterilizar por 15 min a 121°C.

A.10.9.2 Solución de creatina (N-amidinosarcosina).**A.10.9.2.1 Fórmula.**

Monohidrato de creatina	0.5g
Agua	100mL

A.10.9.2.2 Preparación: Disolver el monohidrato de creatina en el agua.**A.10.9.3 α -naftol, solución etanólica****A.10.9.3.1 Fórmula**

α -Naftol	6g
Etanol al 96%	100mL

A.10.9.3.2 Preparación: Disolver el 1-naftol en el etanol.**A.10.9.4 Solución de KOH.****A.10.9.4.1 Fórmula.**

KOH	40g
Agua	100mL

A.10.9.4.2 Preparación: Disolver el KOH en el agua.**A.10.10 Reactivos para la reacción de Indol.****A.10.10.1 Caldo triptona al 1%.****A.10.10.1.1 Fórmula.**

Triptona o tripticasa	10g
Agua destilada	1000mL

pH final: 6,9 \pm 0,2

A.10.10.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes, distribuir en porciones de 5mL en tubos de ensaye de 16mm x 125mm o 16mm x 150mm y esterilizar a 121°C por 15 min.

A.10.11 Reactivo de Kovac.**A.10.11.1 Fórmula.**

4-Dimetilaminobenzaldehido	5g
Ácido hidroclicóric, $\rho = 1.18 \text{ g/mL}$ a 1.19 g/mL	25mL
2-metilbutan-2-ol	75mL

A.10.11.2 Preparación: Mezclar los componentes.**A.10.12 Solución Salina Fisiológica.****A.10.12.1 Fórmula.**

NaCl	8.5g
Agua	1000mL

A.10.12.2 Preparación: Disolver el cloruro de sodio en el agua. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir volúmenes de la solución de tal manera que después de la esterilización queden entre 90mL a 100mL. Esterilizar 15 min a 121°C.

A.10.13 Agar EH.**A.10.13.1 Fórmula.**

Peptona	12g a 15g
Extracto de levadura	3g
Sales biliares No. 3	9g
Lactosa	12g
Sacarosa	12g
Salicina	2g
NaCl	5g
Tiosulfato de sodio	5g
Citrato férrico amónico	1.5g
Azul de bromotimol	0.064g a 0.065g
Fucsina ácida	0.1g
Agar	14.0g
Agua destilada	1L
pH final	7.5 ± 0.2

A.10.13.2 Preparación: Calentar a ebullición con agitación frecuente para disolver los ingredientes por no más de 1 min. No sobrecalentar. Enfriar a 45°C-50°C. Distribuir en porciones de 20mL en cajas Petri de 15mm x 100mm. Dejar secar por 2h con las tapas parcialmente abiertas. Almacenar hasta 30 días en refrigeración (4°C ± 2°C).

A.10.14 Agar ASB.**A.10.14.1 Fórmula.**

Polipeptona (o peptona)	10g
Extracto de carne	5g
Dextrosa	5g
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	4g
FeSO ₄ (anhidro)	0.3g
Sulfito de bismuto (indicador)	8g
Verde brillante	0.025g
Agar	15g a 20g
Agua destilada	1L
pH,	7.7 ± 0.2

A.10.14.2 Preparación: Mezclar los ingredientes con calentamiento y agitación constante a ebullición por 1 min hasta obtener una suspensión uniforme (el precipitado no se disuelve). Enfriar a 45°C-50°C. Suspender el precipitado con agitación suave y distribuir volúmenes de 20mL en cajas Petri estériles de 15mm x 100mm. Permitir que seque el agar por 2h con las tapas parcialmente abiertas y después cerrarlas.

PRECAUCIÓN: No esterilizar. Preparar el medio un día antes de su uso y almacenar en oscuridad. El medio pierde selectividad después de 48h.

A.10.15 Caldo L-lisina descarboxilasa.**A.10.15.1 Fórmula.**

Monoclorhidrato de L-lisina	5.0g
Extracto de levadura	3.0g
Glucosa	1.0g
Púrpura de bromocresol	0.015g a 0.02g
Peptona	5.0g
Agua	1000 mL

A.10.15.2 Preparación: Disolver los componentes en el agua, con el calentamiento necesario. Ajustar el pH si es necesario y después de la esterilización debe ser 6.8 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio en cantidades de 2mL a 5mL y esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C .

A.10.16 Agar de hierro y lisina (LIA).

A.10.16.1 Fórmula.

Peptona de gelatina	5.0g
Extracto de levadura	3.0g
Glucosa	1.0g
L-lisina	10.0g
Citrato férrico-amónico	0.5g
Tiosulfato de sodio anhidro	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	13.0g a 15.0g
Agua destilada	100mL
pH, 6.7 ± 0.2	

A.10.16.2 Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH.

Distribuir en volúmenes de 3mL en tubos de 13mm x 100mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4cm y una superficie inclinada de 2cm. En el punto A.7.3.5 donde se hace mención que el bisel deberá tener una longitud de al menos 2.5cm. El medio ya preparado es de color púrpura.

Apéndice B Normativo.

Método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*.

Se establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *S. aureus* presente en alimentos para consumo humano nacionales o de importación.

B.1 INTRODUCCIÓN.

S. aureus es una bacteria altamente vulnerable a tratamientos térmicos y a varios agentes sanitizantes. La presencia de esta bacteria en los alimentos procesados o en los equipos donde se procesan, es generalmente un indicador de sanitización inadecuada o manejo inadecuado durante la producción. *S. aureus* produce enterotoxinas termorresistentes que al ingerirse pueden causar intoxicaciones alimentarias. Es actualmente responsable de un alto porcentaje de los brotes de intoxicación alimentaria a nivel mundial.

Para el propósito del presente método, la confirmación de *S. aureus* está basada en una fuerte reacción de coagulasa, pero se reconoce que hay algunas cepas de *S. aureus* que producen una reacción débil. Estas últimas cepas se pueden confundir con otras bacterias, por lo cual es de igual importancia someter a la par la prueba de termonucleasa y por medio del uso de pruebas adicionales, como son la producción de ácido a partir del manitol, entre otras.

Este método permite hacer una estimación del contenido de *S. aureus* en los productos de consumo, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa/termonucleasa como determinante y pruebas auxiliares.

B.2 EQUIPO.

B.2.1 Horno para esterilizar que alcance 180°C ;

B.2.2 Autoclave;

B.2.3 Balanza granataria;

B.2.4 Incubadora capaz de operar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;

B.2.5 Homogeneizador peristáltico tipo Stomacher o licuadora, y

B.2.6 Baño de agua capaz de operar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

B.3 MATERIALES.

B.3.1 Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas;

B.3.2 Tubos de cultivo de 16mm x 150mm o frascos de 125mL a 250mL de capacidad;

B.3.3 Tubos de cultivo de 10mm x 75mm;

B.3.4 Cajas Petri de 90mm a 100mm de diámetro;

B.3.5 Pipetas de 1mL y 10mL de capacidad graduada en 0.1mL y 1mL respectivamente y diámetro de 2mm a 3mm;

B.3.6 Pipetas Pasteur;

B.3.7 Probetas;

B.3.8 Varillas de vidrio de 3.5mm de diámetro aproximadamente y 20cm de largo dobladas en ángulo recto u equivalente;

B.3.9 Matraz Erlenmeyer, y

B.3.10 Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

B.4 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

B.4.1 Agar Baird Parker;

B.4.2 Solución de telurito de potasio;

B.4.3 Emulsión de yema de huevo (puede usarse comercialmente preparada);

B.4.4 BHI;

B.4.5 Solución reguladora de fosfatos;

B.4.6 Agua peptonada;

B.4.7 Solución Salina 0.85%;

B.4.8 Agar Azul de Toluidina-ADN;

B.4.9 Plasma de Conejo con EDTA;

B.4.10 Agua peptonada amortiguada;

B.4.11 Peróxido de hidrógeno al 3%;

B.4.12 Reactivos para la tinción de Gram;

B.4.13 Caldo rojo de fenol (glucosa y manitol);

B.4.14 Aceite de parafina o mineral estéril;

B.4.15 *S. aureus* ATCC 6538, 25923;

B.4.16 *S. epidermidis* ATCC 12228, y

B.4.17 Solución trazable para verificación de potenciómetro.

B.5. CONDICIONES DE PRUEBA.

B.5.1 Preparación de la muestra.

Tomar diferentes porciones del alimento, transferir 25g o mL a frascos de dilución con 225mL de solución reguladora de fosfatos, fosfatos o agua peptonada amortiguada, para preparar una dilución 1:10.

Cuando no se disponga de 25g de muestra se deberá justificar y utilizar la cantidad necesaria de solución reguladora de fosfatos, para obtener una dilución 1:10.

Homogeneizar por 1 min o 2 min en licuadora u homogeneizador peristáltico.

B.5.2 Preparación de la muestra para Moluscos en concha.

Preparar como se indica en el punto A.6.2.4.

B.5.3 Procedimiento para Moluscos, desconchados y congelados.

Preparar como se indica en el punto A.6.2.5.

B.5.4 Productos de la pesca.

Pesar 200g del alimento en 200mL de regulador de fosfatos o agua peptonada amortiguada (dilución 1:2) y homogeneizar por 2 min en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico, el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspás. Las muestras congeladas deben descongelarse en refrigeración (2°C-5°C) un máximo de 18h antes de su análisis.

B.6 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

B.6.1 Transferir por medio de una pipeta estéril, 0.1mL de la muestra directa si es líquida, o 0.1mL de la suspensión inicial (dilución 10^{-1}) en el caso de otros productos, por duplicado a cajas de agar Baird Parker. Repetir el procedimiento para las diluciones siguientes si son necesarias 10^{-2} , 10^{-3} .

Nota: Si se sospecha que el alimento contiene bajas cuentas de *S. aureus*, se deberá aumentar el límite de detección, en un factor igual a 10 inoculando 1mL de la muestra directa si ésta es líquida, o de cada dilución distribuida en 3 placas como sigue: 0.4mL, 0.3mL y 0.3mL sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker, por duplicado. En ambos casos evitar usar cajas húmedas.

B.6.2 Cuidadosamente distribuir el inóculo tan pronto como sea posible, sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada placa y dilución.

B.6.3 Mantener las placas con las tapas hacia arriba hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar.

B.6.4. Invertir las placas e incubar por 44h a 48h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, buscar colonias con morfología colonial típica: colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1mm a 2mm y muestran una zona opaca, húmedas y con un halo claro (debido a la actividad de la lecitinasa) alrededor de la colonia.

NOTA: En algunas ocasiones cepas que han sido aisladas de productos congelados o deshidratados que han sido almacenados por periodos largos de tiempo, frecuentemente desarrollan colonias menos negras con apariencia rugosa y textura seca. Las colonias atípicas son similares en apariencia pero sin halo claro alrededor.

B.6.5 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas y atípicas de *S. aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias. Seleccionar por muestra 5 colonias típicas para su confirmación o 5 colonias atípicas, para la realización de la tinción de Gram, en el caso de observar bacilos positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, por lo contrario si se observan cocos se seguirá con su confirmación.

B.6.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas se debe agregar la nota de "valor estimado" al reporte de los resultados.

B.6.7 Si fue inoculado 1.0mL en 3 placas, tratar éstas como una sola y seguir los procedimientos de confirmación.

B.6.8 Confirmación.

B.6.8.1 Prueba de coagulasa. Seleccionar y sembrar cada colonia típica en tubos con 0.5mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua, durante 20h a 24h. Mantener los cultivos en AST a no más de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para pruebas posteriores. Agregar a 0.1mL del cultivo anterior a 0.3mL de plasma de conejo con EDTA (a menos que el fabricante indique otras cantidades). Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4h a 6h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24h. Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo. En otro caso se deberán realizar las pruebas auxiliares, descritas en el punto B.6.9.

B.6.8.2 Para cada lote nuevo de reactivo se deberá realizar la prueba de coagulabilidad del plasma de conejo añadiendo una gota de cloruro de calcio al 5% a 0.5mL de plasma reconstituido, formándose un coágulo en 10s-15s.

B.6.8.3 Prueba de termonucleasa. Preparar portaobjetos con 3mL de agar azul de toluidina-ADN. Con ayuda de una pipeta Pasteur hacer orificios equidistantes en el agar. En un baño de agua hirviendo calentar durante 15 min, 0.3mL de cultivo en BHI. Utilizando una pipeta Pasteur transferir una gota del cultivo a un orificio del medio, repetir para cada cepa incluyendo testigos positivo y negativo. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda de 4h a 24h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1mm alrededor de la perforación califica como positiva la prueba.

B.6.9 Pruebas auxiliares.

B.6.9.1 Realizar una tinción de Gram a cada cultivo y observar al microscopio la presencia de cocos Gram positivos, agrupados en racimos.

B.6.9.2. Si se dispone de un sistema de bioquímicas miniaturizado, éste puede ser utilizado como alternativa de las siguientes pruebas bioquímicas, con excepción de la tinción de Gram, coagulasa y termonucleasa:

B.6.9.2.1 Prueba de catalasa. A partir de un cultivo en AST realizar la prueba de la catalasa en un portaobjetos, emulsificar una porción del cultivo con una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Observar la producción de burbujas de gas.

B.6.9.2.2 Utilización anaeróbica del manitol. Inocular un tubo con caldo para la fermentación adicionado de manitol al (0.5%), con un inóculo abundante. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25mm. Incubar hasta 5 días a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Un cambio en la coloración del indicador indica la utilización anaeróbica del manitol y la presencia *S. aureus*. Incluir los controles positivos y negativos.

B.6.9.2.3 Utilización anaeróbica de la glucosa. Inocular un tubo con caldo para la fermentación adicionado de glucosa al (0.5%), con un inóculo abundante. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25mm. Incubar hasta 5 días a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Un cambio en la coloración del indicador indica la utilización anaeróbica de la glucosa y la presencia *S. aureus*. Incluir los controles positivos y negativos.

Tabla B.1. Características de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Micrococcus*.

Características	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Micrococcus
Actividad de catalasa	+	+	+
Producción de coagulasa	+	-	-
Producción de termonucleasa	+	-	-
Utilización anaeróbica de: Glucosa	+	+	-
Utilización anaeróbica de: Manitol	+	-	-

+, La mayoría de las cepas son positivas (más del 90%).

-, La mayoría de las cepas son negativas (más del 90%).

B.7 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

B.7.1 Las pruebas de termonucleasa o coagulasa positiva son consideradas como resultados confirmatorios de *S. aureus*.

B.7.2 Si al menos el 80% de las colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva y/o termonucleasa positiva tomar el número total de las colonias contadas como presuntivas de *S. aureus*.

B.7.3 En otros casos, calcular el número de colonias presuntivas de *S. aureus* a partir del porcentaje obtenido de colonias coagulasa y/o termonucleasa positivas confirmadas.

B.7.4 Promediar los resultados de los duplicados.

B.7.5 Cuando en dos diluciones consecutivas se obtienen cuentas entre 15 y 150 colonias (típicas o atípicas) calcular el número de *S. aureus* para cada dilución como se especifica en los puntos anteriores, calcular la cuenta de *S. aureus* considerando el factor de dilución, calcular el logaritmo en base diez de cada dilución y realizar la resta de éstos, si la diferencia entre los logaritmos de las dos diluciones es menor a 0.3, reportar el promedio de las dos diluciones. Si por el contrario la diferencia entre los logaritmos es mayor a 0.3; reportar el valor más bajo.

B.7.6 Cuando no se tenga crecimiento reportar como:

DILUCIÓN DE LA MUESTRA	VOLUMEN INOCULADO	RESULTADO
MUESTRA DIRECTA	1mL (0.4mL, 0.3mL Y 0.3 mL)	< 1 UFC/mL
MUESTRA DIRECTA	0.1 mL	< 10 UFC/mL
10 ⁻¹	1mL (0.4, 0.3 Y 0.3 mL)	< 10 UFC/mL
10 ⁻¹	0.1mL	< 100 UFC/mL

B.7.7 Ejemplo para el cálculo de *S. aureus*.

Por ejemplo, el 0.1mL del inóculo de la dilución 10^{-2} de la muestra da como resultado 65 y 85 colonias típicas por placa.

Ninguna colonia atípica fue identificada en las placas.

Todas las 5 colonias seleccionadas de la placa conteniendo 65 colonias fueron coagulasa y termonucleasa positiva por lo que las 65 colonias fueron consideradas como *S. aureus*.

3 de las 5 colonias seleccionadas de la placa que contiene 85 colonias fueron coagulasa y termonucleasa positiva por lo que el 60%, es decir, 51 colonias son consideradas como *S. aureus*.

La cuenta promedio tomando en cuenta solo las positivas es:

$$65+51/2 = 58 \text{ } S. \text{ aureus. Redondeando a dos cifras significativas } \approx 60$$

58 por el inverso del factor de dilución ($1/10^{-2}$) es 5800 UFC.

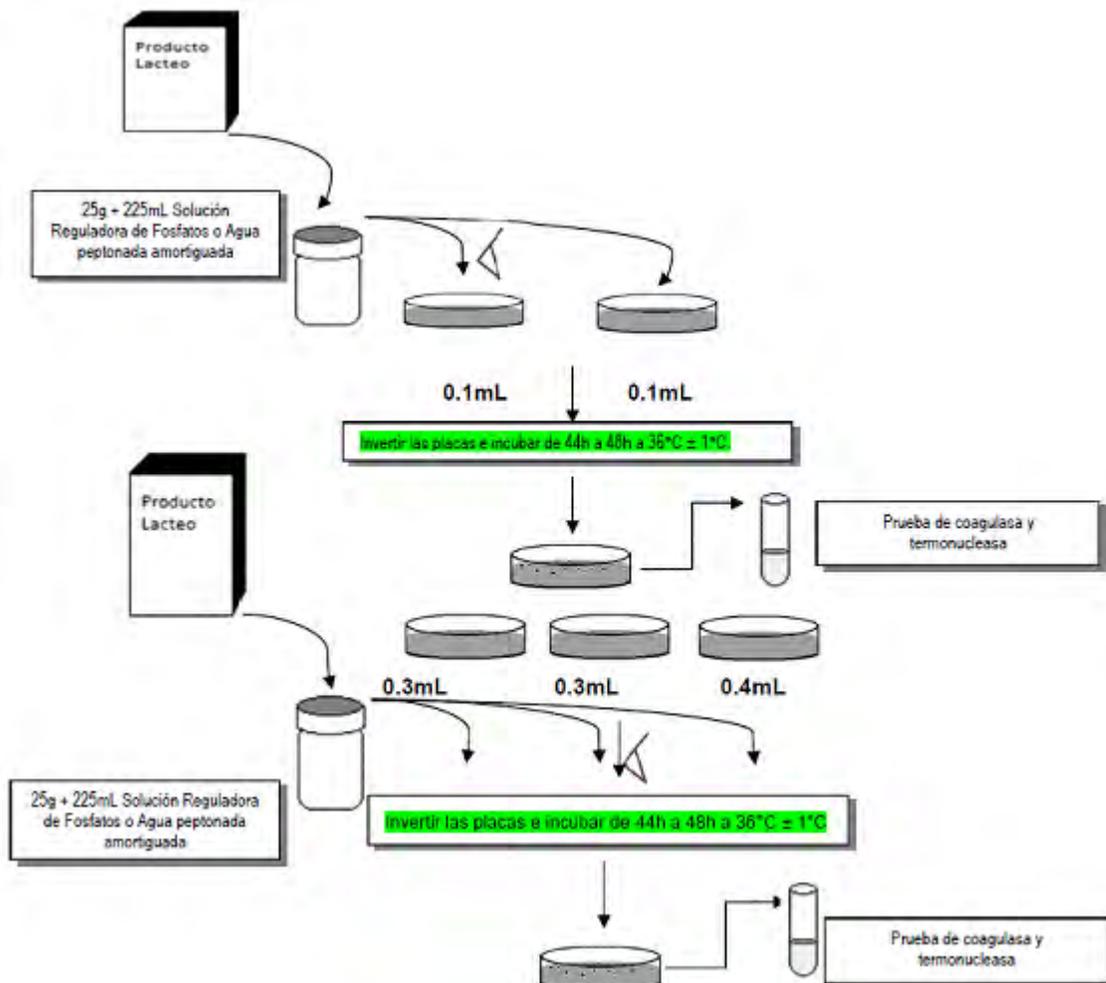
Si se considera que el inóculo fue de 0.1mL habrá que multiplicar por 10 para obtener 58000 UFC/mL o g según la naturaleza de la muestra.

También puede aplicarse la siguiente formula:

$$\text{Cuenta } X[(1/\text{Volumen del inóculo})(1/\text{dilución})]$$

B.7.8 Precisión de la cuenta.

Para razones estadísticas, los intervalos de confianza de este método varían en un 95% de los casos, desde un $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$. En la práctica, una mayor variación se puede encontrar, especialmente entre los resultados obtenidos por diferentes analistas.

B.8 Ayuda Visual.

B.9 Composición y preparación de medios de cultivo y reactivos.**B.9.1 Agar Baird Parker.****B.9.1.1 Medio base.****B.9.1.2 Fórmula.**

Triptona	10.0g
Extracto de carne	5.0g
Extracto de levadura	1.0g
Piruvato de sodio	10.0g
Glicina	12.0g
Cloruro de litio .6H ₂ O	5.0g
Agar	15.0 a 20.0g
Agua destilada	1L

pH final 7.0 ± 0.2.

B.9.1.3 Preparación: Disolver los ingredientes en 950mL de agua destilada con agitación constante y calentamiento. Esterilizar 15 min a 121°C. Si se utiliza inmediatamente, mantenerlo fundido a 48°C-50°C antes de adicionar los ingredientes de enriquecimiento o almacenar el medio solidificado a 4°C ± 1°C hasta 1 mes. Fundir el medio antes de su uso.

Ingredientes de enriquecimiento: telurito y yema de huevo.

Adicionar asépticamente 5mL de yema de huevo-telurito de potasio a temperatura ambiente, a 95mL de la base fundida. Mezclar bien evitando hacer burbujas y vaciar porciones de 15mL-18mL en cajas Petri 15mm x 100mm. El medio debe ser densamente opaco. Secar las placas antes de su uso. Guardar las placas preparadas 20°C-25°C hasta 5 días.

B.9.2 Emulsión de yema de huevo.**B.9.2.1 Preparación.** *(Sólo si una presentación comercial no está disponible).*

Utilizar huevos frescos, separar la yema de la clara.

Mezclar las yemas con cuatro veces el volumen de agua, calentar la mezcla en un baño de agua, controlando la temperatura a 45°C ± 0.5°C por 2h y dejar reposar de 18h a 24h de 0°C a + 5°C, dejar precipitar.

Decantar el sobrenadante líquido y esterilizarlo por filtración, a menos que se haya llevado la separación asépticamente. La emulsión puede ser almacenada de 2°C a 8°C por no más de 72h.

B.9.3 Solución de Telurito de potasio.**B.9.3.1 Fórmula.**

Telurito de potasio (trioxotelurito dipotásico)	1.0g
Agua	100mL

B.9.3.2 Preparación: Disolver el telurito de potasio en agua con un mínimo calentamiento.

Esterilizar por filtración.

La solución puede ser conservada de 2°C a 8°C por 6 meses.

B.9.4 BHI.**B.9.4.1 Fórmula.**

Peptona	10.0g
Infusión cerebro de ternero deshidratado	12.5g
Infusión corazón de res deshidratado	5.0g

Glucosa	2.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico Na ₂ HPO ₄	2.5g
Agua	1000mL

B.9.4.2 Preparación: Disolver los componentes o el medio completo comercial en agua hirviendo, ajustar el pH para que después de la esterilización se encuentre en 7.4 ± 0.2 a 25°C.

Transferir el contenido a tubos o botellas en cantidades iguales a 10mL. Esterilizar el medio por 20 min a 121°C.

El medio puede ser almacenado por 6 meses en condiciones de refrigeración de 0°C a 5°C.

B.9.5 Plasma de Conejo.

B.9.5.1 Preparación: Utilizar el plasma de conejo que esté disponible comercialmente y rehidratar de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Adicionar el EDTA, en el plasma hidratado.

Si no encuentra plasma de conejo deshidratado comercial diluir plasma de conejo fresco en una proporción 1:3 con agua estéril.

Antes de su uso probar cada lote de plasma de conejo con cepas positivas de *S. aureus* y con cepas negativas.

B.9.6 Agar Azul de Toluidina.

B.9.6.1 Fórmula.

ADN de timo de carnero	0.3g
Agar	10g
CaCl ₂ (anhidro)	1.1mg
NaCl	10g
Azul de toluidina O	0.083g
Tris (hidroximetil aminometano)	6.1g
Agua destilada	1L
pH 9.0 final	

B.9.6.2 Preparación: Disolver el Tris (hidroximetil aminometano) en 1L de agua destilada. Ajustar el pH a 9.0 adicionar los ingredientes restantes a excepción del azul de toluidina. Calentar a ebullición para disolver el azul de toluidina en el medio. Distribuir en matraces o tubos de ensaye con tapa de rosca. No es necesario esterilizar si se usa inmediatamente. El medio estéril es estable a temperatura ambiente por 4 meses y es satisfactorio después de varios ciclos de fusión.

Este medio se prepara por ingredientes.

B.9.7 Solución Reguladora de Fosfatos.

B.9.7.1 Fórmula.

Fosfato monopotásico	34.0g
Agua destilada	1L
pH final 7.2 ± 0.2	

B.9.7.2 Preparación: Disolver el fosfato en 500mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con solución de hidróxido de sodio 1N. Llevar a 1L con agua destilada. Esterilizar durante 15 min a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Para diluciones:

Añadir 1.25mL de solución concentrada de reguladora de fosfatos a 1L de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 distribuir en frascos de dilución. Esterilizar a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

B.9.8 AST.**B.9.8.1 Fórmula.**

Tripticasa peptona	15g
Fitona peptona	5g
NaCl	5g
Agar	15g
Agua destilada	1L
pH 7.3 ± 0.2	

B.9.8.2 Preparación: Suspender los ingredientes en 1L de agua destilada. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar con agitación constante para disolver el agar. Hervir por 1 min. Distribuir en tubos, cajas o matraces. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Cepas control: *E. coli* y *S. aureus*.

B.9.9 Caldo Rojo de Fenol (para fermentación de carbohidratos).**B.9.9.1 Fórmula.**

Tripticasa o proteona peptona No. 3	10g
NaCl	5g
Extracto de carne (opcional).	1g
Rojo de fenol (7.2mL de solución de rojo de fenol al 0.25%)	0.018g
Agua destilada	1L
pH 7.4 ± 0.2.	
Carbohidrato*	

B.9.9.2 Preparación: Disolver los ingredientes sin el carbohidrato, en 800mL de agua destilada con calentamiento y agitación ocasional. Distribuir en volúmenes de 2mL en tubos de 13mm x 100mm con campana de Durham. Esterilizar a 121°C por 15 min y dejar enfriar. Disolver 20g del carbohidrato en 200mL de agua destilada y esterilizar por filtro de membrana, adicionar asépticamente 0.5mL del filtrado a cada tubo con medio esterilizado y enfriado a menos de 45°C, agitar suavemente para mezclar.

B.9.10 Aceite de parafina estéril.

Puede esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm.

B.9.11 Agua peptonada amortiguada.**B.9.11.1 Fórmula.**

Digerido enzimático de caseína	10.0g
NaCl	5.0g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9.0g
KH ₂ PO ₄	1.5g
Agua	1 000mL

B.9.11.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria para obtener las porciones de prueba. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

Apéndice C Normativo.**Método de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes*.**

ADVERTENCIA.- Con la finalidad de proteger la salud del personal de laboratorio, se debe considerar que:

- Las pruebas para la determinación de *L. monocytogenes* deberán ser realizadas en laboratorios debidamente equipados y por microbiólogos expertos, cuidando la eliminación de los desechos potencialmente contaminados.
- Las mujeres embarazadas no deberán manipular los cultivos de *L. monocytogenes* bajo ninguna circunstancia.

Establece el método microbiológico para determinar la presencia de *L. monocytogenes* a partir de alimentos para consumo humano nacionales o de importación.

C.1 INTRODUCCIÓN.

Este método permite determinar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en los productos de consumo, se efectúa por medio de un pre-enriquecimiento selectivo y después su aislamiento en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas.

L. monocytogenes es una bacteria que se desarrolla intracelularmente y es causante de Listeriosis. Es uno de los patógenos más virulentos causante de infecciones alimentarias, con una tasa de mortalidad entre un 20% a 30%, más alta que casi todas las restantes tóxicas infecciones alimentarias. *L. monocytogenes* es un bacilo corto Gram positivo, que presenta diploformas dispuestas en "V" y anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio intervalo de temperaturas (1°C a 45°C). Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30°C o menos, pero es inmóvil a 37°C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan.

C.2 EQUIPO.

C.2.1 Autoclave y horno que alcance 180°C;

C.2.2 Balanza con sensibilidad de 0.1g;

C.2.3 Incubadoras a las diferentes temperaturas: 25°C ± 1°C, 30°C ± 1°C y 36°C ± 1°C;

C.2.4 Potenciómetro;

C.2.5 Homogeneizador peristáltico o licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio);

C.2.6 Microscopio, y

C.2.7. Baño de agua a 45°C ± 2°C.

C.3 MATERIALES.

C.3.1 Asa de platino o níquel de 3mm de diámetro o 10µL;

C.3.2 Pipetas graduadas o pipetas automáticas, de diferentes capacidades 10mL, 5mL y 1mL con divisiones de 0.5mL y 0.1mL respectivamente y protegidas con tapón de algodón;

C.3.3 Pipetas de 1mL, con graduaciones de 0.1mL;

C.3.4 Matraces Erlenmeyer de 500mL;

C.3.5 Cajas Petri de vidrio o desechables; diámetro 15mm x 90mm y/o de un diámetro mayor 140mm;

C.3.6 Cucharas, bisturís, cuchillos y pinzas;

C.3.7 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm y de 20mm x 100mm;

C.3.8 Tubos para serología de 10mm x 75mm o de 13mm x 100mm;

C.3.9 Gradillas para tubos de ensaye, y

C.3.10 Mecheros Bunsen o Fisher.

C.4 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

C.4.1 Caldo Fraser medio, con reducción de la concentración de agentes selectivos;

C.4.2 Caldo Fraser, con la completa concentración de agentes selectivos;

C.4.3 Agar Oxford;

C.4.4 Agar PALCAM;

C.4.5 ASTEL;

C.4.6 CSTEEL;

C.4.7 Agar sangre de cordero;

C.4.8 Caldo carbohidrato (ramnosa y xilosa);

C.4.9 Agar movilidad, y

C.4.10 Solución de Peróxido de hidrógeno.

C.5 CEPAS.

C.5.1 *S. aureus* ATCC 49444, ATCC 25923, CIP 5710;

C.5.2 *R. equi* ATCC 6939, NCTC 1621;

C.5.3 *L. monocytogenes* ATCC 19115;

C.5.4 *L. innocua* ATCC 33090, y

C.5.5 *L. ivanovii* ATCC 19119.

C.6 CONDICIONES DE PRUEBA.

C.6.1 Muestreo.

Es importante que el laboratorio se cerciore de recibir una muestra representativa y que no haya tenido daños o cambios durante el transporte y/o almacenamiento.

El muestreo no es parte del método especificado en el presente método, es recomendable que las partes involucradas en este punto lleguen a un acuerdo al respecto.

C.6.2. Preparación de la muestra.

Al preparar la suspensión inicial, tomar diferentes porciones del alimento. Transferirlo al Caldo Fraser medio, a fin de obtener una relación 1:10. Pesar 25g o mL a frascos de dilución con 225mL del Caldo Fraser medio, para obtener una dilución 1:10 (masa-volumen o volumen-volumen).

Homogeneizar por 1 min o 2 min en licuadora o homogeneizador peristáltico dependiendo del tipo de alimento.

C.7 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

C.7.1 Enriquecimiento Primario:

Incubar la suspensión inicial (C.6.2) a 30°C ± 1°C por 24h ± 2h.

Nota: una coloración oscura puede aparecer, durante la incubación.

C.7.2 Enriquecimiento Secundario:

Transferir 0.1mL del enriquecimiento primario, después de la incubación inicial por 24h ± 2h, a un tubo conteniendo 10mL del Caldo Fraser.

Incubar el medio inoculado a 48h ± 2h a 36°C ± 1°C.

C.7.3 Siembra en medios selectivos e identificación.

Del enriquecimiento primario, después de las 24h ± 2h de incubación, inocular 2 placas de agar Oxford y 2 placas de PALCAM por estría cruzada.

Del enriquecimiento secundario incubado a 36°C ± 1°C por 48h ± 2h, inocular 2 placas con agar Oxford y 2 placas con PALCAM por estría cruzada.

Invertir las placas e incubar un juego de agar Oxford y PALCAM a 30°C ± 1°C y el otro a 36°C ± 1°C.

NOTA: Las placas con agar PALCAM se pueden incubar en condiciones de microaerofilia (CO₂ 5% -12% O₂ 5%-15%).

C.7.4 Después de la incubación por 24h; si se observa un crecimiento pobre o si no se observan colonias; volver a incubar por 18h a 24h. Observar las placas para detectar la presencia de colonias presuntivas de *Listeria* spp.

C.7.5 Colonias típicas de *Listeria* spp, en agar Oxford; por lo general crecen a las 24h se observan pequeñas (1mm), grisáceas, rodeadas por un halo oscuro. Después de las 48h de incubación, las colonias se tornan oscuras con posible brillo verdoso de aproximadamente 2mm de diámetro, con halos negros y centros hundidos.

C.7.6 Colonias típicas de *Listeria* spp en agar PALCAM; para placas incubadas en anaerobiosis dejarlas expuestas al aire por 1h, para que recuperen su color de rosa a púrpura. Después de 24h se observa a *Listeria* spp como colonias muy pequeñas, grisáceas o un verde olivo de aproximadamente 1.5mm a 2mm de diámetro, a veces con centros negros, pero siempre con halos oscuros. Después de 48h las colonias de *Listeria* spp se observan de color verde de aproximadamente 1.5mm a 2mm de diámetro, con el centro hundido y rodeadas de un halo negro.

C.7.7 Pruebas Auxiliares Confirmatorias de *Listeria* spp.

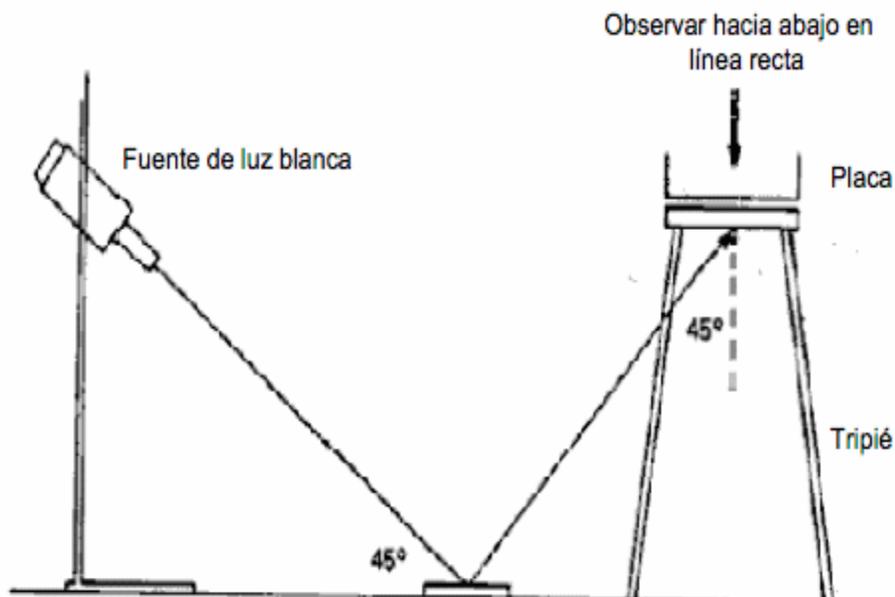
C.7.7.1 Selección de Colonias para su confirmación: Tomar de cada placa de agares selectivos, 5 colonias sospechosas de *Listeria* spp. Si alguna de las placas tiene menos de 5 colonias presuntivas, tomar para su confirmación todas las colonias que hayan crecido.

C.7.7.2 Aislamiento: Sembrar por estría cruzada, para obtener colonias aisladas en cajas con ASTEL. Incubar estas placas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h a 24h o hasta que el crecimiento sea satisfactorio (no más de 72h).

Las colonias típicas se observan de 1mm a 2mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con borde entero. Si no se obtiene un buen aislamiento, proceder a sembrar nuevamente otra colonia sospechosa de los medios selectivos.

C.7.7.3 Luz de Henry: Esta prueba tiene carácter informativo. Examinar las placas de ASTEL con colonias típicas, con el sistema óptico de Henry se trata de hacer incidir luz transmitida oblicuamente con una lámpara de luz blanca lo suficientemente potente como para iluminar la placa en un ángulo de 45° . Las colonias aparecen de color azul-gris a azul. Se recomienda el uso de cepas (positivo y negativo). La placa puede ser observada a simple vista pero es preferible el uso de un microscopio de disección o lupa.

Nota: La luz de Henry puede ser mejor percibida si ASTEL es delgado aproximadamente 15mL/placa.



C.7.7.4 Reacción de Catalasa: Tomar una colonia aislada y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno. La inmediata formación de burbujas indica una reacción positiva.

Precaución: la agitación del reactivo con la suspensión del microorganismo debe hacerse con un asa de plástico o palillo de madera estéril, evitando el contacto con el reactivo.

C.7.7.5 Tinción de Gram: Realizar la tinción de Gram a 1 colonia aislada obtenida en ASTEL, se deberán observar bacilos cortos Gram Positivos.

C.7.7.6 Prueba de Movilidad: Tomar 1 colonia aislada de ASTEL, y suspenderla en un tubo conteniendo CST con extracto de levadura. Incubar a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 8h a 24h o hasta que se observe el medio turbio. Depositar una gota de este cultivo entre un portaobjetos y cubreobjetos y examinar en el microscopio. *Listeria* spp se observan como bacilos cortos con un movimiento giratorio (trumbling). Cultivos incubados a la temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pueden ser falsos positivos al exhibir dicho movimiento: se recomienda siempre comparar el cultivo de prueba con cepas conocidas de cocos, bacilos largos o cortos con una movilidad rápida de nado y que no es característico de *Listeria* spp.

C.7.7.6.1. Prueba alternativa de movilidad: Utilizando un asa recta, inocular agar de movilidad picando 1 colonia obtenida en ASTEL. Incubar por 48h a 25°C ± 1°C. Examinar el crecimiento alrededor de la picadura. Debido al típico movimiento de *Listeria* spp como resultado un crecimiento característico en forma de sombrilla. Si el crecimiento no es suficiente, incubar por 5 días adicionales y observar la picadura al término de ese tiempo.

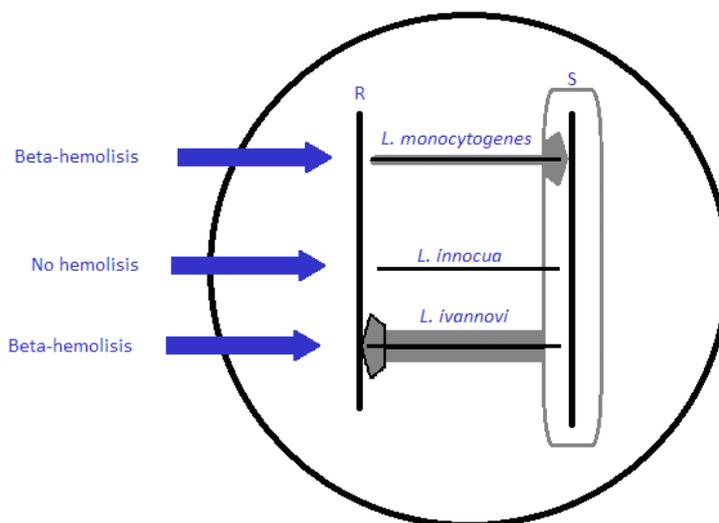
C.7.8 Confirmación de *L. monocytogenes*.

C.7.8.1 Prueba de hemólisis: Si las características morfológicas y fisiológicas, así como la catalasa son indicativos de *Listeria* spp, inocular una placa con agar sangre de carnero al 5% para determinar la actividad hemolítica. Las placas de agar sangre no deben presentar agua de condensación en la superficie del medio. Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el anverso de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Tomar 1 colonia aislada obtenida en ASTEL e inocular por picadura un cuadro por cada cultivo a probar. Simultáneamente utilizar cepas control positiva (*L. monocytogenes*) y negativas (*L. innocua*). Después de la incubación a 36°C ± 1°C por 24h ± 2h, examinar las cepas de prueba y los controles. *L. monocytogenes* produce una zona ligeramente clara alrededor del punto de la picadura (β-hemólisis); *L. innocua* no muestra una zona clara alrededor de la picadura. *L. ivanovii* usualmente se observa una zona ancha, clara y delimitada de β-hemólisis. Examinar las placas con una luz brillante para poder comparar las cepas de prueba con los controles.

C.7.8.2 Utilización de Carbohidratos (ramnosa y xilosa): Utilizando una asa bacteriológica, inocular cada uno de los caldos de carbohidratos a probar usando colonias aisladas en ASTEL. Incubar a 36°C ± 1°C por 5 días. Una reacción positiva se caracteriza por la producción de ácido y cambio de color a amarillo cuando se utiliza base caldo purpura de bromocresol adicionado con cada uno de los carbohidratos, que ocurre dentro de las primeras 24h a 48h, si después de 48h de incubación no se observa una reacción positiva clara, dejar incubar hasta 5 días (alternativamente pueden utilizarse sistemas de bioquímicas miniaturizadas o métodos de biología molecular).

C.7.8.3 Prueba de CAMP: En una placa de agar sangre de carnero al 5% sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y otra línea paralela de *R. equi*, de tal forma que queden paralelas y diametralmente opuestas para que entre estas pueda estriarse la cepa sospechosa de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse entre sí, (Ver figura C.1). Simultáneamente probar cepas control: *L. monocytogenes*, *L. innocua* y/o *L. ivanovii*. Incubar las placas a 36°C ± 1°C por 12h a 18h. Observar el sinergismo entre las hemólisis de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica intensa. La figura C.1 muestra la disposición de las estrías de los cultivos en una placa de la prueba de CAMP. La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus* y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes de *Listeria* no son hemolíticas en esta prueba.

Figura C.1 Inoculación e Interpretación de la prueba de CAMP.



C.8 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**C.8.1 Interpretación de las propiedades morfológicas y fisiológicas de las reacciones bioquímicas.**

Todos las especies de *Listeria* spp son colonias pequeñas, bacilos Gram positivos con movilidad rotativa y catalasa positiva. *L. monocytogenes* se distingue de otras especies por las características enlistadas en la tabla C.1.

Para fines de vigilancia sanitaria, los aislamientos que sean considerados como *L. monocytogenes* deben ser enviados al laboratorio de referencia CCAyAC de la COFEPRIS para realizar la tipificación.

Tabla C.1 Pruebas para la identificación de *Listeria* spp.

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba de CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi subs. murrayi</i>	-	V	-	-	-
V: reacción variable (+): relación débil +: > 90% de reacción positiva -: sin reacción					
Nota: Existen cepas extrañas de <i>L. monocytogenes</i> las cuales no muestran β -hemólisis o una reacción positiva a la prueba de CAMP, bajo las condiciones descritas en el presente apéndice normativo C.					

C.8.2 Cultivos Control.

C.8.2.1 Con el fin de comprobar la habilidad del pre-enriquecimiento y la identificación de *Listeria* spp, se recomienda analizar junto con la prueba cepas control negativo como *S. aureus* y positivo como *L. monocytogenes*.

C.8.3 Expresión de Resultados.

C.8.3.1 De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes*, especificando la masa en g o el volumen en mL de la muestra ensayada.

C.9 Composición y preparación de medios de cultivo y reactivos.**C.9.1 Caldo Fraser Medio.****C.9.1.1 Medio Base.**

Fosfato de sodio di básico

C.9.1.1.1 Fórmula.

Peptona de Carne	5.0g
Triptona	5.0g
Extracto de Carne de Res	5.0g
Extracto de Levadura	5.0g
Cloruro de Sodio	20.0g
Fosfato de sodio monobásico di hidratado	12.0g
Fosfato de Potasio di básico	1.35g
Esculina	1.0g
Agua	1000mL

C.9.1.1.2 Preparación: Disolver los componentes de la base en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C . Distribuir la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C .

Nota: Se deberá adicionar la solución de cloruro de litio y la solución de ácido nalidíxico después de la esterilización del medio base.

C.9.1.2 Solución de Cloruro de litio.

C.9.1.2.1 Fórmula.

Cloruro de litio	3.0g
Agua	10mL

C.9.1.2.2 Preparación: Adicionar el cloruro de litio al agua. Esterilizar por filtración.

Precauciones, la disolución de cloruro de litio en agua es fuertemente exotérmica e irritante a las mucosas.

C.9.1.3 Solución de ácido nalidíxico.

C.9.1.3.1 Fórmula.

Sales de ácido nalidíxico sódico	0.1g
Solución de Hidróxido de sodio. 0,05 mol/L	10mL

C.9.1.3.2 Preparación: Disolver las sales de ácido nalidíxico en la solución de hidróxido de sodio. Esterilizar por filtración.

C.9.1.4 Solución de clorhidrato de acriflavina.

C.9.1.4.1 Fórmula.

Clorhidrato de acriflavina	0.25g
Agua	100mL

C.9.1.4.2 Preparación: Disolver el clorhidrato de acriflavina en una porción de agua. Esterilizar por filtración.

C.9.1.5 Solución de citrato, amonio hierro III.

C.9.1.5.1 Fórmula.

Citrato de amonio hierro III	5.0g
Agua	100mL

C.9.1.5.2 Preparación: Disolver el Citrato de amonio hierro III en el agua. Esterilizar por filtración.

C.9.1.6 Medio Completo.

Solución de Cloruro de Litio 10mL de solución al 3%.

C.9.1.6.1 Fórmula.

Medio Base	100mL
Solución de Cloruro de Litio	1.0mL
Solución de ácido nalidíxico	0.1mL
Solución de clorhidrato de acriflavina	0.5mL
Solución de citrato, amonio hierro III	1.0mL

C.9.1.6.2 Preparación: Agregar las 4 soluciones por cada porción de 100mL de base inmediatamente antes de usar.

C.9.2 Caldo Fraser.

C.9.2.1 Medio Base.

Fosfato de potasio monobásico.

C.9.2.1.1 Fórmula

Peptona de Carne	5.0g
Triptona	5.0g
Extracto de Carne de Res	5.0g
Extracto de Levadura	5.0g
Cloruro de Sodio	20.0g
Fosfato de sodio monobásico dihidratado	12.0g
Fosfato de Potasio dibásico	1.35g
Esculina	1.0g
Cloruro de litio	3.0g
Sal de sodio o ácido nalidíxico	0.02g
Agua	1000mL

C.9.2.1.2 Preparación: Disolver los componentes de la base en agua, puede usarse calentamiento. Ajustar el pH, cuando se requiera para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C . Distribuir la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C .

C.9.2.2 Solución de clorhidrato de acriflavina.

C.9.2.2.1 Fórmula.

Clorhidrato de acriflavina	0.25g
Agua	100mL

C.9.2.2.2 Preparación: Disolver el clorhidrato de acriflavina en una porción de agua. Esterilizar por filtración

C.9.2.3 Solución de citrato, amonio hierro III.

C.9.2.3.1 Fórmula.

Citrato de amonio hierro III	5.0g
Agua	100mL

C.9.2.3.2 Preparación: Disolver el Citrato de amonio hierro III en el agua. Esterilizar por filtración.

C.9.2.4 Medio Completo.

C.9.2.4.1 Preparación: Antes de usar añadir a cada tubo con 10mL del medio base 0.1mL de las soluciones de Clorhidrato de acriflavina y solución de citrato de amonio hierro III. Mezclar vigorosamente.

C.9.3 Agar Oxford.

C.9.3.1 Agar Base.

C.9.3.1.1 Fórmula.

Peptonas	23.0g
Almidón	1.0g
Cloruro de sodio	5.0g

Agar	De 9 a 18g ⁽¹⁾
Esculina	0.8g
Citrato de amonio, hierro III	0.5g
Cloruro de Litio	15.0g
Agua	960mL

⁽¹⁾ Dependiendo de la fuerza gel del agar.

C.9.3.1.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio deshidratado completo en agua hirviendo. Ajuste el pH si es necesario para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

C.9.3.2 Suplemento para 1000mL del Agar Oxford.

C.9.3.2.1 Fórmula.

Cicloheximida	400mg
Sulfato de Colistina	20mg
Clorhidrato de Acriflavina	5.0mg
Cefotetán	2.0mg
Fosfomicina	10mg
Etanol	5.0mL
Agua	5.0mL

C.9.3.2.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio deshidratado completo en una mezcla de etanol-agua. Esterilizar por filtración.

C.9.3.3 Medio completo.

C.9.3.3.1 Preparación: Enfriar la base a aproximadamente 47°C y agregue el suplemento asépticamente. Vierta el medio en cajas Petri, en aproximadamente 15mL. Almacene el medio en oscuridad, evite el contacto con la luz.

C.9.4 Agar PALCAM.

C.9.4.1 Agar Base.

C.9.4.1.1 Fórmula.

Peptonas	23.0g
Almidón	1.0g
Cloruro de Sodio	5.0g
Extracto de Levadura	3.0g
Agar	12.0g a 20.0g
Glucosa	0.5g
Manitol	10.0g
Esculina	0.8 a 1.0g
Cloruro de Litio	15.0g
Citrato de amonio, hierro III	0.5g
Rojo de fenol	0.08g
Agua	1000mL

C.9.4.1.2 Preparación: Disolver los componentes de la base en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C . Dispensar la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C .

C.9.4.2 Solución de Sulfato de Polimixina B.

C.9.4.2.1 Fórmula.

Sulfato de Polimixina B (100, 000 UI)	0.1g
Agua	100mL

C.9.4.2.2 Preparación: Disolver el Sulfato de Polimixina B en agua. Esterilizar por filtración.

C.9.4.3 Solución de clorhidrato de acriflavina.

C.9.4.3.1 Fórmula.

Clorhidrato de acriflavina	0.05g
Agua	100mL

C.9.4.3.2 Preparación: Disolver el Clorhidrato de acriflavina en agua. Esterilizar por filtración.

C.9.4.4 Solución de Ceftazidima sódica pentahidratada.

C.9.4.4.1 Fórmula.

Ceftazidima sódica pentahidratada	0.116g
Agua	100mL

C.9.4.4.2 Preparación: Disuelva la Ceftazidima Sódica Pentahidratada en agua. Esterilice por filtración.

C.9.4.5 Medio completo.

C.9.4.5.1 Fórmula.

Base Agar PALCAM	960mL
Solución de Sulfato de Polimixina B	10mL
Solución de Clorhidrato de acriflavina	10mL
Solución de Ceftazidima sódica pentahidratada	2mL

C.9.4.5.2 Preparación: A la base de agar fundida a 45°C agregar las 3 soluciones, mencionadas en la fórmula, mezclar vigorosamente entre cada adición. Para la preparación en placa añadir al número apropiado de cajas Petri aproximadamente 15mL del medio completo recién preparado, permita solidificar. Almacene el medio lejos de la luz.

C.9.5 Agar ASTEL.

C.9.5.1 Fórmula.

Extracto de levadura	6.0g
Agar	de 9 a $18\text{g}^{(2)}$
Agua	1000mL
Triptona	17.0g
Peptona de Soya	3.0g
Cloruro de sodio	5.0g

⁽²⁾ Dependiendo de la fuerza del agar

C.9.5.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en agua hirviendo. Ajustar el pH si es necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C . Dispensar en cajas Petri aproximadamente 15mL y dejar solidificar.

C.9.6 CSTEEL.

C.9.6.1 Fórmula.

Extracto de levadura	6.0g
Agua	1000mL
Triptona	17.0g
Peptona de Soya	3.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato de potasio	2.5g
Glucosa	2.5g

C.9.6.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en agua hirviendo. Ajustar el pH de ser necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Vierta el medio en matraces, frascos o tubos de capacidad apropiada para las pruebas. Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C .

C.9.7 Agar Sangre de cordero.

C.9.7.1 Fórmula.

Peptona de carne	15g
Digerido de hígado	2.5g
Extracto de levadura	5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	de 9g a 18g ⁽¹⁾
Agua	1000mL
Sangre de Cordero Desfibrada	5mL a 7mL

⁽¹⁾ Dependiendo de la fuerza del agar

C.9.7.2 Preparación: Disuelva los componentes en agua hirviendo con excepción de la sangre. Ajustar el pH si es necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.2 ± 0.2 a 25°C vierta el medio en matraces de capacidad apropiada, para las pruebas. Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C . Agregar la sangre desfibrada a la base previamente atemperada a 47°C , mezclar bien. Vierta el medio en cajas Petri en proporciones adecuadas para las pruebas, permita solidificar.

C.9.8 Caldo Carbohidratos (Ramnosa y Xilosa).

C.9.8.1 Medio Base.

C.9.8.1.1 Fórmula.

Proteasa de Peptona	10g
Extracto de Carne	1g
Cloruro de sodio	5g
Purpura de Bromocresol	0.02g
Agua	1000mL

C.9.8.1.2 Preparación: Disuelva los componentes en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH a modo que después de la esterilización sea de 6.8 ± 0.2 a 25°C . Vierta el medio en tubos de capacidad apropiada, para las pruebas. Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C .

C.9.8.2 Solución de Carbohidrato.

C.9.8.2.1 Fórmula.

Carbohidrato (L-Ramnosa o D-Xilosa)	5g
Agua	100mL

C.9.8.2.2 Preparación: Disuelva por separado cada carbohidrato en 100mL de agua, esterilizar por filtración.

C.9.8.3 Medio Completo.

C.9.8.3.1 Preparación: En condiciones asépticas para cada carbohidrato adicionar 10mL de solución del carbohidrato a 90mL de la base.

C.9.9 Agar de Movilidad.

C.9.9.1 Fórmula.

Peptona de Caseína	20.0g
Peptona de Carne	6.1g
Agar	3.5g
Agua	1000mL

C.9.9.2 Preparación: Disuelva los componentes en agua hirviendo. Ajustar el pH si es necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Vierta el medio en tubos en cantidades de 5mL y esterilice por 15 min en autoclave a 121°C .

C.9.10 Solución de Peróxido de Hidrógeno.

C.9.10.1 Preparación: Utilizar diez volúmenes de solución al 3% volumen/volumen.

Apéndice D Normativo.

Método alternativo para la estimación de Enterococos fecales en agua. Técnica de tubos múltiples.

D.1 INTRODUCCIÓN.

Este grupo fue separado del resto de los enterococos fecales debido a que son indicadores relativamente específicos de contaminación fecal. Sin embargo, algunos enterococos intestinales aislados de agua, pueden ocasionalmente tener un origen de otras fuentes, incluyendo suelos aun en ausencia de contaminación fecal. El grupo enterococo intestinal puede ser usado como un índice de contaminación fecal.

Los enterococos intestinales son relativamente tolerantes al NaCl y pH alcalino. La mayoría de las especies no se multiplican en agua.

La ventaja de este grupo sobre otros grupos indicadores (coliformes y *E. coli*) es que sobreviven durante más tiempo en medios acuáticos.

La presencia de enterococos intestinales evidencia una contaminación fecal reciente, así como la necesidad de llevar a cabo acciones en aquellas fuentes de abastecimiento con un inadecuado tratamiento de potabilización.

En la presente Norma se describen 3 técnicas para cuantificar y estimar la presencia de enterococos en agua para uso y consumo humano, agua envasada y hielo, agua de uso recreativo (dulce y salobre): 1. Técnica de filtración por membrana, 2. Técnica del NMP y 3. Técnica del sustrato cromogénico definido.

La técnica de NMP es un método de estimación probabilística de la densidad bacteriana presente en una muestra, basada en la dilución de la misma y sembrada en réplicas de tubos con caldo selectivo (caldo azida dextrosa), en los cuales después de un periodo de incubación de 24h- 48h a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, se observa la presencia de turbiedad en cada tubo.

La prueba confirmativa consiste en sembrar cada uno de los tubos que presenten turbiedad, en medio selectivo para enterococos de Pfizer. Después de un periodo de incubación, las colonias de color café a negro y un halo café debido a la hidrólisis de la esculina, son sembradas en caldo BHI con 6.5% de NaCl e incubadas a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. El desarrollo en este medio confirma la presencia de enterococos.

D.2 MATERIALES.

D.2.1 Botellas de dilución de vidrio de boro silicato o frascos de polipropileno;

D.2.2 Pipetas serológicas de 10mL;

D.2.3 Pipetas serológicas de 1mL;

D.2.4 Asas bacteriológicas;

D.2.5 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm con tapón de rosca;

D.2.6 Cajas Petri de vidrio de borosilicato o plástico estériles de 100mm x 150mm;

D.2.7 Propipeta, y

D.2.8 Gradillas.

D.3 APARATOS E INSTRUMENTOS.

D.3.1 Incubadora que evite variaciones mayores de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con termómetro calibrado o verificado;

D.3.2 Autoclave;

D.3.3 Balanza granataria con sensibilidad de al menos 0.1g;

D.3.4 Horno para esterilizar, y

D.3.5 Baño de agua a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

D.4 MEDIOS DE CULTIVO.

D.4.1 Caldo azida dextrosa;

D.4.2 ABEA, y

D.4.3 BHI

D.5 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

D.5.1 MEDIDAS DE SEGURIDAD.

Seguir las indicaciones precautorias que se señalan en el apartado de preparación de medios de cultivo.

D.5.2 MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD.

El laboratorio debe tener implementado un sistema de control de calidad para asegurar que los materiales, equipos, reactivos, medios de cultivo y técnicas sean adecuados para la prueba.

D.5.3 ÍNDICES DE REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD.

Basado en una distribución normal, el 95% de las medias de cada grupo de resultados analíticos deben estar entre +2 y -2 desviaciones estándar con respecto a la media de las medias.*

La precisión del analista deberá estar dentro de un 5%*.

*Fuente: Manual of food quality control 12. Quality assurance in the food control microbiological laboratory. Food and Agriculture Organization (FAO).

D.5.4 RECOMENDACIONES GENERALES PREVIAS AL ANÁLISIS DE LA MUESTRA.

Homogeneización de la muestra.- Las muestras en frascos con un espacio vacío (de al menos 2.5cm), pueden homogeneizarse por inversión rápida veinticinco veces. Las muestras en frascos que tengan de 2/3 a 3/4 de lleno, deberán agitarse 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30cm completados en un tiempo de 7s, para asegurar una unidad analítica representativa.

D.5.5 CONDICIONES DE PRUEBA.

Trabajar en condiciones asépticas en un área limpia y descontaminada. Todo el material que esté en contacto con la muestra debe estar estéril.

D.5.6 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Descontaminar el exterior de los contenedores de la muestra con etanol o isopropanol al 70%. Realizar diluciones decimales cuando se estime que la carga de enterococos es alta.

D.5.7 Prueba presuntiva.

D.5.7.1 El tamaño de la porción de muestra analizada dependerá de su tipo (agua para uso y consumo humano, agua envasada y hielo, agua de fuentes de abastecimiento y aguas de uso recreativo dulce y salobre). Utilizar 5 porciones de 20mL o 10 porciones de 10mL inoculados a tubos con caldo azida dextrosa (consultar la sección de medios de cultivo para las concentraciones). Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. La presencia de turbiedad en los tubos debida al desarrollo microbiano, se considera como prueba presuntiva positiva.

D.5.8 Prueba confirmativa.

D.5.8.1 A partir de cada tubo con turbiedad, transferir una asada a placas de ASPE. Incubar las placas invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. El desarrollo de colonias de color café oscuro a negro con halos café, confirman la presencia de estreptococos fecales.

Transferir al menos una colonia característica por tubo a tubos con caldo BHI con 6.5% de NaCl a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $48\text{h} \pm 4\text{h}$ y caldo BHI a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. El crecimiento en ambos medios confirma la presencia de enterococos.

D.5.9 Cálculos.

D.5.9.1 Calcular la densidad de enterococos por el NMP en 100mL con el número de tubos confirmados consultando las Tablas 1 o 2.

Tabla D. 1 Número más probable por 100mL de muestra de agua o hielo con un intervalo de confianza del 95%, utilizado 5 tubos con 20mL de muestras.

No. De Tubos positivos	NMP/100mL	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	<1.1	-	3.5
1	1.1	0.051	5.4
2	2.6	0.40	8.4
3	4.6	1.0	13
4	8.0	2.1	23
5	>8.0	3.4	-

Referencia: American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th edition 2005. Washington DC.

Tabla D.2 Número más probable por 100mL de muestra e intervalos de confianza del 95% utilizado 10 tubos con 10mL de muestras.

No. de tubos positivos	NMP/100mL	Límite de confianza	
		Inferior	Superior
0	<1.1	-	3.4
1	1.1	0.051	5.9
2	2.2	0.37	8.2
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.8	34
9	23	8.1	53
10	>23	13	-

Referencia: American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th edition 2005. Washington DC.

D.5.9.2 Considerar en el resultado final la(s) dilución(es) realizadas.

D.5.9.3 Para el caso de agua para uso recreativo utilizar cinco tubos con Caldo azida dextrosa por cada porción de 10mL, 1mL y 0.1mL de muestra. Para inóculos de 10mL de agua, preparar el medio a doble concentración y para volúmenes de 1mL y 0.1mL a concentración sencilla. Hacer diluciones decimales de la muestra cuando se considere necesario con solución reguladora de fosfatos o agua peptonada. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24h a 48h. La presencia de turbiedad en los tubos debida al desarrollo microbiano, se considera como prueba presuntiva positiva. Continuar como se indica para la prueba confirmativa.

D.5.9.4 Calcular la densidad total del grupo Enterococos por el NMP en 100mL con el número de tubos confirmados consultando la Tabla D.3.

Tabla No. D.3 NMP para 100mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de tres diluciones con series geométricas.

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP
0	0	0	<1,8	1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: AOAC 18 ° Edición. Revisión 2, 2007.

D.5.10 Interpretación de resultados.

El crecimiento en ambos medios caldo BHI con 6.5% de NaCl incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y en caldo BHI a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ confirma la presencia de enterococos fecales.

D.6 Criterios de validez de la prueba.

Esta prueba tiene validez cuando todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos o la combinación de ambos cuando la muestra contenga enterococos o cuando se trate de un cultivo control inoculado con 100 UFC.

D.7 Informe de prueba.

Informar como: Enterococos NMP/100mL.

D.8 MEDIOS DE CULTIVO.

Añadir el siguiente párrafo: De preferencia utilizar medios de cultivo comerciales. Seguir las instrucciones del fabricante para almacenar y eliminar después de su preparación. Si los medios de cultivo se deben preparar a partir de los ingredientes básicos, seguir las indicaciones descritas a continuación.

D.8.1 Caldo azida dextrosa*.**D.8.1.1 Fórmula.**

INGREDIENTES	CANTIDAD			
	Concentración 1x	Concentración 2x	Concentración 3x	Concentración 6x
	1mL o 0.1mL de muestra con 10mL de caldo	10mL muestra con 10mL de caldo	20mL muestra con 10mL de caldo	100mL muestra con 20mL de caldo
Extracto de Carne	4.5g	9.0g	13.5g	27.0g
Triptona o polipeptona	15.0g	30.0g	45.0g	90.0g
Glucosa	7.5g	15.0g	22.5g	45.0g
NaCl	7.5g	15.0g	22.5g	45.0g
Azida de Sodio, NaN ₃ ,	0.2g	0.4g	0.6g	1.2g
Agua	1L	1L	1L	1L

D.8.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua. Esterilizar a 121°C durante 15min. El pH después de la esterilización debe ser de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

***PRECAUCIÓN:** La azida de sodio es tóxica y mutagénica. Manejar con precaución y evitar el contacto con este compuesto. Puede formar compuestos explosivos si tiene contacto con metal.

D.8.2 ABEA.**D.8.2.1 Fórmula.**

Ingredientes	Cantidad
Peptona C (Triptona)	17.0g
Peptona B (Proteosa peptona No. 3)	3.0g
Extracto de Levadura	5.0g
Bilis bacteriológica	10.0g
Cloruro de Sodio	5.0g
Citrato de Sodio	1.0g
Esculina	1.0g
Citrato Férrico amónico	0.5g
Azida de Sodio, NaN ₃	0.15g
Agar	15.0g
Agua	1.0L

D.8.2.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua. Esterilizar a 121°C durante 15min. El pH después de la esterilización debe ser de 7.1 ± 0.2 a 25°C. Dejar enfriar y mantener el medio no más de 4h antes de vaciarlo a una temperatura de 45°C a 50°C.

***PRECAUCIÓN:** La azida de sodio es tóxica y mutagénica. Manejar con precaución y evitar el contacto con este compuesto. Puede formar compuestos explosivos si tiene contacto con metal.

D.8.3 BHI con 6.5% de NaCl.**D.8.3.1 Fórmula.**

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera a partir de 200.0g	7.7g
Infusión de corazón de res a partir de 250.0g	9.8g
Proteosa peptona	10.0g

Glucosa	2.0g
Cloruro de sodio NaCl	65.0g
Fosfato disódico hidrogenado Na ₂ HPO ₄	2.5g
Agua	1L

D.8.3.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua. Distribuir en tubos de ensaye. Esterilizar a 121°C durante 15 min. El pH después de la esterilización debe ser de 7.4 ± 0.2 .

Apéndice E Normativo.

Método de referencia “Sustrato cromogénico definido y fluorogénico para determinar Enterococos en agua”.

E.1 INTRODUCCIÓN.

Este método de prueba se basa en la detección de enterococos, tales como *E. faecium*, *E. faecalis* en agua potable, fuentes de abastecimiento, agua de uso recreativo (dulce y salobre), agua envasada y hielo. Cuando el reactivo (comercialmente disponible) es adicionado a la muestra e incubado a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$, se produce una fluorescencia dada por los Enterococos que metabolizan el indicador nutritivo. Esta prueba permite detectar hasta 1 UFC/100mL de Enterococos en la muestra a analizar.

E.2 MATERIALES.

E.2.1 Vasos estériles no fluorescentes;

E.2.2 Charolas con 51 celdas de un solo tamaño;

E.2.3 Charolas con 48 celdas pequeñas y 48 celdas grandes;

E.2.4 Tubos de ensaye de 20mm x 150mm, y

E.2.5 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm.

E.3 APARATOS E INSTRUMENTOS.

E.3.1 Selladora de charolas de cuantificación (comercialmente disponibles);

E.3.2 Lámpara de luz UV de 6 watts con una longitud de onda de 366nm;

E.3.3 Incubadora a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ de aire o baño de agua, y

E.3.4 Termómetro con variaciones de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ con un intervalo de 10°C a 50°C calibrado y/o verificado.

E.4 PROCEDIMIENTO.

E.4.1 Interferencia: En el caso de agua marina la presencia de *Bacillus* puede interferir con la prueba en muestras de agua (salobres) con una conductividad por arriba de 20,000 $\mu\text{Siemens/cm}$ a 25°C . Por lo que es necesario hacer una dilución 1:10 con agua estéril (deionizada o destilada).

E.4.2 Presencia/Ausencia.

E.4.2.1 Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 27°C). Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira. Golpear el paquete para asegurar que todo el polvo se vaya al fondo. Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma. Agregar el reactivo a 100mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible. Cubrir y sellar asépticamente el recipiente. Agitar hasta disolución del polvo. Incubar por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Observar la fluorescencia a las 24h con la lámpara de UV de 6 watts y 366nm de longitud onda en un cuarto oscuro. Asegurarse que la luz se encuentre alejada de sus ojos y dirigida hacia la muestra. Si se observa fluorescencia, se confirma entonces la presencia de enterococos.

E.4.3 NMP Procedimiento de enumeración para 100mL de muestra.

E.4.3.1 Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 27°C). Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira. Golpear el paquete para asegurar que todo el polvo se vaya al fondo. Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma. Agregar el reactivo a 100mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible. Cubrir y sellar asépticamente el recipiente. Agitar hasta disolución del polvo. Vaciar la muestra con el reactivo dentro de la charola de cuantificación, evitar el contacto con la hoja de la charola y el sello (consultar el instructivo del reactivo). Incubar $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Observar la fluorescencia a las $24\text{h} \pm 2\text{h}$ con la lámpara de UV de 6 watts y 366nm de longitud onda en un cuarto oscuro. Asegurar que la luz se encuentre alejada de sus ojos y dirigida hacia la muestra. Si se observa fluorescencia, se confirma entonces la presencia de enterococos. Contar el número de celdas positivas (fluorescencia). Interpolarse en las Tablas (ver Tabla E.1 y Tabla E.2), proporcionada por el fabricante para determinar el NMP/100mL. El NMP en 100mL de muestra equivale, en un 95% de confianza a las UFC presentes en 100mL.

E.4.4 Cálculos.

Para determinar presencia/ausencia no hay cálculos que realizar. Para la cuantificación referirse a las Tablas de NMP correspondientes. Considerar en los cálculos la dilución cuando proceda.

Tabla E.1 de NMP para charolas de 51 celdas.

No. de celdas positivas	NMP/100mL de muestra	Límite del 95 % de confianza	
		Bajo	Alto
0	< 1	0,0	3,7
1	1,0	0,3	5,6
2	2,0	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9,0
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3,0	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7,0	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15,0	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13,0	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,8	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19,0	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,4	56,6
28	40,6	28,0	59,5
29	42,9	29,7	62,5
30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69,0
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56,0	39,7	80,1
35	59,1	42,0	84,4
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50,0	99,0
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146,0
45	109,1	78,6	158,7
46	118,4	85,0	174,5
47	129,8	92,7	195,0
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	> 200,5	146,1	Infinito

Tabla No. E.2 de NMP (UFC/100mL) para charolas de 48 celdas pequeñas y 48 celdas grandes.

No. Large Wells positive	No. Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.9	172.7	177.7	182.9	188.2
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	178.0	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.3	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410.6	435.2

Tabla E.2 de NMP (Continuación).

No. Large Wells positive	No. Small Wells Positive																							
	25	26	27	8	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.4	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	40.0	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.7	28.7	29.8	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	43.0	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.4	31.4	32.5	33.6	34.7	35.8	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.8	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.9	41.0	42.1	43.2	44.4	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.7	35.8	36.9	38.0	39.2	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.3	59.4	60.6	61.8
8	36.6	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	59.0	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.7	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.7	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.3	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.6	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	62.0	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.4
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.5	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.8	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.7	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.1	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.8	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.2	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.4	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.3	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.7	83.3	85.1	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.3	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.7	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.2	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.8	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.4	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.7	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.4	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.2	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.5	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.3	150.3	153.5	156.7	159.9	163.1	166.5	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.2	149.4	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.7	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.7	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.1	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.5	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.1	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.2	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.7
44	193.6	199.3	205.1	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.8	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
45	214.1	220.9	227.9	235.2	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.3	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.8	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.1	452.0	467.4	483.3	499.6	516.3	533.5
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.3	574.8	601.5	629.4	658.6	689.3	721.5	755.6	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.2
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.2	1119.9	1203.3	1299.7	1413.6	1553.1	1732.9	1966.3	2419.6	>2419.6

E.4.5 Interpretación de resultados.

Si se observa fluorescencia en los frascos, tubos o charolas, se confirma entonces la presencia de Enterococos.

E.4.6 Criterios de validez de la prueba.

E.4.6.1 Deberá llevarse a cabo un control de calidad en cada nuevo lote de reactivo, el cual consiste del siguiente protocolo:

E.4.6.1.1 Para cada tipo de cepa ATCC enlistadas más adelante, estriar en AST o a placas de agar sangre e incubar a 35°C por 18h a 24h ± 2h.

E.4.6.1.2 De cada cepa bacteriana, tomar 1 colonia e inocular un tubo de ensayo con 5mL de agua deionizada estéril. Cerrar y agitar completamente.

E.4.6.1.3 A continuación tomar una asada de 1µL (microlitros) del tubo de ensayo y usar para inocular un frasco con 100mL de agua deionizada o destilada estéril, debidamente etiquetado. Seguir los pasos del inciso E.4.2 de presencia/ausencia, señalados anteriormente.

E.4.6.1.4 Comparar los resultados de esta prueba con los resultados esperados de la siguiente tabla:

Control	ATCC	Resultados esperados
<i>E. faecium</i>	700221 o 35667	Fluorescencia
<i>Serratia marcescens</i> (Gram -)	43862	No fluorescencia
<i>Aerococcus viridians</i> (Gram +)	10400	No fluorescencia

E.4.7 Informe de prueba.

Informar como presencia, ausencia o el resultado basado en el cálculo de la densidad de enterococos determinado en la Tabla de NMP E.1 y E.2.

E.5 MEDIOS DE CULTIVO.

E.5.1 Medio que contiene el sustrato fluorogénico definido (comercialmente disponible).

Apéndice F Normativo.**Método para la determinación de Enterococos fecales en agua técnica de filtración por membrana.****F.1 INTRODUCCIÓN.**

El recuento de enterococos intestinales se basa en la filtración de un volumen determinado de una muestra de agua, a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro suficiente para retener las bacterias (0.45µm). La membrana es colocada en un medio selectivo sólido que contiene azida de sodio, la cual inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas. El cloruro de 2, 3, 5 – trifeniltetrazolio es un compuesto incoloro, que por la acción de los enterococos intestinales, se reduce a formazán de color rojo.

Las colonias típicas de enterococos intestinales, son elevadas de color rojo, marrón o rosa.

Confirmación: si se observan colonias típicas, la prueba de confirmación es necesaria y la membrana se transfiere a una caja con ABEA (medios solidificados). Los enterococos intestinales hidrolizan la esculina, dando como producto final la 6, 7-dihidroxycumarina, que al combinarse con los iones Fe³⁺, forman un compuesto colorido que va desde marrón a negro que se difunde en el agar.

F.2 MEDIOS DE CULTIVO.

PRECAUCIÓN. La azida de sodio es un polvo fino altamente tóxico y mutagénico. Durante su preparación, deben emplearse guantes, cubrebocas especiales para polvos, lentes de protección y lavarse las manos inmediatamente después de su preparación.

Los medios que contienen azida no deben mezclarse con ácidos minerales fuertes, ya que puede producirse azida de hidrógeno que es tóxica. Las soluciones que contienen azida pueden formar también compuestos explosivos por contacto con tuberías metálicas, por ejemplo, en los desagües.

Las azidas pueden descomponerse de forma segura, por adición de un exceso de solución saturada de nitrito.

F.3 MATERIALES.

F.3.1 Botellas de dilución de vidrio de boro silicato o frascos de poli-propileno;

F.3.2 Pipetas serológicas de 10mL;

F.3.3 Pipetas serológicas de 1mL;

F.3.4 Pinzas estériles para membrana;

F.3.5 Matraces Kitazato de 1000mL;

F.3.6 Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45µm;

F.3.7 Cajas Petri de vidrio de borosilicato o plástico estériles de 60mm x 15mm o 50mm x 9mm u otro tamaño apropiado;

F.3.8 Propipeta, y

F.3.9 Manguera de hule para equipo de filtración.

F.4 APARATOS E INSTRUMENTOS.

F.4.1 Autoclave, capaz de mantener una temperatura de 121°C ± 1°C con termómetro calibrado y/o verificado;

F.4.2 Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH;

F.4.3 Equipo de filtración con trampa;

F.4.4 Bomba de vacío;

F.4.5 Cuenta colonias, y

F.4.6 Incubadora, capaz de mantener una temperatura de 35°C ± 0.5°C con termómetro verificado y/o calibrado.

F.5 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

F.5.1 Filtración e incubación: Conectar el equipo de filtración a la bomba de vacío. Utilizando pinzas estériles, colocar la membrana con la cuadrícula hacia arriba sobre el portafiltro. Colocar cuidadosamente el embudo sobre el receptáculo y asegurarlo en su lugar. Abrir la llave de paso y filtrar a través de la membrana, 100mL de muestra aplicando suficiente vacío (aproximadamente 70kPa (kilo pascal). Cerrar la llave de paso tan pronto como la muestra haya sido filtrada. Es aconsejable enjuagar el embudo mediante la filtración de 1 a 3 porciones de 10mL a 30mL de diluyente estéril, mientras la membrana permanezca en su lugar. Inmediatamente después cerrar la llave de paso. Retirar el embudo para dejar expuesta la membrana de filtración. Colocar la membrana con pinzas estériles en el agar Slanetz & Bartley. Evitar la formación de burbujas entre la membrana y la superficie del agar. Dejar 30 min y posteriormente incubar las placas invertidas a 35°C ± 0.5°C durante 48h ± 4h.

F.5.2 Confirmación y Recuento. Las colonias típicas de enterococos son elevadas, de color rojo, marrón o rosado. Si hay colonias típicas, transferir la membrana con pinzas estériles a una placa con ABE. Incubar a 35°C ± 0.5°C durante 48h ± 4h. Leer la placa inmediatamente después de la incubación. Las colonias típicas de enterococos intestinales presentan un color marrón a negro alrededor de la colonia. Con ayuda de un cuenta colonias, seleccionar cajas que contengan entre 20 y 60 colonias típicas y contar el número de UFC.

Nota: Una distribución desigual de las colonias o la presencia de microbiota competitiva, puede interferir con la diferenciación de colonias positivas debido a la difusión del color a las colonias adyacentes.

F.6 Cálculos.

Aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de enterococos:

Fórmula 1:

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s$$

Donde:

C_s es el número estimado de UFC en un volumen de referencia de la muestra (100mL)

Z es la suma de colonias contadas en las membranas provenientes de diferentes diluciones d_1, d_2, \dots, d_i o de volúmenes separados de muestras filtradas.

V_s es el volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración de enterococos en la muestra.

V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución.

Fórmula 2:

$$V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i)$$

Donde:

n_1, n_2, \dots, n_i es el número de membranas filtradas por dilución d_1, d_2, \dots, d_i

V_1, V_2, \dots, V_i es el volumen analizado en la dilución d_1, d_2, \dots, d_i o porción de muestra

d_1, d_2, \dots, d_i es la dilución utilizada por cada porción de volumen analizado V_1, V_2, V_i ($d = 1$ para la muestra sin diluir, $d = 0.1$ para una dilución 1:10, etc.)

Ejemplo:

Volumen probado	Cuentas
100mL	82 colonias
10mL	11 colonias

$$Z = 82 + 11 = 93$$

$$V_{\text{tot}} = (1 \times 100 \times 1) + (1 \times 10 \times 1) = 110$$

y si V_s es por 100mL:

$$C_s = \frac{93}{110} \times 100 = 84 \text{ UFC/100mL}$$

$$110$$

F.6.1 Interpretación de resultados.

La presencia de colonias color marrón a negro alrededor de la colonia en ABE, incubado a $35^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante $48\text{h} \pm 4\text{h}$, se considera una prueba confirmativa de la presencia del género *Enterococcus*.

F.6.2 Criterios de validez de la prueba.

Esta prueba tiene validez si se obtienen cajas que contengan entre 20 a 60 UFC.

Una distribución desigual de las colonias o la presencia de microbiota competitiva, puede interferir con la diferenciación de colonias positivas debido a la difusión del color a las colonias adyacentes.

F.7 Informe de prueba.

F.7.1 Informar como: Enterococos intestinales UFC/100mL.

F.7.2 Si se observan menos de 20 colonias, aplicar la fórmula 1 e informar como valor estimado.

F.7.3 Placas sin colonias, informar como $< 1/V_{\text{tot}}$ UFC/100mL e informar como valor estimado.

Donde: V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución (ver inciso F.6).

También se puede informar como "Cero" u "organismos no detectables" indicando el volumen de muestra analizada.

F.7.4 En caso que se tengan placas con más de 60 colonias, informar como $>$ de 60 UFC/100mL.

F.8 MEDIOS DE CULTIVO.**F.8.1 Medio Slanetz y Bartley. (Agar mEnterococos)****F.8.1.1 Medio base.**

Ingredientes	Cantidad
Triptosa	20,0g
Extracto de Levadura	5,0g
Glucosa	2,0g
Fosfato dipotásico, K_2HPO_4	4,0g
Azida de Sodio NaN_3	0.4g
Agar	8g a 18g* (* La cantidad de agar depende de la gelificación del agar)
Agua	1L

Disolver los ingredientes en 1L de agua hirviendo. Calentar durante 5 min más. Enfriar entre 50°C y 60°C .

F.8.1.2 Solución de TTC 0.1%.

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio TTC	1.0g
Agua	100mL

Disolver el indicador en 100mL de agua, agitando constantemente. Esterilizar por filtración (0,2µm de poro). Proteger la solución de la luz. Descartar cuando aparezca una coloración rosa.

F.8.1.3 Medio Completo.

Ingredientes	Cantidad
Medio Base	1L
Solución de TTC	10mL

Adicionar la solución de TTC sobre el medio base enfriado a una temperatura de 50°C a 60°C. El pH después de la esterilización debe ser de 7.2 ± 0.1 a 25°C. Distribuir en placas de Petri. Dejar solidificar sobre una superficie horizontal fría. Conservar en la oscuridad por 2 semanas a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

F.8.2 ABE.

Ingredientes	Cantidad
Extracto de Carne	3.0g
Peptona	5.0g
Bilis de buey deshidratada	40.0g
Esculina	1.0g
Citrato Férrico	0.5g
Agar	de 8g a 18g* (* Dependiendo de la gelificación del agar)
Agua	1L

Calentar para disolver los ingredientes. Esterilizar a $121^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 min. No sobrecalentar. El pH después de la esterilización debe ser de 6.6 ± 0.2 . Distribuir en placas Petri para obtener un espesor de 3mm a 5mm. Dejar solidificar en una superficie horizontal. Almacenar de 2°C a 10°C .

Apéndice G Normativo.

Método aprobado para el monitoreo de Enterococos fecales recomendado para el monitoreo de aguas para uso recreativo.

G.1 INTRODUCCIÓN.

Se basa en la filtración de un volumen determinado de una muestra de agua, a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro suficiente para retener las bacterias (0.45µm). La membrana es colocada en agar mEI el cual contiene entre otros ingredientes, el cromógeno indoxilβ D- glucosido, que debido a la acción de la enzima β-Dglucosidasa sintetizada por los enterococos, producen un compuesto azul indigo alrededor de la colonia que se difunde.

G.2 MATERIALES.

G.2.1 Botellas de dilución de vidrio de boro silicato o frascos de poli-propileno;

G.2.2 Pipetas serológicas de 10mL;

G.2.3 Pipetas serológicas de 1mL;

G.2.4 Pinzas estériles para membrana;

G.2.5 Matraces Kitazato de 1000mL;

G.2.6 Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45µm;

G.2.7 Cajas Petri de vidrio de borosilicato o plástico estériles de 60mm x 15mm o 50mm x 9mm u otro tamaño apropiado;

G.2.8 Propipeta, y

G.2.9 Manguera de hule para equipo de filtración.

G.3 APARATOS E INSTRUMENTOS.

G.3.1 Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH;

G.3.2 Equipo de filtración con trampa;

G.3.3 Bomba de vacío;

G.3.4 Cuenta colonias;

G.3.5 Incubadora, capaz de mantener una temperatura de 36°C ± 2°C con termómetro verificado y/o calibrado, y

G.3.6 Incubadora, capaz de mantener una temperatura de 45°C ± 0.5°C con termómetro verificado y/o calibrado.

G.4 MEDIOS DE CULTIVO.

G.4.1 BHI;

G.4.2 BHI con 6.5% NaCl;

G.4.3 Agar infusión cerebro corazón;

G.4.4 ABE, y

G.4.5 Agar mEI.

G.5 PROCEDIMIENTO.

G.5.1 Consultar el inciso F.5.1 y colocar la membrana en la superficie del agar mEI e incubar a 41°C ± 0.5°C por 24h. Seleccionar cajas que contengan entre 20 y 80 colonias que independientemente de su color tengan un halo azul correspondiente a enterococos. Las colonias con halo azul se pueden verificar.

G.5.2 La verificación de las colonias puede ser necesaria para evidenciar cúmulos y también para control de calidad al implementar la prueba, cambios en los sitios de muestreo, lotes de medio comercial o preparado por ingredientes. Transferir al menos 10 colonias típicas aisladas a caldo BHI y agar infusión cerebro corazón inclinado. Incubar los caldos y los agares por 48h a 35°C ± 0.5°C. Después de 24h de incubación transferir una asada de los tubos de BHI a ABE y a BHI y BHI con 6.5% de NaCl.

G.5.2.1 Incubar el ABE y el BHI con 6.5% de NaCl a 35°C ± 0.5°C por 48h.

G.5.2.2 Incubar el caldo BHI a 45°C ± 0.5°C por 48h.

G.5.3 Observar crecimiento.

G.5.3.1 Después de las 48h de incubación, hacer una tinción de Gram al crecimiento de los agares de BHI.

G.5.3.2 Los cocos Gram positivos que crecen e hidrolizan la esculina en ABE (producción de un precipitado negro o café) y crecen en caldo BHI a 45°C ± 0.5°C y caldo BHI con 6.5% de NaCl a 35°C ± 0.5°C son confirmados como enterococos.

G.6 Cálculos.

Aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de enterococos:

Fórmula 1:

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s$$

Donde:

C_s es el número estimado de UFC en un volumen de referencia de la muestra (100mL)

Z es la suma de colonias contadas en las membranas provenientes de diferentes diluciones $d_1, d_2 \dots d_i$ o de volúmenes separados de muestras filtradas.

V_s el volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración de enterococos en la muestra.

V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución.

Fórmula 2:

$$V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i)$$

Donde:

n_1, n_2, \dots, n_i es el número de membranas filtradas por dilución d_1, d_2, \dots, d_i

V_1, V_2, \dots, V_i es el volumen analizado en la dilución d_1, d_2, \dots, d_i o porción de muestra

d_1, d_2, \dots, d_i es la dilución utilizada por cada porción de volumen analizado V_1, V_2, \dots, V_i ($d = 1$ para la muestra sin diluir, $d = 0.1$ para una dilución 1:10, etc.).

Ejemplo:

Volumen probado	Cuentas
100mL	82 colonias
10mL	11 colonias

$$Z = 82 + 11 = 93$$

$$V_{\text{tot}} = (1 \times 100 \times 1) + (1 \times 10 \times 1) = 110$$

y si V_s es por 100mL:

$$C_s = \frac{93}{110} \times 100 = 84 \text{ UFC/100mL}$$

G.6.1 Interpretación de resultados.

La presencia de colonias que independientemente de su color presenten un halo azul en agar mEI, incubado a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 24h, se considera una prueba confirmativa de enterococos.

G.6.2 Criterios de validez de la prueba.

Esta prueba tiene validez si se obtienen cajas que contengan entre 20 a 80 UFC.

Una distribución desigual de las colonias o la presencia de microbiota competitiva, puede interferir con la diferenciación de colonias positivas debido a la difusión del color a las colonias adyacentes.

G.6.3 Informe de prueba.

Informar como: Enterococos intestinales UFC/100mL.

Si se observan menos de 20 colonias, aplicar la fórmula 1 e informar como valor estimado.

Placas sin colonias, informar como $< 1/V_{\text{tot}}$ UFC/100mL e informar como valor estimado.

Donde: V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución.

También se puede informar como "Cero" u "organismos no detectables" indicando el volumen de muestra analizada.

En caso que se tengan placas con más de 80 colonias, informar como $>$ de 80 UFC/100mL.

G.7 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**G.7.1 BHI.****G.7.1.1 Fórmula.**

Infusión de cerebro de ternera a partir de 200.0g	7.7g
Infusión de corazón de res a partir de 250.0g	9.8g
Proteosa peptona	10.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico	2.5g
Dextrosa	2.0g
Agua destilada	1.0L

G.7.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes o 37.0g del medio deshidratado en un matraz con 1L de agua destilada, distribuir volúmenes de 10mL en tubos de ensaye con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. El pH final del medio deberá ser de 7.4 ± 0.2 .

G.7.2 BHI con 6.5% de NaCl.

G.7.2.1 Fórmula: BHI con 6.5% de NaCl seguir las instrucciones que en BHI antes descrito, pero agregando NaCl.

G.7.2.2 Preparación: Agregar 60.0g de NaCl por cada L de medio. Dado que la presentación comercial deshidratada contiene 5g de NaCl, esta cantidad deberá restarse de los 65g necesarios por L para obtener una concentración final de 6.5% de NaCl.

G.7.3 Agar infusión cerebro corazón.

G.7.3.1 Fórmula: El agar BHI contiene los mismos ingredientes que el BHI pero adicionando 5.0g de agar por cada L de medio.

G.7.3.2 Preparación: Suspender los ingredientes o 52g del medio agar BHI deshidratado en 1L de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolver los ingredientes. Distribuir 10mL del medio en tubos con tapón de rosca y esterilizar a 121°C por 15 min. Después de la esterilización, solidificar inclinado, pH final 7.4 ± 0.2.

G.7.4 ABE.**G.7.4.1 Fórmula.**

Extracto de carne	3.0g
Peptona	5.0g
Sales biliares	40.0g
Esculina	1.0L
Citrato férrico	0.5g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0L

G.7.4.2 Preparación: Disolver los ingredientes o 64.0g del medio deshidratado en un 1L de agua destilada, calentar a ebullición hasta la disolución de los ingredientes.

Distribuir volúmenes de 10mL a tubos con tapón de rosca o frascos. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, Después de esterilizar, solidificar los tubos inclinados o dejar enfriar a 50°C en baño de agua y distribuir en cajas Petri, dejar solidificar. El pH final del medio es 6.6 ± 0.2. Almacenar en refrigeración.

G.7.5 Agar mEI.**G.7.5.1 Fórmula.**

Peptona	10.0g
Cloruro de sodio	15.0g
Extracto de levadura	30.0g
Esculina	1.0g
Actidiona (Cicloheximida)	0.05g
Azida de sodio	0.15g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0L

G.7.5.2 Preparación: Agregar a un matraz, los ingredientes o 71.2g del medio comercial deshidratado más 0.75g de indoxyl-β-D-glucósido a 1L de agua destilada. Calentar a ebullición hasta completa disolución. Esterilizar a 121°C durante 15 min y enfriar en baño de agua a 50°C.

Reactivos que se agregan después de esterilizar: Mezclar 0.24g de ácido nalidíxico en 5mL de agua destilada, agregar unas gotas de NaOH 0.1N hasta disolución y agregar al medio mEI y mezclar. Agregar 0.2g de cloruro de trifetil tetrazolio (TTC).

Alternativamente se pueden agregar las siguientes soluciones:

a) Ácido nalidíxico. Agregar 0.48g de ácido nalidíxico y 0.4mL de NaOH 10N a 10mL de agua destilada y mezclar. Esterilizar la solución por filtración y adicione 5.2mL por cada L de medio.

b) Cloruro de trifeniltetrazolium (TTC): Agregar 0.1g de TTC a 10mL de agua destilada y calentar para disolver. Esterilizar la solución por filtración y adicione 2mL por cada L de medio.

c) Vaciar en cajas de 9mm x 50mm aproximadamente de 4mL a 6mL y dejar solidificar. El pH final del medio deberá estar entre 7.1 ± 0.2. Conservar en refrigeración.

Apéndice H Normativo.

Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Este método es aplicable para la estimación de la densidad de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Este método es aplicable para la detección de coliformes fecales y *E. coli*, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos.

H.1 INTRODUCCIÓN.

Actualmente se utilizan 3 grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias del grupo coliforme se usan como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes totales, fecales y *E. coli* continúan siendo el indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas. El método del NMP consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. El uso de las series de tres, cinco y diez tubos va a depender de la contaminación esperada y el grado de exactitud deseada.

El principio de la técnica se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y crecimiento microbiano propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa a $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (para alimentos) $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (para agua) dentro de las 48h de incubación (coliformes fecales y *E. coli*).

Para obtener el NMP en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Alrededor del 96% de las cepas de *E. coli* incluso las cepas anaerogénicas producen la enzima beta-glucuronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucuronido (MUG) en 4-metilumbelliferona (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz UV de onda larga (365nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar cuando el MUG es incorporado al caldo EC o al caldo lauril.

Una excepción es la *E. coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7, que es GUD negativa; por lo que es común que esta prueba se utilice para diferenciar este serotipo de las demás *E. coli*.

La producción de GUD por otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* es rara. Algunas cepas o especies de *Shigella* (44%-58%) y *Salmonella* spp (20%-29%) son GUD positivas, sin embargo no se considera una desventaja de esta prueba para su uso en salud pública.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de tubos. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumenta, se reducen los límites de confianza.

H.2 EQUIPO.

H.2.1 Baño de agua con cubierta y recirculación constante que alcance una temperatura de 44.5°C , $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$;

H.2.2 Lámpara de luz UV de 365nm longitud de onda;

H.2.3 Incubadora de aire que mantenga una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$;

H.2.4 Balanza con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1g;

H.2.5 Motor de licuadora u homogenizador peristáltico;

H.2.6 Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH;

H.2.7 Mecheros Bunsen, y

H.2.8 Autoclave que mantenga una temperatura interna de 121°C bajo una presión de 15 psi (1 bar), equipado con termómetro calibrado y manómetro de presión calibrado, previamente calificada.

H.3 MATERIALES.

H.3.1 Tubos de cultivo de 18mm x 150mm, 18mm x 200mm, 16mm x 150mm, 16mm x 160mm, 22 x 175mm con tapón de rosca;

H.3.2 Tubos de fermentación (campanas de Durham);

H.3.3 Gradillas de plástico y metal;

H.3.4 Asas bacteriológicas;

H.3.5 Lentes protectores;

H.3.6 Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5°C calibrado. Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;

H.3.7 Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25°C a 55°C, una escala auxiliar a 0°C con subdivisiones de 0.1°C con una precisión y exactitud de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;

H.3.8 Cinta testigo para procesos de esterilización por calor húmedo;

H.3.9 Vasos de licuadora estéril o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico;

H.3.10 Pipetas graduadas bacteriológicas de 0.1mL, 1mL, 2mL, 5mL y 10mL;

H.3.11 Probetas de 100mL, 500mL y 1000mL;

H.3.12 Frascos de dilución de vidrio de borosilicato con tapón esmerilado;

H.3.13 Frascos con capacidad 500mL con tapa de rosca, y

H.3.14 Espátulas, cucharas, cuchillos, pinzas.

H.4. MEDIOS DE CULTIVO.

H.4.1 Caldo A-1;

H.4.2 Caldo lauril Triptosa;

H.4.3 Caldo EC;

H.4.4 EMB-L;

H.4.5 Caldo triptona al 1%;

H.4.6 Caldo RM – VP;

H.4.7 Caldo Citrato de Koser;

H.4.8 Citrato de Simmon;

H.4.9. Caldo Lauril triptosa con MUG;

H.4.10 Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis;

H.4.11 Agar Mc Conkey;

H.4.12 Agar Nutritivo;

H.4.13 Agar Cuenta Estándar, y

H.4.14 Caldo Lauril con MUG.

H.5. REACTIVOS.

H.5.1 Regulador de fosfatos solución concentrada;

H.5.2 Diluyente de peptona al 0.1%;

H.5.3 Reactivo de Kovac;

H.5.4 Reactivo de VP;

H.5.5 Indicador rojo de metilo, y.

H.5.6 Reactivos para la coloración de Gram.

H.6 CEPAS DE REFERENCIA

H.6.1 *E. coli* ATCC 25922, y

H.6.2 *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

H.7 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.**H.7.1 Procedimiento para determinar coliformes Totales, Fecales y *E. coli* en agua y hielo.**

H.7.1.1 Prueba presuntiva. Agitar vigorosamente la muestra veinticinco veces en un arco de 30° por 7s, la cantidad necesaria para el análisis deberá ser de 100mL como mínimo e inocular el caldo lauril triptosa a la concentración adecuada, como se describe en el punto H.14.1.2.

H.7.1.1.1 Agua para uso y consumo humano y envasada. Transferir 5 porciones de 20mL, 10 mL o una porción de 100mL. Consultar la tabla H.14.1.2, para seleccionar las diferentes concentraciones de caldo lauril de acuerdo a los diferentes volúmenes de muestra a inocular.

H.7.1.1.2 Agua para uso recreativo. Utilizar cinco tubos de caldo lauril por cada porción de 10mL, 1mL y 0.1mL, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta. Consultar las Tablas H.14.1.2.

H.7.1.1.3 Hielo. Fundir por completo el hielo a 45°C y realizar el análisis como agua para uso y consumo humano. Incubar los tubos de caldo lauril inoculados a 35°C ± 0.5°C por 24h a 48 h. Examinar los tubos a las 24h y observar si hay evidente formación de gas. Si no se observa la formación de gas, incubar 24h más y anotar los resultados.

H.7.1.2 Prueba confirmativa. De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos de Caldo EC para la prueba confirmativa; inocular en tubos de EC un control positivo de *E. coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes* e incubar con las muestras.

H.7.1.3 Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a 35°C ± 0.5°C por 48h ± 2h y para la prueba de coliformes fecales a 45.5°C ± 0.2°C en baño de agua con recirculación continua durante 24h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24h más. Utilizar estos resultados para calcular el NMP de Coliformes totales y coliformes fecales respetivamente. Consultar la sección de cálculos.

Nota: Para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a 45.5°C ± 0.2°C por 24h a 48h, excepto para muestras de agua que deberán incubarse a 44.5°C ± 0.2°C durante 24h a 48h.

H.7.1.4 Agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos. Agitar la muestra vigorosamente veinticinco veces en un arco de 30cm por 7s. Para la prueba de coliformes fecales, inocular la muestra de agua de mar directamente en cinco tubos conteniendo el Caldo A-1, por dilución en porciones de 10mL, 1mL y 0.1 mL en Medio A-1.

Incubar por 3h a 35°C ± 0.5°C para un periodo de resucitación, pasado este tiempo de incubación colocar los tubos en un baño de agua a 44.5°C ± 0.2°C por 21h ± 2h.

La producción de gas y/o efervescencia manifestada por una agitación suave de los tubos de Caldo A-1 incubados dentro de las 24h, indica una reacción positiva a coliformes de origen fecal. Para calcular el NMP/100mL consultar la Tabla correspondiente H.8.4.2 (TABLA 2).

H.7.1.5 Prueba complementaria.

H.7.1.5.1 Esta es una prueba optativa de calidad para todas las muestras de agua que tiene como objetivo confirmar el 10% de los tubos positivos de coliformes totales en caldo verde brillante. Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo verde brillante y sembrar por estría cruzada en agar Mc Conkey. Incubar a 35°C ± 0.5°C por 24h ± 2h. Observar las colonias típicas fermentadoras de color rosa intenso que pueden estar rodeadas de un halo opaco de precipitación de las sales biliares.

H.7.1.5.2 Seleccionar 1 o más colonias aisladas con las características anteriores o lo más parecido a esta descripción e inocular igual número de tubos de fermentación con caldo lauril triptosa y a tubos con agar nutritivo inclinado. Incubar a 35°C ± 0.5°C examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

H.7.1.5.3 Realizar tinción de Gram a partir del crecimiento en el agar nutritivo para observación de la morfología microscópica de las colonias.

H.7.1.5.4 La formación de gas en los tubos de caldo lauril sulfato dentro de las 48h ± 3h y la observación de bacterias Gram negativas, en forma de bacilos no esporulados constituyen una prueba positiva a la presencia del grupo coliforme.

H.7.1.6 Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica).**H.7.1.6.1 Prueba presuntiva.**

H.7.1.6.1.1 Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y/o Caldo A-1 y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento. Incubar las placas invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h - 24h. Seleccionar 2 colonias de cada placa con la morfología colonial típica: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar (placa o agar inclinado), para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas o tubos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h -a 24h.

H.7.1.6.1.2 Si no hay colonias con morfología típica, probar 1 o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa. Realizar un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos Gram negativos.

H.7.1.6.1.3 Pruebas bioquímicas: Indol, Rojo de metilo, VP, citrato.

H.7.1.6.1.3.1 Producción de indol. Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24h \pm 2h. Adicionar 0.2mL a 0.3mL de reactivo de Kovac, dejando caer las gotas del reactivo por las paredes del tubo y no agitar los tubos para observación del anillo rojo en la superficie. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

H.7.1.6.1.3.2 VP. Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h \pm 2h. Transferir 1mL a un tubo de 13mm x 100mm. Adicionar 0.6mL de solución α -naftol y 0.2mL de KOH al 40% y agitar. Cuando se desarrolla un color de rosa a rojo en 15min a 30min, se considera una prueba positiva.

H.7.1.6.1.3.3 Rojo de metilo. A la otra parte del caldo MR-VP inocular adicionar cinco gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo definido es una prueba negativa.

H.7.1.6.1.3.4 Citrato. Sembrar con inóculo ligero un tubo con caldo citrato de Koser, evitar turbiedad en el tubo. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 96h. Una reacción positiva se observa mediante el desarrollo de turbiedad detectable. Se puede utilizar como alternativa citrato de Simmon el cual se debe inocular por estría. Incubar $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h. Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y/o cambio a una coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

H.7.1.6.1.4 Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas.

H.7.1.6.1.4.1 Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48h a 35°C , sean bacilos o bacilos cortos Gram negativos no esporulados y se obtengan las siguientes combinaciones para el IMViC:

Pruebas	Biotipo 1*	Biotipo 2*
Indol	+	-
RM	+	+
VP	-	-
Citrato	-	-

* Son consideradas como *E. coli*.

H.7.1.6.1.4.2 Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC confirmados. Consultar el punto H.8 Cálculos.

H.7.2 Prueba para detectar *E. coli* en alimentos refrigerados o congelados.

H.7.2.1 Prueba Presuntiva. Seguir lo indicado en el punto H.7.3. Utilizando caldo lauril con MUG en vez de caldo lauril. Inocular un tubo con una cepa de *E. coli* GUD positiva como control (ATCC 25922). Además inocular otro tubo con una cepa de *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048) como control negativo, para facilitar la diferenciación entre los tubos que presenten sólo crecimiento y crecimiento con fluorescencia. Inocular los tubos por 24h a 48h \pm 2h a 35°C . Examinar cada tubo con crecimiento (turbiedad y gas), después, observar los tubos en la oscuridad con una lámpara de luz UV. Una prueba positiva para *E. coli* es la presencia de fluorescencia en el tubo. La lectura a las 24h de incubación, identifica a *E. coli* en un 83%-95%, mientras que a las 48h de incubación la identifica en un 96%-100%.

H.7.2.2 Prueba confirmativa. Confirmar todos los tubos positivos estriando en una placa de agar L-EMB, incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h y continuar como se indica en el punto H.7.1.6.1.1.

H.7.2.2.1 Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica). Calcular el NMP de *E. coli* basada en la confirmación de tubos en las tres diluciones consecutivas.

H.7.3 Procedimiento para Alimentos.

H.7.3.1 Prueba Presuntiva. Pesar 25g del alimento en 225mL de regulador de fosfatos o diluyente de peptona y moler por 2 min en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico, el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspás. Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2°C-5°C) un máximo de 18h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación. En caso de que la cantidad de muestra disponible sea menor a 25g y el análisis necesite ser efectuado (por denuncia o queja ante la autoridad), utilizar una cantidad de muestra que represente una proporción 1:10.

H.7.3.2 Preparar diluciones decimales con regulador de fosfatos. La cantidad de diluciones dependerá de la densidad de coliformes esperada. Agitar las diluciones veinticinco veces en un arco de 30cm por 7s transferir volúmenes de 1mL a tres tubos con 10mL de caldo lauril triptosa, por cada dilución por lo menos tres diluciones consecutivas (el volumen que se transfiera nunca debe ser menor del 10% de la capacidad total de la pipeta). Mantener la pipeta en ángulo de tal manera que descansa sobre el borde del tubo. El tiempo entre la homogeneización de la muestra y la inoculación de los tubos no debe exceder de 15 min a 20 min.

H.7.3.3 Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa, una vez inoculados incubar a 35°C ± 0.5°C. Examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

H.7.3.4 Prueba Confirmativa. Continuar como se indica en el H.7.1.2. Prueba Confirmatoria, considerando que si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24h más.

H.8. CALCULOS.

H.8.1 Con frecuencia es necesario calcular el NMP con cantidades de muestra diferentes de los enlistados en las Tablas H.8.4 desde el primer número de la combinación encontrada. Si la cantidad de muestra >0.01g multiplicar el NMP enlistado en la tabla utilizada dependiendo del procedimiento realizado por 10.

H.8.2 Una determinación de cinco tubos que dé tres tubos positivos en 0.01g; dos tubos positivos en 0.001g y un tubo positivo en 0.0001g (3-2-1) el resultado obtenido al leer en la Tabla H.8.4.2 (TABLA 2), es 17, multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP final por g de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1g en lugar de 0.1g, dividir el NMP derivado de la Tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en tres tubos para *E. coli* que dé tres tubos positivos en 1g; un tubo positivo en 0.1g y ningún positivo en 0.01g (3-1- 0) el resultado obtenido al leer en la tabla H.8.4.1 (TABLA 1) es 43 y dividir entre 10, lo que da 4.3 como el NMP presuntivo por g de muestra.

H.8.3 Un método alternativo para obtener el NMP es usando la siguiente fórmula:

$(\text{NMP/g de la tabla} - 100) \times \text{factor de dilución del tubo de en medio} = \text{NMP/g.}$

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

H.8.4 Tablas.

H.8.4.1 Tabla 1. NMP para 1g de muestra cuando se usan tres tubos con porciones de 0.1; 0.01 y 0.001g.

Tubos Positivos															
0,1	0,01	0,001	NMP												
0	0	0	< 3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 5

H.8.4.2 Tabla 2. NMP para 100mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de tres diluciones con series geométricas.

No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos			
10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP
0	0	0	<1.8	1	0	0	2.0	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4.0	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6.0	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8.0	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4.0	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	63
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	36	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	94
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2005. Chapter 17.3.

H.8.4.3 Tabla 3. NMP 100mL de muestra de agua o hielo e intervalos de confianza del 95% utilizando cinco tubos con 20 mL de muestra.

Tubos positivo	NMP/100mL	95% de Limite de confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.05	6.3
2	2.6	0.3	9.6
3	4.6	0.8	14.7
4	8.0	1.7	26.4
5	>8.0	4.0	-

Referencia: American Public Health Association. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.

H.8.4.4 Tabla 4. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando diez tubos con 10mL de muestra.

Tubos positivos	NMP/100mL	Limite de confianza	
		Interior	Superior
0	<1.1	-	3.3
1	1.1	0.05	5.9
2	2.2	0.37	8.1
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.9	33
9	23	8.1	53
10	>23	12	-

Referencia: Americana Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.

H.8.4.5 Tabla 5. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza	
0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-

Referencia: Bacteriological Analytical Manual. FDA, 8th Edición, Revisión A, 1998 Actualización Diciembre 2003.

H.8.4.6 Tabla 6. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/ g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<.90	-	3.1	8	2	0	17	7.7	34
0	0	1	0.9	0.04	3.1	8	2	1	19	9	34
0	0	2	1.8	0.33	5.1	8	2	2	21	10	39
0	1	0	0.9	0.04	3.6	8	2	3	23	11	44
0	1	1	1.8	0.33	5.1	8	3	0	19	9	34
0	2	0	1.8	0.33	5.1	8	3	1	21	10	39
0	2	1	2.7	0.8	7.2	8	3	2	24	11	44
0	3	0	2.7	0.8	7.2	8	3	3	26	12	50
1	0	0	0.94	0.05	5.1	8	4	0	22	10	39
1	0	1	1.9	0.33	5.1	8	4	1	24	11	44
1	0	2	2.8	0.8	7.2	8	4	2	26	12	50
1	1	0	1.9	0.33	5.7	8	4	3	29	14	58
1	1	1	2.9	0.8	7.2	8	5	0	24	11	44
1	1	2	3.8	1.4	9	8	5	1	27	12	50
1	2	0	2.9	0.8	7.2	8	5	2	29	14	58
1	2	1	3.8	1.4	9	8	5	3	32	15	62
1	3	0	3.8	1.4	9	8	6	0	27	12	50
1	3	1	4.8	2.1	11	8	6	1	30	14	58
1	4	0	4.8	2.1	11	8	6	2	33	15	62
2	0	0	2	0.37	7.2	8	7	0	30	14	58
2	0	1	3	0.81	7.3	8	7	1	33	17	73
2	0	2	4	1.4	9	8	7	2	36	17	74
2	1	0	3	0.82	7.8	8	8	0	34	17	73
2	1	1	4	1.4	9	8	8	1	37	17	74
2	1	2	5	2.1	11	9	0	0	17	7.5	31
2	2	0	4	1.4	9.1	9	0	1	19	9	34
2	2	1	5	2.1	11	9	0	2	22	10	39
2	2	2	6.1	3	14	9	0	3	24	11	44
2	3	0	5.1	2.1	11	9	1	0	19	9	39
2	3	1	6.1	3	14	9	1	1	22	10	40
2	4	0	6.1	3	14	9	1	2	25	11	44
2	4	1	7.2	3.1	15	9	1	3	28	14	58
2	5	0	7.2	3.1	15	9	1	4	31	14	58
3	0	0	3.2	0.9	9	9	2	0	22	10	44
3	0	1	4.2	1.4	9.1	9	2	1	25	11	46
3	0	2	5.3	2.1	11	9	2	2	28	14	58
3	1	0	4.2	1.4	10	9	2	3	32	14	58
3	1	1	5.3	2.1	11	9	2	4	35	17	73
3	1	2	6.4	3	14	9	3	0	25	12	50
3	2	0	5.3	2.1	12	9	3	1	29	14	58
3	2	1	6.4	3	14	9	3	2	32	15	62
3	2	2	7.5	3.1	15	9	3	3	36	17	74
3	3	0	6.5	3	14	9	3	4	40	20	91
3	3	1	7.6	3.1	15	9	4	0	29	14	58
3	3	2	8.7	3.6	17	9	4	1	33	15	62
3	4	0	7.6	3.1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8.7	3.6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8.8	3.6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4.5	1.6	11	9	5	0	33	17	73

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

Tubos positivos			NMP/ g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
4	0	1	5.6	2.2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6.8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5.6	2.2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6.8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3.6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6.8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3.6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9.2	3.7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8.1	3.6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9.3	4.5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9.3	4.5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5.6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5.6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2.5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7.2	3.1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8.5	3.6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9.8	4.5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7.3	3.1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8.5	3.6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9.8	4.5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8.6	3.6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9.9	4.5	18	10	1	2	38	17	74
5	2	2	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4.5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5.6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5.6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6.3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7.8	3.1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9.2	3.6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5.6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9.2	3.7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5.6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5.6	22	10	5	0	62	26	140
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7.4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5.6	23	10	5	3	100	44	180

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

Tubos positivos			NMP/ g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7.4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7.4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7.4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4.5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6.3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7.2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6.3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7.2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7.7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6.4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7.2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	2	17	7.7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7.2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5.6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7.5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7.1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7.7	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	-

H.8.4.7 Tabla 7. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando diez tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 0.1; 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
3	4	0	7.6	3.1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8.7	3.6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8.8	3.6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4.5	1.6	11	9	5	0	33	17	73
4	0	1	5.6	2.2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6.8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5.6	2.2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6.8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3.6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6.8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3.6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9.2	3.7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8.1	3.6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9.3	4.5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9.3	4.5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5.6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5.6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2.5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7.2	3.1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8.5	3.6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9.8	4.5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7.3	3.1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8.5	3.6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9.8	4.5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8.6	3.6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9.9	4.5	18	10	1	2	38	17	74
5	5	5	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4.5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5.6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5.6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6.3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7.8	3.1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9.2	3.6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5.6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9.2	3.7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5.6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5.6	22	10	5	0	62	26	140

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 0.1; 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7.4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5.6	23	10	5	3	100	44	180
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7.4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7.4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7.4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4.5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6.3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7.2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6.3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7.2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7.7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6.4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7.2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	1	17	7.7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7.2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5.6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7.5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7.1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7.1	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	--

H.8.4.8 Tabla 8. NMP por 100mL de muestra inoculando tubos de cada una de tres diluciones geométricas.

Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP
10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1		NMP	10	1	
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish. Fourth Edition 1970. APHA. New York

H.8.5 ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DE NMP. Uso de Tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

H.8.5.1 Las Tablas H.8.4.5 (Tabla 5), H.8.4.6 (Tabla 6), H.8.4.7 (Tabla 7) presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan tres, cinco y diez tubos. Otras combinaciones de resultados positivos y negativos no encontrados en estas Tablas, tienen muy baja probabilidad de que se presenten. Si los resultados no están incluidos en las Tablas, se deberá repetir la prueba a partir de la muestra original. Si no es posible, el NMP se puede obtener aplicando una ecuación (véase H.9 y el 95% de Límite de Confianza) para tener el NMP aproximado (para las combinaciones de tres y cinco tubos).

H.8.5.2 El intervalo del 95% de confianza se interpreta como sigue: si el analista supone que el número real de microorganismos cae dentro de los límites, entonces se asume que será correcto el 95% de las veces. El valor del NMP tabulado representa un intervalo y no un valor absoluto.

H.8.5.3 Cuando se preparan más de tres diluciones de una muestra, el NMP deberá determinarse a partir de los resultados de tres diluciones consecutivas. Primero, para todas las diluciones que tengan todos los tubos positivos, seleccionar la dilución mayor. Después usar las dos siguientes diluciones mayores. Cuando en ninguna de las diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas para que la dilución media contenga resultados positivos. Cuando se presenta un resultado positivo en la dilución más alta no seleccionada (menor cantidad de muestra), sumar el número de tubos positivos a la dilución más alta seleccionada. Cuando todos los tubos de todas las diluciones son positivos seleccionar las tres diluciones más altas.

H.8.5.3.1 Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de 3 tubos con 1g (mL) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL ^b
	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	>110000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (mL) por 100 para expresarlos como NMP/100g (mL)

H.8.5.3.2 Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de cinco tubos con 1g (mL) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL ^b
	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001		
A	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	490
B	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	4900
C	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	18
D	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-2	1400
E	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	>160000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (mL) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (mL).

H.9 CÁLCULO APROXIMADO DEL NMP Y EL 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA.

H.9.1 Debido a la inherente complejidad para calcular los límites de confianza del NMP lo más común es el uso de Tablas. Generalmente estas Tablas están limitadas al uso de tres, cinco y diez tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de uno o más tubos de dilución. En este caso una serie de diluciones de por ejemplo: 5, 4, 4 puede dar una lectura de 5-2-0. Para estos casos se puede aplicar una fórmula sencilla, la cual no corresponde exactamente con los resultados obtenidos teóricamente; sin embargo, las desviaciones generalmente son pequeñas, esta fórmula no debe ser aplicada para fines de regulación. La fórmula no restringe el número de tubos o las diluciones y puede aplicarse para todo tipo de pruebas. El cálculo aproximado de Thomas está dado por la siguiente ecuación:

$$\text{NMP/g} = P/(N T)^{1/2}$$

Donde: P es el número de tubos positivos, N es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos y T es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos.

Por ejemplo, considerando que se tuvieran serie de diluciones al doble:

MUESTRA (g)	No. DE TUBOS	No. DE TUBOS POSITIVOS
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0.5	5	1
0.25	5	0

El número de tubos positivos es:

$$\underline{P} = (5 + 4 + 2 + 1) = 12;$$

$$\underline{N} = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0.5 \times 4) + (0.25 \times 5) = 18, 25; \text{ y}$$

$$\underline{I} = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75$$

$$\text{NPM/g} = 12 / ((18,25 \times 78,75)^{1/2}) = 0,32/\text{g} \text{ o } 32/100 \text{ g.}$$

Los límites de confianza del 95% estimados, pueden obtenerse del antilogaritmo de base 10 con la siguiente ecuación:

$$\log (\text{NMP/g}) \pm 1,078 [(\log a)/n]^{1/2}$$

$$\text{Log} (\text{NMP/g}) \pm (1,96) (0,55)$$

Donde: a es el radio de dilución 2 y

n es el número de tubos por dilución.

Para el ejemplo anterior el NMP con n = 5 y un límite de confianza aproximado de 95% será el siguiente:

$$\log 0,32 \pm (1,078)[(\log a)/n]^{1/2}$$

$$= -0,495 \pm 0,265$$

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo (-0,76) = 0,17/g o 17/100 g y el límite superior es el antilogaritmo (-0,23) = 0,59/g o 59/100 g. Cuando se compara con las Tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g.

H.10 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

H.10.1 Expresar en NMP/g o mL para alimentos y NMP/100mL para agua.

H.10.2 Cuando se obtienen resultados negativos (ausencia de gas en los tubos), informar el límite de detección que corresponde a menos del valor más bajo del NMP de la Tabla utilizada. Excepto en los casos de agua para uso y consumo humano que como lo indica la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, debe expresarse como "No detectable" o "ND".

H.11 MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD.

H.11.1 Verificar la funcionalidad del procedimiento analítico mediante cultivos control con cepas de *E. coli* y *E. aerogenes* para coliformes fecales y *E. coli* y *K. pneumoniae* para la determinación de *E. coli* con caldo EC-MUG.

H.11.2 Registrar las temperaturas de incubación con termómetros verificados.

H.11.3 Pesar la muestra en balanza calibrada y verificada.

H.11.4 Verificar el ciclo de esterilización de autoclaves con indicador biológico y termómetro de máximas calibrado o verificado.

H.11.5 Verificar el ciclo de esterilización de hornos con indicador biológico.

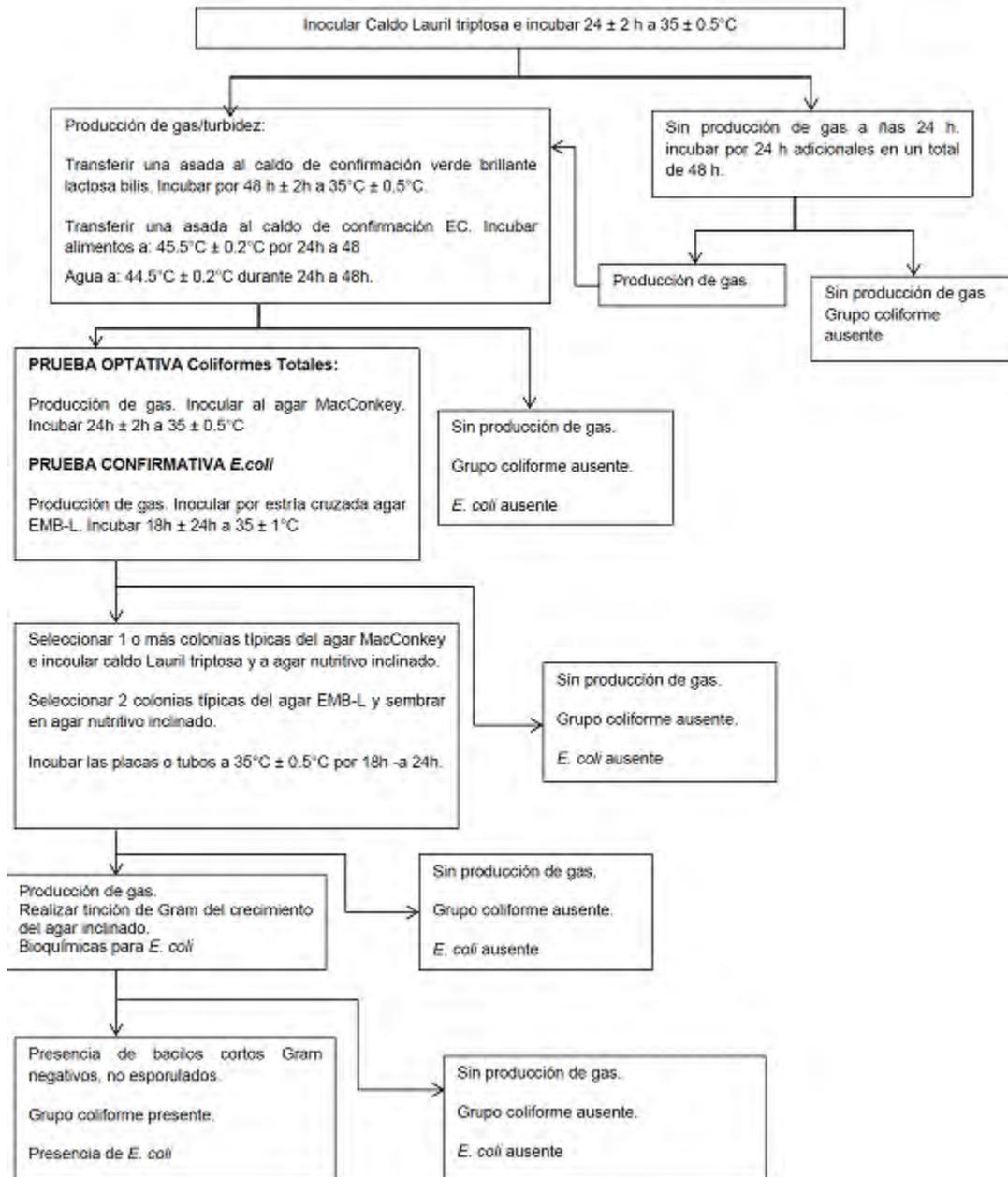
H.11.6 Realizar control de medios de cultivo con cepas tipo (evaluación biológica) y evaluación física.

H.11.7 Realizar control ambiental por el método de sedimentación.

H.12 VALIDEZ DE LA PRUEBA.

H.12.1 Cuando todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos o la combinación de ambos.

H.12.2 Si el crecimiento de los controles no es característico, la prueba se invalida.

H.13 Diagrama de Flujo.**H.14 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**

H.14.1 Caldo A-1. El caldo A-1 debe prepararse a partir de sus ingredientes individuales. Las fórmulas comerciales no son aceptables.

H.14.1.1 Fórmula.

Este medio se debe preparar a partir de los siguientes ingredientes:

Lactosa	5.0g
Triptona	20.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Salicina	0.5g
Eter p-isocetilfenil polietilen glicol (Tritón X-100)	1.0mL
Agua destilada	1000mL

H.14.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua destilada hasta su disolución, calentar suavemente sólo si es necesario, agregar 1mL del Tritón X-100 y ajustar el pH a 6.9 ± 0.1 . Para alícuotas de 10mL de muestra preparar y utilizar el medio a doble concentración (2X). Para lograr aproximadamente el mismo nivel del medio e inóculo en todos los tubos, distribuir porciones de 10mL del caldo en tubos de 18mm x 150mm. Los tubos deben contener campanas de Durham; usar tubos de 22mm x 175mm para el caldo a doble concentración (2X). Esterilizar en autoclave a 121°C por 10min y guardar el medio a temperatura ambiente en un lugar oscuro por no más de 7 días, para evitar la formación de precipitado o floculo.

H.14.2 Caldo lauril Triptosa.

H.14.2.1 Fórmula.

Bacto triptosa	20.0g
Bacto lactosa	5.0g
Fosfato potásico dibásico	2.75g
Fosfato potásico monobásico	2.75g
Cloruro de sodio	5.0g
Lauril sulfato de sodio	0.1g
Agua destilada	1000mL
pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C.	

H.14.2.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye 16mm x 150mm con campanas de Durham. Adicionar el volumen de medio de acuerdo con la siguiente tabla cuando se prepare a partir de medio completo deshidratado. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

Preparación de caldo lauril triptosa.

Cantidad de muestra inoculada (mL)	Cantidad de medio por tubo (mL)	Volumen de medio más inóculo (mL)	Caldo lauril Triptosa requerido g/l
1	10 o más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

H.14.3 Caldo EC.

H.14.3.1 Fórmula.

Bacto triptosa o tripticasa	20.0g
Bacto lactosa	5.0g
Bacto sales biliares No. 3	1.5g
Fosfato dipotásico	4.0g
Fosfato monopotásico	1.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6.9 ± 0.2 a 25°C.	

H.14.3.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua destilada, dejar en reposo durante 5 min a 10 min, mezclar bien hasta que se disuelva por completo. Ajustar el pH si es necesario. Distribuir en porciones de 10mL en tubos de ensaye de 16mm x 150mm con campanas de Durham y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

H.14.4 EMB-L.

H.14.4.1 Fórmula.

Peptona	10.0g
Lactosa	10.0g
K ₂ HPO ₄	2.0g
Eosina Y	0.4g
Azul de metileno	0.065g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000mL
pH final: 7,1 ± 0,2	

H.14.4.2 Preparación: Disolver la peptona, el fosfato y el agar en 1L de agua, calentar hasta ebullición para la disolución completa, distribuir en porciones de 100mL o 200mL y esterilizar a no más de 121°C por 15 min.

Fundir antes de su uso y adicionar a cada porción de 100mL lo siguiente:

- 5mL de solución de lactosa al 20% estéril.
- 2mL de solución acuosa de eosina y al 2%.
- 4.3mL de solución acuosa de azul de metileno al 0.15%.

Cuando se use el producto deshidratado disolver todos los ingredientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

H.14.5 Caldo triptona al 1%.

H.14.5.1 Fórmula.

Triptona o tripticasa	10g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6.9 ± 0.2	

H.14.5.2 Preparación: Disolver los ingredientes, distribuir en porciones de 5mL en tubos de ensaye de 16mm x 125mm o 16mm x 150mm y esterilizar a 121°C por 15 min.

H.14.6 Caldo MR – VP.

H.14.6.1 Fórmula.

Peptona tamponada	7g
Glucosa	5g
K ₂ HPO ₄	5g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6.9 ± 0.2	

o

Digerido Pancreático de caseína	3.5g
Digerido péptico de tejido animal	3.5g
Dextrosa	5g
Fosfato de potasio	5g
Agua destilada	1000mL
pH 6.9 ± 0.2	

o

Peptona	5g
Glucosa	5g
Regulador de Fosfatos	5g
Agua destilada	1000mL
pH 7.5 ± 0.2	

H.14.6.2 Preparación: Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario, distribuir en volúmenes de 10mL en tubos de ensaye de 16mm x 150mm y esterilizar a 121°C por 15min.

H.14.7 Caldo Citrato de Koser.

H.14.7.1 Fórmula.

NaNH ₄ HPO ₄ 4H ₂ O	1.5g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1.0g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
Citrato de sodio 2H ₂ O	3.0g
Agua destilada	1000mL

H.14.7.2 Preparación: Distribuir 5mL del caldo preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca y esterilizar a 121°C por 15 min.

Esta formulación se recomienda en los métodos de análisis oficial de AOAC y en los Métodos Estándares para el Análisis de Agua y Aguas de Desecho (APHA). Éste difiere de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente y es recomendable su uso.

H.14.8 Citrato de Simmon.

H.14.8.1 Fórmula.

NaNH ₄ HPO ₄ •4H ₂ O	1.0g a 1.5g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1.0g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2g
Citrato de sodio 2H ₂ O	2.0g a 3.0g
NaCl	5.0g
Agar	13g-15g
Azul de bromotimol	0.08g
Agua destilada	1000 mL

H.14.8.2 Preparación. Disolver los ingredientes y calentar a ebullición por 1 min. Distribuir en porciones de 5mL, en tubos con tapón de rosca, esterilizar por 15 min a 121°C y dejar solidificar en una superficie lo suficientemente inclinada para tener una profundidad de 3cm.

H.14.9 Regulador de fosfatos solución concentrada.

H.14.9.1 Fórmula.

KH ₂ PO ₄	34g
Agua destilada	500mL

H.14.9.2 Preparación: Solución concentrada: Disolver el fosfato en 500mL de agua y ajustar el pH a 7.2 ± 0.2, con solución de hidróxido de sodio 1.0N, llevar a 1L con agua y esterilizar durante 15 min a 121°C. Conservar en refrigeración.

Solución de trabajo: Tomar 1.25mL de la solución concentrada y llevar a 1L con agua. Distribuir en porciones de 99mL, 90mL y 9mL según se requiera. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

H.14.10 Diluyente de peptona al 0.1%.**H.14.10.1 Fórmula.**

Peptona	1g
Agua destilada	1000mL
pH: 7.0 ± 0.2	

H.14.10.2 Preparación: Disolver la peptona en el agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 min.

H.14.11 Reactivo de Kovac.**H.14.11.1 Fórmula.**

p-dimetilaminobenzaldehído	5g
Alcohol amílico (normal)	75mL
HCl concentrado	25mL

H.14.11.2 Preparación: Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal, adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

H.14.12 Reactivo de VP.**H.14.12.1 Fórmula.**

Solución 1.

alfa-naftol	5g
Alcohol Absoluto	100mL

Solución 2.

KOH	40g
Agua destilada	Para llevar a 100mL

H.14.12.2 Preparación: Disolver el alfa-naftol en 100mL del alcohol absoluto; para la solución 2, disolver el KOH en 100mL de agua destilada.

H.14.13 Indicador rojo de metilo.**H.14.13.1 Fórmula.**

Rojo de metilo	0.10g
Etanol al 95%	300mL
Agua destilada	Para completar 500mL

H.14.13.2 Preparación: Disolver el rojo de metilo en 300mL de etanol y aforar a 500mL con agua destilada.

H.14.14 Reactivos para la coloración de Gram.**H.14.14.1 Cristal Violeta.****H.14.14.1.1 Fórmula.**

Solución A.

Cristal violeta (colorante 90%)	2g
Etanol 95%	20mL

Solución B.

Oxalato de amonio	0.8g
Agua destilada	80mL

H.14.14.1.2 Preparación: Disolver el cristal violeta en 20mL del alcohol al 95%; para la solución 2, disolver el Oxalato de Amonio en 80mL de agua destilada. Mezclar la solución A y B y filtrar a través de un papel filtro. Almacenar por 24h.

H.14.14.2 Lodo.

H.14.14.2.1 Fórmula.

Iodo	1g
Ioduro de potasio (KI)	2g
Agua Destilada	300mL

H.14.14.2.2 Preparación: Colocar el KI en un mortero, adicionar el yodo, triturar con el pistilo por 5s a 10s, adicionar 1mL de agua y triturar. Adicionar 5mL de agua y triturar. Adicionar 10mL de agua y triturar. Vaciar esta solución en una botella de reactivo, enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar 300mL.

H.14.14.3 Colorante de contraste (solución concentrada).

H.14.14.3.1 Fórmula.

Safranina	2.5g
Etanol al 95%	100mL

H.14.14.3.2 Preparación: Solución de trabajo: Adicionar 10mL de la solución concentrada a 90mL de agua destilada.

H.14.15 Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante.

H.14.15.1 Fórmula.

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10.0g
Lactosa	10.0g
Sales biliares	20.0g
Verde Brillante	0.0133g
Agua	1L

H.14.15.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C . Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C .

Apéndice I normativo.

Método aprobado para la estimación de la densidad de *E. coli* por la técnica del NMP, para productos de la pesca.

Este método es aplicable para pescados y productos de la pesca como: pescados crudos, enteros o filetes sin piel y cabeza, pescado salado, seco, ahumado, cefalópodo entero o en rebanada, crustáceos entero como langostas, cangrejo, gasterópodos, bivalvos, caracoles, procesados pescados y crustáceos moluscos como: secos, ahumados, marinados, troceado, horneado, pescado entero o filetes con o sin piel cocidos, surimi, crustáceos enteros y moluscos en su concha, congelados, pescado, entero, filetes y piezas, cangrejo, cefalópodos, moluscos en concha cocidos y caracoles en concha.

I.1 INTRODUCCIÓN.

Este método consta de dos etapas. La primera es un enriquecimiento mediante la inoculación de la muestra previamente homogeneizada y diluida en cinco tubos por dilución, en caldo glutamato con minerales modificado e incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h. La segunda es la confirmación de la presencia de *E. coli* mediante la resiembra de tubos en los que se observe producción de ácido en agar que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D glucuronido y detectar la actividad de β -glucuronidasa incubado a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 22h \pm 2h.

I.2 EQUIPO.

- I.2.1 Homogeneizador peristáltico y bolsas;
- I.2.2 Motor homogeneizador rotatorio y vasos de licuadora;
- I.2.3 Gabinete de flujo laminar (clase II);
- I.2.4 Refrigerador a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- I.2.5 Material de vidrio estéril;
- I.2.6 Cuchillos desconchadores, tijeras, pinzas, espátulas estériles;
- I.2.7 Mechero Bunsen;
- I.2.8 Guantes de látex;
- I.2.9 Incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- I.2.10 Asas bacteriológicas;
- I.2.11 Pipetas de 1mL, 2mL y 10mL;
 - I.2.12 Martillo, y
- I.2.13 Desconchador.

I.3 MATERIALES.

- I.3.1 Cajas Petri desechables 15mm x 100mm;
- I.3.2 Tubos de ensaye 18mm x 200mm y de 16mm x160mm con tapón de rosca;
- I.3.3 Botellas de dilución de vidrio de borosilicato con tapa de rosca;
- I.3.4 Botellas de 500mL esterilizables;
- I.3.5 Termómetros de máximas cuya precisión/exactitud no sea mayor a 1°C . Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa alguna, éste deberá salir de uso, y

I.3.6 Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25°C a 55°C , una escala auxiliar a 0°C con subdivisiones de 0.1°C con una precisión y exactitud de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa alguna, éste deberá salir de uso.

I.4 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

- I.4.1 Etanol;
- I.4.2 Agua peptonada al 0.1% (concentración simple);
- I.4.3 MMGB medio selectivo de enriquecimiento;
- I.4.4 TBGA, y
- I.4.5 Tween 80.

I.5. CULTIVOS DE REFERENCIA.

- I.5.1 *E. coli* ATCC 25922 o ATCC 8739, y
- I.5.2 *E. faecalis* ATCC 29212 o ATCC 19433.

I.6 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

I.6.1 Procedimientos generales. Todas las preparaciones de las muestras deben llevarse a cabo en condiciones asépticas con materiales estériles y evitar contaminaciones de fuentes externas.

I.6.2 Productos congelados. Los productos congelados deben permitir que obtengan una consistencia adecuada para ser muestreados en el laboratorio, almacenados de 18°C a 27°C (temperatura del laboratorio) por máximo de 3h o a $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h. Las muestras deben ser analizadas tan rápido como sea posible después de este paso. Si el producto todavía está congelado, tomar una porción del diluyente a temperatura del laboratorio y adicionar para facilitar la descongelación.

I.6.3 Productos secos y duros. No homogeneizar en un homogeneizador rotatorio por más de 2.5 min.

Para productos secos y duros heterogéneos, puede ser necesario picarlos o moler la muestra por no más de 2.5 min para evitar el aumento de temperatura.

I.6.4 Productos líquidos no viscosos. Antes de analizar la muestra agitar manualmente veinticinco veces en un arco de 30cm durante 7s o por medios mecánicos para asegurar la distribución homogénea de los microorganismos.

I.6.5 Productos heterogéneos. Para las muestras que contienen diferentes piezas de alimentos, muestrear varias alícuotas representativas de las diferentes porciones del producto. También se puede homogeneizar toda la muestra recibida en el laboratorio y tomar una porción analítica de este homogeneizado. Para lo cual puede ser necesario picar o moler por más de 1 min para evitar sobrecalentamiento de la muestra.

I.6.6 Productos ácidos. Cuando se analicen productos ácidos es necesario llevar el pH a la neutralidad. El uso de un diluyente con un indicador de pH puede evitar el uso de tiras reactivas de pH. Para lo cual es necesario adicionar NaOH (0.1Mplar) y ajustar cuando el indicador cambie de coloración.

I.6.7 Alimentos altos en grasa (aproximadamente sobre el 20% de grasa). Usar diluyente con Tween 80 entre 1 y 10mg/L de acuerdo al contenido de grasa mejora la emulsificación de la suspensión.

I.6.8 Pescado fresco entero. Las áreas de las branquias, el intestino y el ano deben ser cubiertas con algodón estéril empapado de alcohol al 70%. Tomar porciones cúbicas del músculo dorsal y moler con el diluyente.

I.6.9 Rebanadas y filete de pescado. Tomar una porción representativa de la muestra y diluir 1 + 9 de diluyente.

I.6.10 Cefalópodos enteros y en rebanadas. Remover la piel y las ventosas con pinzas y bisturí. Tomar porciones cúbicas del músculo dorsal y porciones de los tentáculos. Adicionar diluyente necesario para tener una dilución 1:10. La carne de los cefalópodos es relativamente firme, moler con el diluyente con homogeneizador rotatorio o cortar en piezas finas.

I.6.11 Crustáceos enteros como cangrejos. Utilizar martillo, pinzas para romper la concha y tenazas para extraer la cantidad máxima de carne para el análisis. Adicionar el diluyente y moler con homogeneizador rotatorio. Alternativamente se puede cortar en piezas finas y colocarlo en doble bolsa de homogeneizador peristáltico para evitar derrames durante la homogeneización.

I.6.12 Carne de crustáceo en concha. Tomar una porción necesaria para tener una suspensión 1:10 y homogeneizar.

I.6.13 Crustáceos como gambas, langostinos y langostas. Remover la cabeza y la cola antes del análisis de la carne del cuerpo. Excepto para animales pequeños cortar la carne en piezas. Homogeneizar en licuadora. Adicionar la cantidad necesaria de diluyente para tener una dilución 1:10.

I.6.14 Moluscos bivalvos, gasterópodos y otros. Las muestras en el laboratorio deben ser almacenadas a 4°C ±2°C. Los moluscos deben estar vivos. Desechar los moluscos con las conchas abiertas o dañadas. Una muestra representativa debe contener al menos 6 conchas individuales que deberán ser aproximadamente 75g a 100g (25g para animales pequeños). La muestra de bivalvos debe contener carne y líquido intervalvar (licor). Abrir la cantidad necesaria de moluscos para tener la cantidad suficiente de muestra para el método.

I.6.14.1 Bivalvos. Lavar y cepillar cada concha con agua potable corriente, especialmente del músculo abductor o bisagra. Colocar los bivalvos en una charola con un papel absorbente. Con un cuchillo desconchador estéril, insertar la punta entre las valvas y hacer palanca para cortar el músculo abductor y abrir la concha. Penetrar sobre la concha superior y drenar el licor y la carne en un vaso de precipitados estéril. Adicionar una parte de carne y licor (agua intervalvar) y dos partes de diluyente y homogeneizar en homogeneizador rotatorio por 30s a 2 min. De esta manera se obtiene una suspensión 1:2 de diluyente, puede adicionarse la cantidad necesaria para obtener una dilución 1:9.

I.6.14.2 Gasterópodos. Lavar y cepillar cada concha, lavarlas con alcohol al 70%, romper la concha con un martillo para extraer el animal. Preparar una dilución 1:2 en diluyente y posteriormente completar el volumen a una dilución 1:10.

I.6.14.3 Erizos de mar. Lavar seis piezas individualmente con agua potable corriente y colocarlos en una charola estéril. Sostener los animales con unas pinzas y con un guante apropiado cortar una pieza del lado ventral con unas tijeras afiladas. Colectar la carne y en fluido en un contenedor estéril para homogeneizarlo. Preparar una dilución 1:2 con diluyente y después una cantidad necesaria para tener una dilución 1 + 9 con el mismo diluyente.

I.6.15 Productos salados y encurtidos. Tomar tiras del producto para obtener el homogeneizado. En caso de que sea muy salado es necesario diluir más de 1:10.

I.6.16 Pescado seco. Con unas tijeras cortar piezas del cuerpo del pescado incluyendo la piel. Preparar 1 suspensión 1:2 con el diluyente y homogeneizar en un motor de licuadora, adicionar la cantidad suficiente para tener una dilución 1:10 usando el mismo diluyente.

I.6.17 Pescado seco y salado. Prepara la muestra igual que para el pescado seco. Si es necesario rehidratar la muestra con agitación por 60min de 18°C a 27°C.

I.6.18 Pescado ahumado entero. Si el pescado se come entero, incluir en la muestra la piel, si no se come entero excluir la piel.

I.6.19 Pescado ahumado en filetes o rebanadas con o sin piel. Tomar porciones en cubo de la muestra retirando la piel.

I.6.20 Productos marinados. Para productos acidificados bajar el pH a 6 – 7.

I.6.21 Pescados empanizados, surimi, crustáceos y moluscos delicatessen. Tomar porciones representativas de la muestra y diluir 1:10.

I.6.22 Platos con pescado, crustáceos y moluscos cocidos. Tomar una porción de cada componente. Homogeneizar toda la muestra para tomar una muestra analítica.

I.6.23 Gasterópodos cocidos. Tomar una porción del cuerpo del animal con pinzas y diluir 1:10.

I.6.24 Langostinos en concha congelados en bloque. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, extraer los langostinos con pinzas estériles. Mezclar las piezas con un homogeneizador peristáltico.

I.6.25 Bloques congelados de carne de cangrejo en hojuelas. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, extraer trozos con pinzas estériles. Mezclar con el diluyente con un homogeneizador rotario.

I.6.26 Cefalópodos enteros congelados en bloque. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C -27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, extraer con pinzas o tijeras estériles. Mezclar las piezas con un homogeneizador rotario.

I.6.27 Filetes de pescado congelado en bloques. Tomar una muestra perforando el bloque o permitir que se descongele de 18°C a 27°C por 1h y tomar porciones con pinzas estériles o dejar que se descongele lo suficiente por no más de 3h para tomar porciones con pinzas estériles.

I.6.28 Piezas grandes de pescado congelado en bloques. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C para que el bloque se pueda romper, rebanar con cuchillo bien afilado estéril por la mitad del bloque.

I.6.29 Porciones pequeñas de pescado congeladas individuales. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C (temperatura ambiente). Tratar la muestra como un producto fresco.

I.6.30 Atún entero congelado. Si el atún es descongelado tomar una pieza del músculo debajo de la piel usando un cuchillo estéril. Si el atún no se descongela usar un perforador. Pescado congelado y piezas de pescado congelado. Descongelar poco a poco por no más de 3h a 18°C -27°C (temperatura ambiente) o descongelar en el refrigerador de 0°C a 4°C por máximo de 48h o tomar piezas con un perforador evitando los huesos si es posible.

I.6.31 Preparación de diluciones decimales. Transferir 1mL de la suspensión inicial a un tubo con 9mL de diluyente estéril.

NOTA: Si es necesario tener un volumen más grande de la suspensión inicial (más de 1mL) adicionar nueve partes del diluyente empleado. Introducir la pipeta no más de 1cm de profundidad. Utilizar una pipeta para cada dilución. Mezclar perfectamente entre cada dilución preferentemente usando un agitador mecánico para obtener una dilución 10⁻². Si es necesario repetir la operación con una pipeta nueva diferente para obtener 10⁻³, 10⁻⁴ etc. hasta obtener la dilución apropiada y obtener la cantidad de microorganismos necesaria. Se deberán realizar suficientes diluciones decimales para obtener resultados negativos.

I.6.32 Duración del proceso. El tiempo inicial entre la preparación de la suspensión y el momento final cuando el inóculo entre en contacto con el medio no debe ser mayor a 45 min, mientras que el límite de tiempo entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de las diluciones decimales siguientes no debe ser mayor a 30 min.

I.7 MEDIOS DE CULTIVO.

I.7.1 Agua peptonada al 0.1% (concentración simple);

I.7.2 Caldo glutamato con minerales modificado (MMGB medio selectivo de enriquecimiento), y

I.7.3 Agar bilis glucuronido (TBGA sundo medio selectivo).

I.8 PROCEDIMIENTO, INOCULACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.

I.8.1 En caso general inocular tres tubos por cada dilución. Para moluscos vivos, u otros productos especiales y/o cuando sea necesario obtener resultados más exactos es necesario inocular series de cinco tubos por dilución. Tomar tres tubos de medios de enriquecimiento selectivo. Con una pipeta estéril transferir 10mL de la muestra líquida o 10mL de la suspensión original en caso de otros productos. Tomar tres tubos de concentración simple de medios de enriquecimiento selectivo, usando otra pipeta estéril, transferir a cada uno de estos tubos 1mL de la muestra líquida o 1mL de la suspensión en caso de otros productos. Realizar diluciones decimales y repetir los puntos anteriores para cada dilución. Mezclar cuidadosamente el inóculo y el medio.

I.8.2 Incubar a 37°C ± 1°C por 24h ± 2h.

I.8.3 Para cada tubo inoculado que muestre presencia coloración amarilla estriar con un asa a una placa de agar triptona bilis glucuronido para obtener colonias aisladas.

I.8.4 Incubar las placas a 44°C ± 1°C por 24h ± 2h.

I.8.5 Después del periodo de incubación, observar la presencia de colonias de cualquier tono azul (oscuro o pálido), indican la presencia de β-glucuronidasa positivo de *E. coli*.

I.9 INTERPRETACIÓN.

I.9.1 Considerar como positivo cada tubo del cual se obtengan colonias azules a azules-verdes en la placa del medio selectivo. Contar por cada dilución el número de tubos positivos en el medio.

I.10 EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

I.10.1 Calcular el NMP a partir del número de tubos positivos por cada dilución consultando las Tablas I.1 o I.2 dependiendo de la serie de tubos que se utilice. Considerar la cantidad de gramos de muestra en cada dilución e informar por 100g de molusco o por g para productos de la pesca en general.

I.11 PRECISIÓN.

I.11.1 La técnica del NMP tiene amplias variaciones en los resultados en series de tres tubos por dilución. Por lo que los resultados obtenidos deben ser usados con precaución. Cuando se use las series de cinco tubos, se debe de reportar con la precisión obtenida la cual es comparable con los métodos de cuenta de colonias. Los límites de confianza se encuentran en las tablas (I.1, I.2).

Ejemplo.

Para una combinación de tubos positivos de 3-3-2 se tendría una lectura de 24NMP/g en un intervalo de confianza de 95% de 9.8 a 70 *E. coli* glucuronidasa positiva.

Para una combinación de tubos positivos de 5-2-1 se tendría una lectura de 70NMP/g en un intervalo de confianza de 95% de 22 a 170 *E. coli* glucuronidasa positiva.

I.12 INFORME DE PRUEBA.

I.12.1 El informe debe especificar:

I.12.1.1 Toda la información necesaria y completa para la identificación de la muestra;

I.12.1.2 El método de muestreo usado, si se conoce;

I.12.1.3 El método de prueba usado;

I.12.1.4 Todos los detalles no especificados en la técnica, y

I.12.1.5 Los resultados obtenidos y/o si la repetitividad se ha realizado.

Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.8	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.8	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Tabla I.2. Número más probable por gramo de muestra e intervalo de confianza del 95%, utilizando 5 tubos con 0.1, 0.01 y 0.001 g de muestra

Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<1.8	--	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	35	250
3	0	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	35	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	--

I.13. MEDIOS DE CULTIVO.**I.13.1** Agua peptonada al 0.1% (concentración simple).

Peptona bacteriológica (Oxoid LPP37)

1.0±0.1g

Agua deionizada

1L

pH

7.0 ± 0.2

I.13.1.1 Preparación: Suspender los ingredientes en 1L de agua destilada. Dejar en reposo durante 5 min a 10 min. Mezclar bien, agitando frecuentemente, hasta completar la disolución. Ajustar el pH.

I.13.2 Caldo glutamato con minerales modificado (MMGB medio selectivo de enriquecimiento).

Ingredientes	Doble concentración	Concentración simple
Glutamato de sodio (Oxoid L124)	12.7g	6.35g
Lactosa	20.0g	10.0g
Formato de sodio	0.5g	0.25g
L-Cisteína	0.04g	0.02g
L(-) Acido aspártico	0.048g	0.024g
L(+) - Arginina	0.04g	0.02g
Tiamina	0.002g	0.001g
Ácido nicotínico	0.002g	0.001g
Ácido pantogénico	0.002g	0.001g
Sulfato de magnesio septahidratado	0.2g	0.1g
Citrato de fierro III	0.02g	0.01g
Cloruro de calcio dihidratado	0.02g	0.01g
Fosfato dipotásico	1.8g	0.9g
Púrpura de bromocresol	0.02g	0.01g
Cloruro de amonio	5.0g	2.5g
Agua destilada	1000mL	1000mL

I.13.2.1 Preparación: Disolver el cloruro de amonio en agua. Adicionar el resto de los componentes hasta su completa disolución y calentar si es necesario. Para mejorar la estabilidad del almacenamiento del medio. Adicionar el glutamato de sodio por separado. Ajustar el pH si es necesario, así como después de la esterilización el cual debe de ser de 6.7 ± 0.1 a 25°C . Distribuir el medio en volúmenes de 10mL en caso de concentración simple y tubos de 22mm x 175mm para el caso de concentración doble de medio. Esterilizar en autoclave a 116°C . Alternativamente calentar a 100°C por 30 min en 3 días sucesivos.

I.13.3 Agar bilis glucuronido (TBGA segundo medio selectivo).

Digerido enzimático de caseína	20.0g
Sales biliares No.3	1.5g
5-Bromo-4-cloro-3-Indol- β -D- glucuronido ácido (BCIG)	144 μ mol (micro mol) ^a
Dimetil sulfoxido (DMSO) ^b	3mL
Agar	9g ^c a 18g ^c
Agua	1000mL

a Por ejemplo 0.075g de

b Dimetil sulfoxido es peligroso al inhalarlo y al contacto. Se recomienda el uso de cubrebocas para humos y equipo de protección apropiado para manejar este reactivo.

c Depende de la concentración del gel el agar.

I.13.3.1 Preparación: Disolver el medio anterior en el dimetil sulfoxido. Disolver todos los componentes en aguas calentando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario, así como después de la esterilización el cual debe de ser de 7.2 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar el medio a 121°C por 15 min. Vaciar de 12mL a 15mL en placas Petri estériles y dejar secar. Las placas pueden ser almacenadas a entre 3°C y 5°C hasta 5 días. El agar debe estar lo suficientemente seco para permitir que el exceso de humedad desaparezca dentro de los 15 min después de extender el inóculo.

Apéndice J Normativo.**Método para la Enumeración de *E. coli* β-glucuronidasa a 44°C utilizando 5-Bromo-4-cloro-3-Indol β-D-Glucurónido.**

ADVERTENCIA - Las cepas de *E. coli*, que no crecen a 44°C y en particular, los que son β-glucuronidasa negativas, como *E. coli* O:157, no serán detectadas.

J.1. INTRODUCCIÓN.

El medio TBX presenta la ventaja con respecto a otros medios de cultivo, al haber adicionado un agente cromógeno X-glucurónido, el cual detecta la actividad de la enzima glucuronidasa que es altamente específica de *E. coli*. Al contrario de lo que sucede con el MUG en donde el fluoróforo liberado por la célula queda atrapado dentro del agar y es requisito evidenciarlo con ayuda de luz UV de onda larga (365nm), la liberación del cromóforo en el medio TBX es insoluble y se acumula dentro de la misma célula. Esto asegura que sea más fácil la detección de colonias típicas de *E. coli* debido a que adquieren cierta coloración característica. La mayoría de los biotipos de *E. coli*, se podrán diferenciar de otros coliformes, debido a la presencia de la enzima glucuronidasa.

El cromógeno en el medio TBX es el 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucurónido (X-glucurónido), y es el blanco de esta enzima. Las células de *E. coli* son capaces de absorber este complejo intacto y la glucuronidasa intracelular rompe los enlaces entre el cromóforo y la glucuronidasa. El cromóforo liberado tiene un color propio y se queda atrapado dentro de la célula, provocando que las colonias de *E. coli* se observen de color azul sin la necesidad de interpretar con iluminación de luz UV de onda larga.

J.2 EQUIPO:

J.2.1 Incubadora capaz de operar a 44°C ± 1°C;

J.2.2 Baño de agua capaz de mantener una temperatura de 44°C a 47°C;

J.2.3 Incubadora capaz de operar a 35°C ± 2°C, y

J.2.4 Homogeneizador peristáltico o licuadora.

J.3 MATERIALES:

J.3.1 Tubos de Ensaye;

J.3.2 Matraces;

J.3.3 Botellas;

J.3.4 Micropipetas y Pipetas de 1mL, 10mL graduadas respectivamente en 0.1mL y 0.5mL, y

J.3.5 Cajas Petri de aproximadamente 90mm de diámetro.

J.4 MEDIOS DE CULTIVO.

J.4.1 TBX.

J.5 CONDICIONES DE PRUEBA.**J.5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO.**

J.5.1.1 Tomar diferentes porciones del alimento, transferir 25g o mL a frascos de dilución conteniendo 225mL de agua peptonada amortiguada. Realizar diluciones seriadas si es necesario. En una situación atípica y justificada, si la porción de muestra utilizada en el ensayo es distinta a 25g o mL, se deberá utilizar la cantidad necesaria de agua peptonada amortiguada para obtener una dilución 1:10.

J.5.1.2 Dependiendo de la naturaleza del producto homogeneizar por 1 min o 2 min en Licuadora o agitador peristáltico.

J.5.1.3 El tiempo que transcurre entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe exceder de 45min.

J.5.2 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN.

J.5.2.1 Utilizando una pipeta estéril o micropipeta con puntas estériles, transferir por duplicado a placas Petri 1mL de la muestra (muestras líquidas) o 1mL de cada dilución preparada. Inocular por duplicado en cajas Petri.

J.5.2.2 Adicionar en cada caja Petri aproximadamente 15mL del medio TBX previamente fundido y mantenido en un baño de agua entre 40°C y 50°C.

J.5.2.3 Homogenizar el inóculo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio. Dejar solidificar.

Nota: El tiempo que transcurre entre el inóculo en la caja Petri y adicionar el medio de cultivo no debe exceder de 15 min.

J.5.2.4 Invertir las placas e incubar por un periodo inicial de 4h a 35°C ± 2°C e incubar inmediatamente a 44°C ± 1°C durante 18h a 20h. El tiempo total de incubación no debe exceder 24h.

Nota: La temperatura de incubación no debe exceder 45°C.

J.6 CUENTA DE UFC.

Después del periodo de incubación contar las colonias típicas como β-glucuronidasa positiva, colonias azules.

J.7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS.**J.7.1 CÁLCULOS.**

Nota: Para que el resultado sea válido, es necesario que al menos una de las placas contadas tenga 15 UFC típicas (Colonias azules).

Seleccionar las placas que contienen menos de 150 UFC típicas (*E. coli* β-glucuronidasa positiva) y en total no tener más de 300 UFC (típicas y no típicas).

Calcular N, como el número de UFC de *E. coli* β-glucuronidasa positiva, presente en la muestra por mL o g, como la media de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

Dónde:

$\sum a$ = Es la suma de las UFC contenidas en todas las placas por duplicado, donde al menos una cumpla con el criterio de tener 15 colonias típicas.

n_1 = Es el número de placas inoculadas para la primera dilución.

V = Es el volumen del inóculo, en mL, inoculados en cada Placa Petri.

n_2 = Es el número de placas inoculadas para la segunda dilución.

d = Es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución (d= 1 en el caso de productos líquidos, donde la muestra es directamente inoculada)

Redondear el resultado a números enteros utilizando dos cifras significativas.

Tomar el número resultante como las UFC de *E. coli* β-glucuronidasa positiva, por mL o por g de producto.

Ejemplo: Se analizó fruta picada para la búsqueda de *E. coli* β-glucuronidasa positiva. Se obtienen los siguientes resultados:

Dilución	Colonias contadas en Placa "a"	Colonias contadas en Placa "b"
1:10	125	109
1:100	21	16

Aplicando la fórmula anterior y sustituyendo los valores se obtiene:

$$N = \frac{125 + 109 + 21 + 16}{1 [2 + (0.1)(2)] 0.1}$$

$$N = \frac{271}{0.22} = 1231 \approx 1200 \text{FC/g de } E. coli \beta\text{-glucuronidasa positiva.}$$

Nota: Redondear a 2 cifras significativas.

J.7.2 ESTIMACIÓN DE NÚMEROS BAJOS.

J.7.2.1 Si las placas Petri contienen menos de 15 colonias típicas, calcular el N_E el número de UFC de *E. coli* β -glucuronidasa positiva presente en la muestra, como la media aritmética de dos placas paralelas utilizando la siguiente ecuación:

$$N_E = \frac{\sum c}{(V)(n)(d)}$$

Dónde:

$\sum C$ = Es la suma de las UFC típicas de las dos placas.

V = es el volumen del inóculo, en mL para cada placa.

n = es el número de placas Petri utilizadas en el recuento ($n=2$ en este caso).

d = es el factor de dilución de la suspensión inicial o la primera dilución inoculada ($d = 1$ en el caso de productos líquidos) donde la muestra es inoculada directamente.

Redondear el resultado a dos cifras significativas.

Expresar los resultados como sigue:

- Número estimado de UFC *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g.

Ejemplo: En un brote alimenticio se analizó carne de hamburguesa mal cocida para la búsqueda de *E. coli* β -glucuronidasa positiva. Se obtienen los siguientes resultados.

Dilución	Colonias contadas Placa "a"	Colonias contadas Placa "b"
1:10	5	7

Aplicando la fórmula anterior y sustituyendo los valores se obtiene:

$$N_E = \frac{5+7}{(1\text{mL})(2)(0.1)} = \frac{12}{0.2} = 60 \text{UFC/g}$$

Reportar como:

60* UFC/g de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

*** Valor estimado.**

J.7.2.2 Si dos placas inoculadas directamente con la muestra de prueba o con la dilución inicial; no se observa crecimiento de colonias azules; expresar los resultados como sigue:

- Menos que $1/d$ de *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g.

Donde d es el factor de dilución de la dilución inicial ($d= 1$ en el caso de productos líquidos los cuales son inoculados directamente en la caja Petri).

Por ejemplo: si no se encuentran colonias en ninguna dilución y la primer dilución es 1:10 entonces reportar como menos que $1/0.1$ es decir < 10 UFC g o mL de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

J.7.2.3 Si la cuenta de colonias típicas y atípicas en la primera dilución es mayor de 300, pudiendo discernir colonias azules y en la siguiente dilución la cuenta de típicas y atípicas es menor de 300 colonias sin ninguna colonia típica azul, expresar los resultados como sigue:

- Menor que $1/d_2$ y mayor que $1/d_1$ *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g. Donde d_1 y d_2 son los factores de dilución correspondientes a los factores de dilución de la primera y segunda dilución respectivamente.

Por ejemplo: En la dilución 1:10 se cuenta más de 300 colonias y se observan algunas colonias azules, y en la segunda dilución (1:100) se cuentan 33 colonias pero ninguna colonia típica azul.

Entonces se tiene $< 1/0.01$ y $> 1/0.1$ por lo tanto: $< 100\text{UFC/g}$ y $> 10\text{UFC/g}$ de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

J.7.2.4 Si en la primera dilución d_1 el total de colonias típicas y atípicas es mayor de 300 sin discernir colonias azules y para la subsecuente dilución d_2 contiene menos de 300 colonias sin poder contar alguna colonia azul, expresar los resultados como sigue:

- Menos que $1/d_2$ UFC *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g.

Dónde: d_2 es el factor de dilución correspondiente a la segunda dilución.

Por ejemplo: Para la dilución 1:10 se cuentan más de 300 colonias de las cuales no se distinguen las colonias típicas de las atípicas y en la dilución 1:100 se cuentan 35 colonias; sin ninguna colonia típica azul.

Entonces se tiene $< 1/1:100$ por lo tanto reportar como: < 100 UFC/g o mL de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

J.7.3 CALCULOS PARA CASOS ESPECIALES.

J.7.3.1 En el caso donde el número de UFC típicas azules es mayor de 150 para el duplicado de la primera dilución d_1 y con un número menor de 15 UFC para el duplicado de la segunda dilución d_2 :

- Si la cuenta de UFC típicas azules en cada uno de los duplicados de la primer dilución se encuentra dentro del rango de 150 a 167 (siendo el límite superior del intervalo de confianza de una media igual a 150), utilizar la fórmula del caso J.7.1:
- Si la cuenta de colonias típicas azules en cada una de las placas por duplicado de la dilución d_1 es mayor que 167 (siendo el límite superior del intervalo de confianza de una media igual a 150), se TOMARÁ EN CUENTA SÓLO el resultado de las cuentas de d_2 (la mayor dilución) y aplicar la fórmula para cuentas bajas del punto J.7.2.

J.7.3.2 En el caso donde la cuenta de colonias típicas azules en cada una de las placas, de cada dilución sea mayor a 150, expresar el resultado como sigue:

- Mayor que $150/d_2$ *E. coli* β -glucuronidasa positiva/mL o g.

Donde d_2 es el factor de dilución para la última dilución inoculada (la mayor dilución).

Por ejemplo:

Dilución 1:10

Placa 1: >150 colonias típicas azules Placa 2: >150 colonias típicas azules.

Dilución 1:100

Placa 1: 162 colonias típicas azules Placa 2: 186 colonias típicas azules

Entonces se tiene $> 150\text{UFC}/0.01$ por lo tanto reportar como:

$> 15\ 000\text{UFC/g}$ o mL de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

* Valor estimado

J.7.3.3 En el caso donde sólo el duplicado de la más baja dilución (o alta concentración de muestra) contiene menos de 150 colonias típicas azules, calcular el número de *E. coli* β -glucuronidasa positiva presente en la muestra de prueba como la media aritmética del total de colonias de las dos placas, utilizando la siguiente ecuación:

$$N' = \frac{\Sigma c}{(V)(n)(d)}$$

Donde:

$\sum C$ = Es la suma de las UFC típicas de las dos placas, de las cuales al menos una contiene 15 UFC típicas.

V = Es el volumen del inóculo, en mL para cada placa.

n = Es el número de placas Petri utilizadas en el recuento ($n=2$ en este caso).

d = Es el factor de dilución de la suspensión inicial o la primera dilución inoculada.

Redondear el resultado a dos cifras significativas.

Por ejemplo:

10^{-1} = Placa 1: 85 colonias Placa 2: 76 colonias

10^{-2} = Placa 1: 0 colonias Placa 2: 0 colonias

$$N' = \frac{85+76}{(1\text{mL})(2)(0.1)}$$

$N' = 161/0.2 = 805\text{UFC/g} \approx 800 \text{ UFC/g}$ de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

J.8 FORMULACIONES Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

J.8.1 TBX.

J.8.1.1 Composición.

Digerido Enzimático de Caseína (Tryptona)	20.0g
Sales biliares no. 3.	1.5g
X-glucuronido	0.075g
Agar	de 9g a 18g ^a
Agua	1000mL

^a Dependiendo de la fuerza del agar.

J.8.1.2 Preparación.

Disolver el X-glucoronido en el diluyente recomendado por el fabricante. Disolver todos los componentes en agua y calentar a ebullición.

Ajustar el pH, si es necesario, para que después de la esterilización éste se encuentre en 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Esterilizar el medio en la autoclave a 121°C por 15min. Inmediatamente enfriar el medio en un baño de agua mantenido de 44°C a 47°C .

J.8.2 AGUA PEPTONADA AMORTIGUADA

J.8.2.1 Fórmula.

Digerido enzimático de caseína (triptona)	10.0g
NaCl	5.0g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9.0g
KH_2PO_4	1.5g
Agua	1 000mL

J.8.2.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C . Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria para obtener las porciones de prueba. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C .

DOF: 12/07/2005

NORMA Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-230-SSA1-2002, SALUD AMBIENTAL. AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO. REQUISITOS SANITARIOS QUE SE DEBEN CUMPLIR EN LOS SISTEMAS DE ABASTECIMIENTO PUBLICOS Y PRIVADOS DURANTE EL MANEJO DEL AGUA. PROCEDIMIENTOS SANITARIOS PARA EL MUESTREO.

ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3 fracciones XIV y XV, 13 Apartado A fracciones I, IV, V, IX y X, 17 bis, 116, 118 fracciones II, IV, V y VII, 119 fracción II, 122, 132, 194, 207, 393, 394, 395, 396 fracción I, 399 y demás aplicables de la Ley General de Salud; 38, 40 fracciones III, VII y XI, 41, 43, 46, 47 y 51 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 12 y 13 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 2, literal C fracción X del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 2 fracciones I y III, 7 y 12 fracción VI del Decreto Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios, me permito ordenar la publicación en el **Diario Oficial de la Federación**, de la Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.

CONSIDERANDO

Que con fecha 4 de noviembre de 2002, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Salud Ambiental presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 1 de agosto de 2003, en cumplimiento del Acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentarán sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha previa, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente: Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.

PREFACIO

En la elaboración del presente proyecto participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

SECRETARIA DE SALUD Dirección General de Salud Ambiental Dirección General de Calidad Sanitaria de Productos y Servicios Laboratorio Nacional de Salud Pública Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica

SERVICIO DE SALUD TLAXCALA

DIRECCION GENERAL DE CONSTRUCCION Y OPERACION HIDRAULICA/GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL

SERVICIOS DE SALUD PUBLICA DEL DISTRITO FEDERAL

COMPOSITES TECHNOLOGY

PROVIDA INMUNIZADA

INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION (CANACINTRA)

SECRETARIA DE ENERGIA/COMISION NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR Y SALVAGUARDAS

IDEXX LABORATORIES, S. DE RI DE C.V.

COMISION NACIONAL DE AGUA

COMTECH

PROVINZA

INDICE

- 0. Introducción
- 1. Objetivo y campo de aplicación
- 2. Referencias
- 3. Definiciones
- 4. Símbolos y abreviaturas
- 5. Especificaciones
- 6. Control sanitario y medidas preventivas
- 7. Procedimientos sanitarios para el muestreo
- 8. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
- 9. Bibliografía
- 10. Observancia de la norma
- 11. Vigencia

0. Introducción

La vigilancia de la calidad del agua es fundamental para reducir los riesgos de transmisión de enfermedades a la población por su consumo, como las de tipo gastrointestinal y las producidas por contaminantes tóxicos; esta vigilancia se ejerce a través del cumplimiento de los límites permisibles de calidad del agua y complementariamente, inspeccionando que las características de las construcciones, instalaciones y equipos de las obras hidráulicas de captación, plantas cloradoras, plantas de potabilización, tanques de almacenamiento o regulación, líneas de conducción, redes de distribución, cisternas de vehículos para el transporte y distribución y tomas domiciliarias protejan el agua de contaminación. El resultado de la verificación e inspección de las características mencionadas, se evalúa comparando las condiciones que presentan los sistemas de abastecimiento, con los requisitos sanitarios que permiten preservar la calidad del agua.

En el caso de obras nuevas, la selección del sitio de ubicación y su protección, tienen importancia vital para el abastecimiento de agua segura. Proteger el agua de la contaminación, siempre será preferible a proporcionarle tratamiento cuando ya está contaminada.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece los requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua, para preservar la calidad del agua para uso y consumo humano, así como los procedimientos sanitarios para su muestreo.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y es aplicable a todos los organismos operadores de los sistemas de abastecimiento público y privado o cualquier persona física o moral que realice el manejo del agua para uso y consumo humano.

2. Referencias

2.1 NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida.

2.2 Modificación a la NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua para uso y consumo humano Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

2.3 NOM-179-SSA1-1998 Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuido por sistemas de abastecimiento público.

2.4 NOM-026-STPS-1998 Colores y señales de seguridad e higiene e identificación de riesgos por fluidos conducidos en tuberías.

2.5 NOM-018-STPS-2000 Sistemas para la identificación y comunicación de peligros y riesgos para sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.

2.6 NOM-201-SSA1-2002 Productos y Servicios. Agua y hielo para consumo humano preenvasados y a granel. Especificaciones sanitarias.

3. Definiciones

Para propósitos de esta Norma se aplican las definiciones siguientes:

3.1 ademe: al tubo generalmente metálico o de policloruro de vinilo (PVC), de diámetro y espesor definido, liso o ranurado cuya función es evitar el derrumbe o colapso de las paredes del pozo que afecten la estructura integral del mismo; en su porción ranurada permite el flujo del agua hacia los elementos mecánicos de impulsión de la bomba.

3.2 agua para uso y consumo humano: aquella que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.

3.3 agua superficial: aquella que fluye sobre la superficie del terreno, o se almacena en embalses, sean naturales o artificiales.

3.4 bitácora: Libro de registro foliado para registrar datos de las actividades de higiene y control sanitario, en pozos y sistemas de abastecimiento, almacenamiento, potabilización, conducción de agua para uso y consumo humano.

3.5 brocal: base de concreto perimetral al ademe del pozo, colocada en el extremo superior del mismo.

3.6 caja colectora: depósito que sirve para la captación, almacenamiento y distribución de agua que proviene de fuentes de almacenamiento.

3.7 cisterna: depósito o recipiente, que se instala sobre un vehículo para transportar y distribuir agua para uso y consumo humano.

3.8 contraademe: tubería, generalmente de acero, utilizada en la ampliación de la parte superior de un pozo, cuya función es evitar derrumbes, entradas de aguas superficiales e infiltraciones que contaminen el acuífero.

3.9 contracuneta: extensión de talud de la cuneta revestida de concreto, la cual se construye para proteger a ésta de deslaves.

3.10 cuneta: zanja de desagüe de la precipitación pluvial, revestida de concreto.

3.11 desinfección: destrucción de organismos patógenos por medio de la aplicación de productos químicos o procesos físicos.

3.12 estación de bombeo o rebombeo: conjunto de estructuras y equipos que sirven para aumentar la presión del agua con el fin de elevarla a niveles más altos o para mantener uniforme la presión en las redes de distribución.

3.13 grifo o válvula, instrumento o accesorio con manivela que al ser accionado abre, regula y cierra el flujo de agua en su punto de salida.

3.14 manejo del agua: es la acción de captación, conducción, almacenamiento, regulación, potabilización y distribución del agua, así como su transporte mediante cisternas.

3.15 mantenimiento: a las acciones de lavado, desinfección y conservación de los sistemas de abastecimiento y cisternas.

3.16 material sanitario: al que es liso, fácil de lavar, desinfectar, no absorbente, inerte, que no ceda sustancias tóxicas.

3.17 muestreo: a las actividades desarrolladas para obtener volúmenes de agua en sitios seleccionados del sistema de abastecimiento, de tal manera que sean representativos de éste, con el propósito de evaluar características físicas, químicas, microbiológicas y radiactivas.

3.18 obra de captación: estructura que sirve para extraer el agua de las fuentes de abastecimiento superficiales o subterráneas.

3.19 organismo operador: instancia responsable de operar, mantener y administrar el sistema de abastecimiento.

3.20 parámetro: a la característica del agua que se evalúa o mide.

3.21 planta de potabilización: conjunto de estructuras, instalaciones, procesos y operaciones que sirven para mejorar la calidad del agua, haciéndola apta para uso y consumo humano.

3.22 plantilla: losa de concreto perimetral al brocal para protección superficial del pozo.

3.23 pozo: obra de ingeniería en la que se utilizan maquinarias y herramientas mecánicas para su construcción y que permite extraer agua del subsuelo, con fines de abastecimiento de agua para uso y consumo humano, en sistemas públicos y privados.

3.24 preservación de la muestra: al proceso y medidas por los cuales, se reducen al mínimo los cambios de las características de la muestra durante el tiempo que transcurre entre el muestreo y el análisis.

3.25 punto de muestreo: posición precisa en una zona determinada donde son tomadas las muestras.

3.26 red de distribución: conjunto de tuberías que sirve para llevar el agua hasta el usuario.

3.27 registro: abertura con tapa que permite la entrada de personal para acciones de limpieza y mantenimiento.

3.28 requisitos sanitarios de los sistemas de abastecimiento: características que deben cumplir las construcciones, instalaciones y equipos que los integran, para proteger el agua de contaminación.

3.29 rompeolas: mamparas fijas en el interior de la cisterna, colocadas transversal y verticalmente para evitar movimientos violentos de agua.

3.30 sistema de abastecimiento de agua: conjunto de elementos integrados por las obras hidráulicas de captación, conducción, potabilización, desinfección, almacenamiento o regulación y distribución.

3.31 sardinel: estructura en el borde superior del registro donde descansa la tapa.

3.32 tanque de almacenamiento o regulación: depósito superficial o elevado que sirve para almacenar el agua o regular su distribución.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

cm	Centímetro
HCl	Acido clorhídrico
HNO ₃	Acido nítrico
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
L	Litros
m	Metros
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de sodio
pH	Potencial de Hidrógeno
%	Por ciento
°C.	Grado centígrado
<	Menor que

5. Especificaciones

5.1 Para pozos:

Deben de contar con la protección sanitaria siguiente:

5.1.1 El ademe debe sobresalir cuando menos 0.50 m por encima del nivel del terreno natural o sobreelevado.

5.1.2 El contraademe debe sobresalir 0.20 m, del nivel del terreno natural o sobreelevado, o bien 0.50 m, dependiendo del diseño del pozo. El espacio anular entre el contraademe y la formación adyacente será rellenado por completo con una lechada de cemento normal.

5.1.3 Brocal, cuyo tipo y dimensiones serán de acuerdo al diseño del pozo.

5.1.4 Plantilla alrededor del pozo que debe construirse con una pendiente del 2%.

5.2 Para sistemas de abastecimiento de agua, público o privado:

5.2.1 Las obras de captación, tanques de almacenamiento o regulación, plantas potabilizadoras y estaciones de bombeo, deben protegerse mediante cercas de malla de alambre o muros que impidan la introducción de desechos sólidos, líquidos o excretas y el paso de animales. La obra de captación debe mantenerse libre de malezas permanentemente.

5.2.3 El acceso a las obras de captación, tanques de almacenamiento o regulación, plantas potabilizadoras y estaciones de bombeo, deben protegerse con bardas y puertas con cerraduras, candados o sistemas de seguridad y permitir la entrada únicamente a personal autorizado.

5.2.4 En función de las características de construcción las obras de captación, tanques de almacenamiento, regulación y estaciones de bombeo, deben protegerse de contaminación exterior debida a escurrimientos o infiltraciones de agua u otros vectores, mediante lo siguiente:

5.2.4.1 Losa de concreto, cunetas, contracunetas o canales de desviación, ubicadas en el perímetro de la instalación.

5.2.4.2 Sellos impermeables en juntas y uniones de tuberías, equipos y sus accesorios, así como resane e impermeabilización de fisuras o fracturas en estructuras que contengan agua, y

5.2.4.3 Tela tipo mosquitero o similar, en dispositivos de ventilación rejillas, tubos u otros ductos.

5.2.5 Las áreas interiores de estaciones de bombeo y plantas potabilizadoras deben mantenerse siempre aseadas. Se deben limpiar y desinfectar con la frecuencia que determinen las condiciones del sistema, equipo y proceso de manera que se eliminen los riesgos asociados.

5.2.6 Las tuberías que conducen agua en las distintas etapas del proceso o fluidos diferentes de ésta, se deben identificar de acuerdo con el código propio de la empresa. Cualquier forma y código de identificación debe ser visible para el personal.

5.2.7 Las instalaciones destinadas al almacenamiento y aplicación de desinfectantes, sea cloro, compuestos de cloro u otros productos químicos, se deben mantener con el piso seco y ventilación adecuada que permita circulación cruzada del aire. Se debe evitar el almacenamiento de productos ajenos a la potabilización.

5.2.8 Los tanques de almacenamiento o regulación y estaciones de bombeo para abastecer agua directamente a la red de distribución, deben contar con los siguientes dispositivos:

5.2.8.1 Ductos de ventilación en forma de u o de codo invertido, de tal manera que la entrada-salida del aire apunte hacia el suelo.

5.2.8.2 Caja colectora de sedimentos dependiendo de sus características.

5.2.8.3 Registros de acceso con tapa envolvente al sardinel que impidan escurrimientos al interior del tanque, y

5.2.8.4 Tubos para desfogue.

5.2.9 Las paredes interiores de los tanques de almacenamiento o regulación, los cárcamos de bombeo, las cajas colectoras o repartidoras deben ser o estar recubiertos de material sanitario. Debe existir un programa de limpieza que garantice la preservación de la calidad del agua. La limpieza debe incluir la extracción de sólidos sedimentados y remoción de materiales incrustados. Se deben limpiar y desinfectar las paredes y piso con la frecuencia que determinen las condiciones del tanque de manera que se eliminen los riesgos asociados.

5.2.10 En los casos de nuevos proyectos de redes de distribución, ampliaciones o rehabilitaciones deben eliminarse los extremos terminales o muertos.

5.3 Para cisterna para el transporte y distribución de agua:

5.3.1 La cisterna debe recibir su carga de fuentes o líneas de distribución del sistema de abastecimiento de agua, público o privado.

5.3.2 La cisterna debe cumplir con los siguientes requisitos sanitarios:

5.3.2.1 Las paredes internas y rompeolas de la cisterna deben ser o revestirse con material resistente a la oxidación y corrosión.

5.3.2.2 La cisterna debe contar con registro que permita el acceso de una persona al interior de la misma, para efectuar el mantenimiento; en el caso que los rompeolas formen compartimientos separados, cada uno de ellos debe tener registro de acceso.

5.3.2.3 Para el vaciado completo la cisterna debe contar con válvula o dispositivo de salida de cierre hermético en el fondo.

5.3.2.4 El dispositivo del registro para la ventilación de la cisterna, no debe permitir derrames de agua o introducción de material extraño.

5.3.2.5 Para la distribución del agua, la cisterna debe contar con válvula de salida de cierre hermético y manguera de distribución flexible y de material inerte al agua.

5.3.2.6 La manguera de distribución debe encontrarse en buenas condiciones, sin presentar fugas, evitándose en todo momento el contacto de sus extremos con el piso.

5.3.2.7 Las conexiones entre la cisterna, válvula y manguera de distribución no deben presentar fugas de agua.

5.3.2.8 Si la cisterna cuenta con bomba para la distribución de agua, la misma no debe presentar fugas de combustible o lubricantes.

5.3.2.9 Al terminar la operación de llenado, se debe mantener cerrada la cisterna de un vehículo hasta realizar nuevamente la operación de llenado.

5.3.3 La cisterna debe utilizarse exclusivamente para el transporte de agua para uso y consumo humano, asimismo, debe mantenerse limpia y ostentar en el exterior de la cisterna y en ambos lados, con letras y números grandes, visibles y en color contrastante lo siguiente:

5.3.3.1 La leyenda Agua Potable.

5.3.3.2 Clave asignada por el organismo operador a conformada por siglas del organismo operador y número secuencial.

5.3.3.3 Identificación de la persona o personas encargadas de la distribución (nombre, dirección y teléfono).

5.3.4 El organismo operador de la cisterna debe exhibir copia de la bitácora del último mantenimiento y desinfección efectuados a la cisterna, así como de los resultados de los últimos análisis físicos, químicos y microbiológicos, a solicitud de la autoridad sanitaria competente.

6. Control sanitario y medidas preventivas

6.1 Para efectos de verificación oficial la determinación de cloro residual libre debe efectuarse con un comparador con características mínimas de medición a través de escala colorimétrica, entre los valores obligatorios de 0.2 a 1.5 mg/L, con marcas de comparación en los valores de 0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 mg/L, utilizando reactivo DPD (dialquil-1,4-fenilendiamina o N,N-dietil -p-fenilendiamina).

6.2 Sistemas de abastecimiento de agua, público y privado:

6.2.1 No deben considerarse como fuentes de abastecimiento para uso y consumo humano, aquellas que por el tipo, magnitud y toxicidad de sus componentes físicos, químicos y microbiológicos presentes, sean potencialmente un riesgo a la salud humana, a menos que se realice tratamiento para su potabilización.

6.2.2 Debe preservarse la calidad microbiológica del agua en cualquier parte del sistema hasta en los puntos más alejados de la red de distribución, mediante la desinfección continua y permanente del agua.

6.2.3 Cuando se presenten interrupciones del suministro, debidas a fallas mecánicas, eléctricas, por mantenimiento o de cualquier otra causa, al restablecimiento del servicio se debe reforzar la desinfección.

6.2.4 En los casos de obra nueva de almacenamiento, conducción y distribución, o en el caso de mantenimiento preventivo o correctivo de cualquier elemento del sistema de abastecimiento, debe limpiarse y desinfectarse antes de iniciar su operación.

6.2.5 Las acciones de limpieza, drenado y desinfección deben registrarse en una bitácora y estar disponibles cuando la autoridad sanitaria competente los requiera. Esta disposición es obligatoria para todos los sistemas de abastecimiento. Esta bitácora debe conservarse por lo menos durante un año.

6.3 Para cisternas para el transporte y distribución de agua:

El organismo operador de la cisterna debe cumplir con los siguientes requisitos:

6.3.1 Bitácora, la cual debe contener la siguiente información:

6.3.1.1 Clave de identificación de la cisterna.

6.3.1.2 Reporte de los resultados de las determinaciones de cloro residual libre, por zona de distribución, en el que se incluya: fecha y nombre de la persona que realiza el servicio.

6.3.1.3 Reporte del mantenimiento en el que se incluya: fecha y responsable de este servicio.

6.3.1.4 Tipo y localización de la(s) fuente(s) de abastecimiento o línea(s) de distribución de agua potable, donde se surte la cisterna.

6.3.1.5 Zonas de distribución de agua, y

6.3.1.6 Volumen diario de agua distribuido.

7. Procedimientos sanitarios para el muestreo

Este Apartado establece los procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en los sistemas de abastecimiento y cisternas para el transporte y distribución, público y privado, incluyendo características microbiológicas, físicas, químicas y radiactivas, así como criterios para manejo, preservación y transporte de muestras. El procedimiento de muestreo debe iniciar con la toma de muestras para análisis microbiológico.

7.1 Material, reactivos y equipo de muestreo.

7.1.1 Envases para toma de muestra.

7.1.1.1 Para análisis microbiológico.- Frascos de vidrio con tapón esmerilado, frascos estériles desechables o bolsas estériles con cierre hermético y capacidad de 125 o 250 mL.

7.1.1.2 Para análisis de metales.- Envase y tapa de plástico, adicionados de 1 mL de ácido nítrico concentrado por cada 100 mL de muestra.

Para análisis de plaguicidas.- Envase de vidrio color ámbar o transparente cubierto de papel aluminio.

7.1.1.3 El material del envase, así como el volumen de muestra requerido y el método de preservación para la determinación de los diferentes parámetros, deben ser los señalados en la Tabla 1.

7.1.2 Termómetro que permita mediciones en un intervalo de -1 a 50°C con graduación de 1°C.

7.1.3 Potenciómetro portátil o comparador visual para determinación de pH.

7.1.4 Colorímetro portátil o comparador visual para determinación de cloro residual.

7.1.5 Hielera con tapa.

7.1.6 Bolsas refrigerantes o bolsas con hielo cerradas.

7.1.7 Agua destilada o desionizada.

7.1.8 Solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 100 mg/L.

7.1.9 Gasas o torundas de algodón, estériles.

7.1.10 Equipos muestreadores comerciales.

7.2 Preparación de envases para toma de muestras.

Los recipientes para la toma de muestras, deberán ser proporcionados con hoja de cadena de custodia por el laboratorio responsable del análisis, para análisis microbiológico o físico y químico, ya que deberá ser lavado y con la preparación adecuada para el análisis general o particular de los parámetros seleccionados.

7.2.1 Para análisis microbiológico.

7.2.1.1 Esterilización de frascos para muestras de agua sin cloro residual libre.

Deben esterilizarse frascos de muestreo en estufa a 170°C, por un tiempo mínimo de 60 min. o en autoclave a 120°C durante 15 min antes de la esterilización debe cubrirse el tapón del frasco con papel resistente a ésta, en forma de capuchón

7.2.1.2 Esterilización de frascos para muestras de agua con cloro residual libre.

Previo a la esterilización agregar 0.1 mL de tiosulfato de sodio al 3% por cada 120 mL de capacidad de los mismos. A continuación proceder como se indica en el numeral 6.2.1.1.

7.2.1.3 La colecta de muestras con alto contenido de metales, incluyendo cobre o zinc (mayor a 1.0 mg/L) los frascos para el muestreo deben contener 0.3 mL de solución de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 15 por ciento (ajustar el pH de la solución a 6.5 antes de su uso) en frasco de 120 mL de capacidad adicionar por separado al frasco de muestreo antes de la esterilización o combinarse con la solución de tiosulfato de sodio antes de la adición.

7.2.2 Para análisis físicos, químicos y radiactivos, de acuerdo a los parámetros a determinar, considerar lo especificado en la tabla 1 del numeral 7.7.

7.3 Procedimiento para toma de muestra.

Para análisis microbiológico, utilizar frascos de vidrio, frascos estériles o bolsas estériles con cierre hermético y capacidad de 125 mL o 250 mL.

7.3.1 Para análisis microbiológico.**7.3.1.1 En bomba de mano o grifo o válvula.**

El agua de los grifos o válvulas debe provenir directamente del sistema de distribución. No debe efectuarse toma de muestra en grifos o válvulas que presenten fugas entre el tambor y el cuello, ya que el agua puede correr por la parte exterior del grifo o válvulas y contaminar la muestra. Deben removerse los accesorios o aditamentos externos como mangueras, boquillas y filtros de plástico o hule antes de tomar la muestra.

7.3.1.1.1 Si la limpieza del grifo o válvulas seleccionado es dudosa elegir otro grifo o válvula. Si se requiere tomar la muestra en el grifo o válvulas de dudosa limpieza por propósitos especiales del muestreo, debe limpiarse el orificio de salida con una gasa estéril o torunda de algodón impregnada de solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 100 mg/L. Adicionalmente cuando el material y las condiciones del punto de salida lo permitan se podrá calentar a flama directa y posteriormente limpiarse con alcohol.

7.3.1.1.2 Debe dejarse correr el agua aproximadamente 3 min. hasta asegurarse que el agua que contenían las tuberías ha sido renovada o que la temperatura del agua sea estabilizada antes de tomar la muestra. Reducir el volumen de flujo para permitir el llenado del frasco sin salpicaduras.

7.3.1.1.3 Colocarse los guantes y cubreboca.

7.3.1.1.4 Cerca del orificio de salida, en el caso de frascos de vidrio con tapón esmerilado y protegidos con papel, deben quitarse simultáneamente el tapón del frasco y el papel de protección, manejándolos como unidad, evitando que se contaminen el tapón, el papel de protección, o el cuello del frasco. Para lo anterior es necesario sostener el tapón o tapa con el esmeril o rosca hacia abajo; en el caso de frascos estériles desechables desprender y eliminar el sello de seguridad y mantener la tapa con la rosca hacia abajo; para el caso de uso de bolsas estériles desprender y eliminar el sello de seguridad de la bolsa.

7.3.1.1.5 Proceder a tomar la muestra sin pérdida de tiempo y sin enjuagar el frasco; se debe dejar el espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis (aproximadamente 10% de volumen del frasco). Efectuada la toma de muestra, deben colocarse el tapón con el papel de protección o la tapa al frasco; en el caso de las bolsas proceder al cerrado hermético.

7.3.1.2 En captación de un cuerpo de agua superficial o tanque de almacenamiento.**7.3.1.2.1 Deben lavarse manos y antebrazos con agua y jabón, y colocarse guantes y cubreboca.**

7.3.1.2.2 En el caso de frascos de vidrio con tapón esmerilado quitar únicamente el papel de protección evitando que se contamine, y en el caso de frascos y bolsas estériles desechables, desprender el sello de seguridad.

7.3.1.2.3 Sumergir el frasco en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad de 15 a 30 cm, destapar y a continuación girar el frasco ligeramente permitiendo el llenado (en todos los casos debe evitarse tomar la muestra de la capa superficial o del fondo, donde puede haber nata o sedimento y en el caso de captación en cuerpos de agua superficiales, no deben tomarse muestras muy próximas a la orilla o muy distantes del punto de extracción); si existe corriente en el cuerpo de agua, la toma de muestra debe efectuarse con la boca del frasco a contracorriente. Efectuada la toma de muestra debe colocarse el tapón o tapa, sacar el frasco del agua y colocar el papel de protección en su caso. Para el caso en el que se utilice bolsa, sumergirla a la profundidad arriba indicada. Tomar la muestra y cerrar la bolsa bajo el agua, posteriormente sellar ésta fuera del agua.

En el caso de tanques de almacenamiento, si no es posible la toma de muestra como se indica en este punto, debe procederse como se menciona en 7.3.1.4.

7.3.1.3 En pozo profundo.

7.3.1.3.1 Si el pozo cuenta con grifo o válvula para toma de muestra, debe procederse como se indica en el numeral 7.3.1.1.

7.3.1.3.2 Si el pozo no cuenta con grifo o válvula para toma de muestra, debe abrirse la válvula de una tubería de desfogue, dejarse correr el agua por un mínimo de 3 min. y a continuación se procede como en 7.3.1.1.3 y 7.3.1.1.4.

7.3.1.4 En pozo somero o fuente similar.

7.3.1.4.1 Cuando no es posible tomar la muestra con la extensión del brazo, debe atarse al frasco un sobrepeso usando el extremo de un cordel limpio, o en su caso equipo muestreador comercial.

7.3.1.4.2 Deben quitarse simultáneamente el tapón y el papel de protección, de acuerdo a lo estipulado en el numeral 7.3.1.1.4.

7.3.1.4.3 Proceder a tomar la muestra, bajando el frasco dentro del pozo hasta una profundidad de 15 a 30 cm, evitando que el frasco toque las paredes del pozo.

7.3.1.4.4 Efectuada la toma de muestra, deben colocarse la tapa o el tapón con el papel de protección al frasco, o en su caso sellar la bolsa.

7.3.1.5 En grifo o válvula de muestreo o boca de manguera de distribución de cisterna de vehículo:

7.3.1.5.1 Si la toma de muestra se efectúa en grifo, válvula de descarga o boca de la manguera, proceder como se indica en el numeral 7.3.1.1.

7.3.2 Para análisis físico, químico y radiactivo.

El volumen de muestra debe tomarse como se indica en la Tabla 1 de este Apartado.

7.3.2.1 En bomba de mano o grifo o válvula del sistema de distribución o pozo profundo.

7.3.2.1.1 Debe dejarse correr el agua aproximadamente por 3 min. o hasta que la temperatura de la muestra sea estable antes de la toma o hasta asegurarse que el agua contenida en la línea ha sido renovada.

7.3.2.1.2 El muestreo debe realizarse cuidadosamente, evitando que se contaminen el tapón, boca e interior del envase; se requiere tomar un poco del agua que se va a analizar, se cierra el envase y agitar fuertemente para enjuagar, desechando esa agua; se efectúa esta operación dos o tres veces, procediendo enseguida a la toma de muestra.

7.3.2.2 En captaciones de agua superficial, tanque de almacenamiento, pozo somero o fuente similar, debe manejarse el envase siguiendo las indicaciones comprendidas en 7.3.1.2.1. y 7.3.1.2.3.

7.4 Manejo de muestras.

7.4.1 Las muestras tomadas deben colocarse en hielera con bolsas refrigerantes o bolsas de hielo cerradas para su transporte al laboratorio, a una temperatura entre 4 y 10°C, cuidando de no congelar las muestras. El hielo utilizado debe cumplir con las especificaciones establecidas en la NOM-201-SSA1-2002, señalada en el Apartado de referencias.

7.4.2 El periodo máximo que debe transcurrir entre la toma de muestra y el inicio del análisis es:

7.4.2.1 Para análisis microbiológico en óptimas condiciones de preservación y transporte hasta 6 horas.

7.4.2.2 Para análisis físicos, químicos y radiactivos el periodo depende de la preservación empleada para cada parámetro como se indica en la Tabla 1 del numeral 7.7.

7.5 Identificación y control de muestras.

7.5.1 Para la identificación de las muestras deben etiquetarse los frascos y envases con la siguiente información:

7.5.1.1 Número de control para identificar la muestra, independientemente del número de registro del laboratorio.

7.5.1.2 Fecha y hora de muestreo.

7.5.2 Para el control de la muestra debe llevarse un registro en formato establecido previamente con los datos anotados en la etiqueta del frasco o envase, así como la siguiente información:

7.5.2.1 Identificación del punto o sitio de muestreo.

7.5.2.2 Temperatura del agua.

7.5.2.3 pH.

7.5.2.4 Cloro residual libre.

7.5.2.5 Tipo de análisis a efectuar.

7.5.2.6 En su caso, reactivo empleado para la preservación.

7.5.2.7 Observaciones relativas a la toma de muestra, en su caso, de preferencia en situaciones de muestras especiales provenientes de alguna contingencia o evento ocasional.

7.5.2.8 Nombre de la persona que realizó el muestreo.

7.6 Selección de puntos de muestreo.

La selección de puntos de muestreo debe considerarse para cada sistema de abastecimiento en particular. Sin embargo, existen criterios que deben tomarse en cuenta para ello. Estos criterios son:

7.6.1 Los puntos de muestreo deben ser representativos de las diferentes fuentes de agua que abastecen el sistema.

7.6.2 Debe haber una distribución uniforme de los puntos de muestreo a lo largo del sistema y, en su caso, considerar los lugares más susceptibles de contaminación:

7.6.2.1 Puntos muertos.

7.6.2.2 Zonas de baja presión.

7.6.2.3 Zonas con antecedentes de problemas de contaminación.

7.6.2.4 Zonas con fugas frecuentes.

7.6.2.5 Zonas densamente pobladas y con alcantarillado insuficiente.

7.6.2.6 Tanques de almacenamiento abiertos y carentes de protección, y

7.6.2.7 Zonas periféricas del sistema más alejadas de las instalaciones de tratamiento.

7.6.3 Los puntos se localizarán dependiendo del tipo de sistemas de distribución y en proporción al número de ramales.

7.6.4 Debe haber como mínimo un punto de muestreo inmediatamente a la salida de las plantas de tratamiento, en su caso.

7.7 Preservación de muestras.

Tabla 1. Preservación de muestras

DETERMINACION	MATERIAL DE ENVASE	VOLUMEN MINIMO (mL)	PRESERVACION	TIEMPO MAXIMO DE ALMACENAMIENTO
Cianuros	p, v	1000	Adicionar NaOH a pH>12; refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	24 horas
Cloro residual	p, v	50	Analizar inmediatamente	
Cloruros	p, v	200	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	48 horas
Color	p, v	500	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	48 horas
Dureza total	p, v	100	Adicionar HNO ₃ o H ₂ SO ₄ a pH<2 (*)	14 días
Fenoles	p, v PTFE	500	Adicionar H ₂ SO ₄ a pH<2 y refrigerar de 4 a 10°C	Analizar tan pronto sea posible
Fluoruros	P	500	Refrigerar de 4 a 10°C	28 días
Hidrocarburos aromáticos (BTEX)	S	25	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	7 días
Metales en general	p, v (A)	1000	Adicionar 1 mL de ácido nítrico concentrado por cada 100 mL de muestra.	180 días Sólo para la determinación de mercurio almacenar por un máximo de 4 semanas
Nitratos	p, v	100	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	48 horas
Nitritos	p, v	100	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	
Nitrógeno amoniacal	p, v	500	Adicionar H ₂ SO ₄ a pH<2 y refrigerar de 4 a 10°C	7 días
Olor	V	500	Analizar tan pronto como sea posible. Refrigerar	6 hrs.
pH	p, v	50	Analizar inmediatamente	
Plaguicidas	s	1000	Refrigerar de 4 a 10°C.	7 días Extraídos los plaguicidas con solventes el tiempo de almacenamiento máximo será de 40 días
Radiactividad alfa global	p,v	1000	Adicionar HCl o HNO ₃ a pH <2.	180 días
Radiactividad beta global	p,v	1000	Adicionar HCl o HNO ₃ a pH <2.	180 días
Sólidos	p, v	200	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	7 días
Sodio	p, v	100	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	18 días
Sulfatos	p, v	100	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	28 días
Sustancias Activas al Azul de Metileno	p, v	250	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	48 horas
Temperatura	p, v		Determinar inmediatamente	
Trihalometanos	S	25	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	7 días
Turbiedad	p, v	100	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	24 horas
Yodo	v (ámbar)	50	Analizar inmediatamente	

*Omitir la preservación en caso de que la muestra se analice inmediatamente.

p - plástico

p(A) enjuagado con HNO₃ 1+1

pH - potencial de hidrógeno

s - vidrio enjuagado con solventes orgánicos; interior de la tapa del envase recubierta con teflón

v - vidrio

v(A) - enjuagado con HNO₃ 1+1

PTFE - tapa de politetrafluoroetileno

BTEX - benceno, tolueno, etilbenceno, xileno

1.- Para que la muestra no sea insuficiente, en las determinaciones de cloro residual, nitratos, nitrógeno amoniacal, ph sólidos, sustancias activas al azul de metileno, turbiedad y yodo, se recomienda que el volumen mínimo se multiplique por 4 para que el laboratorio tenga la posibilidad de realizar en caso necesario, una repetición.

2.- La preservación de la muestra en la determinación de dureza total, es exclusivamente para aguas contaminadas y residuales; ya que en aguas naturales no es necesario adicionar ácido como preservativo.

8. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional o mexicana.

9. Bibliografía

9.1 Comisión Nacional del Agua-Secretaría de Salud. 1996. Manual de Muestreo y Determinación de Cloro Residual Libre. Primera Edición. México, D.F.

9.2 Organización Mundial de la Salud. 1995. Guías para la Calidad del Agua Potable. Volumen 1. Recomendaciones. Segunda Edición. Ginebra. Págs. 26-30; 137-150; 183; 187.

9.3 SEMARNAP. 1992. Ley de Aguas Nacionales. **Diario Oficial de la Federación**-diciembre. México, D.F. Artículo 119 fracciones VI, VII, XIII.

9.4 SECOFI. 1992. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas - Proyecto de Revisión. México, D.F.

9.5 Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Comisión Nacional del Agua. SARH. 1991. Manual No. 6 1a. Edición. Págs. 10-11.

9.6 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**-18 de enero. México, D.F. Artículo 214 fracciones I y V, pág. 27; artículo 216, pág. 27; artículos 218, 222 y 224.

9.7 Francisco Unda Opazo. 1967. Ingeniería Sanitaria Aplicada a la Salud Pública. UTEHA. Santiago, Chile. Págs. 93-99; 176 -184.

9.8 APHA. AWWA. WPCF. Standard Methods for the Examination of Water of Wastewater.

10. Observancia de la Norma

La vigilancia del cumplimiento de esta Norma Oficial Mexicana corresponde a la Secretaría de Salud y a los Gobiernos de las Entidades Federativas en sus respectivos ámbitos de competencia y a los organismos de tercera parte habilitados para tal efecto.

11. Vigencia

11.1 La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatorio, a los sesenta días de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

11.2 La presente Norma cancela a las siguientes.

Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA1-1993. Requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua para uso y consumo públicos y privados.

Norma Oficial Mexicana NOM 013-SSA1-1993. Requisitos sanitarios que debe cumplir la cisterna de un vehículo para el transporte y distribución de agua para uso y consumo humano.

Norma Oficial Mexicana NOM -014-SSA1-1993. Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados.

México, D.F., a 25 de abril de 2005.- El Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Ernesto Enríquez Rubio**.- Rúbrica.

(Primera Sección) DIARIO OFICIAL Martes 12 de julio de 2005

Martes 12 de julio de 2005 DIARIO OFICIAL (Primera Sección)