

**NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas.**

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; 3 fracciones XIII y XXII, 17 Bis fracción III, 17 Bis 2, 116, 118 fracciones I, II y VII, 119 fracción II y 122 de la Ley General de Salud; 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2 literal C fracción X, 36 y 37 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 2 fracción I incisos a) y c), 12 fracciones II, IV y V, 227, 1219 y 1220 fracción IV del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 3 fracciones I incisos i y n, II, V, IX y XI; 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 Subcomité de Salud Ambiental presentó el 20 de agosto de 2009 al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha del 5 de abril de 2010, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de 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 de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha 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 los 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, tengo a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-245-SSA1-2010, REQUISITOS SANITARIOS Y CALIDAD DEL AGUA QUE DEBEN CUMPLIR LAS ALBERCAS**

**PREFACIO**

En la elaboración de esta norma participaron las unidades administrativas e instituciones siguientes:

SECRETARIA DE SALUD

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades.

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

Comisión Nacional del Agua.

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

SECRETARIA DE TURISMO

ASOCIACION MEXICANA DE HOTELES Y MOTELAS A. C.

ASOCIACION MEXICANA DE PARQUES ACUATICOS Y BALNEARIOS, A. C.

LION BUSINESS, S.A. DE C. V.

INSTAPURA, S. A. DE C. V.

## INDICE

- 0. Introducción
- 1. Objetivo y campo de aplicación
- 2. Referencias
- 3. Definiciones
- 4. Abreviaturas
- 5. Disposiciones Específicas
- 6. Control Sanitario
- 7. Muestreo y métodos de prueba
- 8. Concordancia con normas internacionales
- 9. Procedimiento de evaluación de la conformidad
- 10. Bibliografía
- 11. Observancia de la Norma
- 12. Vigencia

Apéndice Normativo A. Aislamiento e identificación de *Naegleria spp* y *Acanthamoeba spp*.

Apéndice Normativo B. Determinación de bacterias coliformes fecales. Método del número más probable (NMP).

### 0. Introducción

Con la finalidad de prevenir y minimizar riesgos a la salud pública por enfermedades gastrointestinales, de la piel y otras, ocasionadas por ingestión, contacto e inhalación de microorganismos patógenos y sustancias químicas en el agua de albercas, es necesario llevar a cabo el control y vigilancia de las condiciones sanitarias de operación y mantenimiento de las instalaciones; así como el monitoreo sistematizado de parámetros fisicoquímicos y de microorganismos que determinan la calidad del agua.

### 1. Objetivo y campo de aplicación

**1.1.** Esta norma establece las especificaciones sanitarias que deben cumplir las albercas con el propósito de minimizar o controlar riesgos a la salud de los usuarios.

**1.2.** Esta norma es aplicable a todas las albercas de centros vacacionales, clubes deportivos, balnearios, centros de enseñanza, hoteles, moteles, desarrollos turísticos, parques acuáticos o cualquiera que preste un servicio público.

### 2. Referencias

**2.1.** Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida.

### 3. Definiciones

Para los efectos de esta norma se entiende por:

**3.1. Alberca.-** Estanque artificial de agua construido para facilitar el nado, la recreación, el relajamiento, la enseñanza o entrenamiento deportivo.

**3.2. Bitácora.-** Libro, cuaderno o registro foliado a través de un sistema electrónico o manual.

**3.3. Biopelícula.-** Crecimiento de microorganismos en forma de capa gelatinosa que se adhiere a una superficie.

**3.4. Bromo residual libre.-** Es la cantidad residual de iones hipobromito y ácido hipobromoso.

**3.5. Bromaminas.-** Es la cantidad de bromo combinado con nitrógeno amoniacal o con compuestos nitrogenados.

**3.6. Circulación.-** Acción mecánica o aporte de agua que permite la mezcla y el movimiento del agua en todos los sectores de la alberca, evitando su estancamiento.

**3.7. Cloro residual libre.-** Es la cantidad residual de iones hipoclorito y ácido hipocloroso.

**3.8. Cloraminas.-** Es la cantidad de cloro combinado con nitrógeno amoniacal o con compuestos nitrogenados.

**3.9. Desinfección.-** Acción de inactivar o destruir microorganismos patógenos por medio de la aplicación de productos químicos o procesos físicos.

**3.10. Encauce.-** Obra dentro de un río o arroyo para modificar su corriente con el fin de construir una alberca.

**3.11. Equipo de medición de ORP.-** Dispositivo que mide el intercambio de electrones por medio de la corriente eléctrica generada por las reacciones de óxido-reducción; y que representa la concentración o actividad del desinfectante en el agua, expresado en milivoltios.

**3.12. Límite permisible.-** Valor máximo o intervalo de concentración de un parámetro, que no causa efectos nocivos a la salud.

**3.13. Mantenimiento.-** Son los trabajos de conservación necesarios para prolongar la vida útil de un bien y preservarlo en buenas condiciones sanitarias.

**3.14. Materia flotante.-** Es todo aquel material que tiene menor densidad que el agua y por ello queda en la superficie.

**3.15. Método amperométrico.-** Técnica electrolítica donde se aplica un voltaje eléctrico pequeño a través de dos electrodos y mide el cambio de corriente resultado de reacciones químicas.

**3.16. Procedimiento.-** Documento que contiene las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación o actividad, describiendo en forma escrita y gráfica, el método, frecuencia, enlaces, participantes y responsables necesarios para la realización de dichas actividades.

#### **4. Abreviaturas**

Además de lo especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida, el significado de los símbolos y abreviaturas utilizados en esta Norma es el siguiente:

**4.1. DPD.-** N,N-dietil-p-difenildiamina.

**4.2. mg/L.-** Miligramos por litro.

**4.3. mL.-** Mililitros.

**4.4. mm.-** Milímetro.

**4.5. NMP.-** Número más probable.

**4.6. ORP.-** Potencial de óxido-reducción.

**4.7. pH.-** Potencial de hidrógeno.

**4.8. ppm.-** Partes por millón.

**4.9. UTN.-** Unidad de turbidez nefelométrica.

**5. Disposiciones específicas**

Los propietarios o responsables de albercas deberán observar que las instalaciones de la alberca cumplan con los requisitos sanitarios siguientes, a fin de evitar riesgos a la salud de los usuarios:

**5.1.** Se deberá contar con procedimientos de operación, limpieza y mantenimiento de las albercas.

**5.1.1.** Registrar en bitácoras las actividades de limpieza y mantenimiento de las albercas y los resultados de los análisis que se realicen.

**5.2.** Contar con un procedimiento de contingencias para dejar la alberca fuera de servicio en caso de accidentes o condiciones poco salubres del agua hasta lograr que se restablezcan las condiciones sanitarias.

**5.3.** Establecer un reglamento de medidas de seguridad y protección de salud de los usuarios y colocarlo a la vista del público.

**5.4.** Prohibir el ingreso de mascotas a la alberca.

**5.5.** Se debe contar con servicios sanitarios y regaderas en el área de albercas.

**5.5.1.** Servicios sanitarios con insumos higiénicos (papel sanitario y jabón).

**5.6.** Las paredes, pisos de la alberca, así como los accesorios que estén dentro de ésta, deben estar libres de presencia de moho y biopelícula y ser de acabado sanitario.

**5.7.** La alberca debe tener circulación de agua durante su operación y en caso de recirculación deberá contar con equipo de filtración.

**5.8.** Se debe garantizar una renovación mínima diaria del agua del 5% en cada alberca.

**5.9.** Una vez vaciadas las albercas deberán recibir mantenimiento exhaustivo mediante el tallado y abrasión del piso y paredes, así como la adición de una solución de cloro a 100 ppm o 100 mg/L. Incluyendo el resane de grietas y aplicación de pintura epóxica en caso de requerirlo.

**5.10.** El mantenimiento de filtros, equipos y accesorios deberá realizarse en forma periódica según recomendaciones del fabricante y contar con el registro de esta actividad.

**5.11.** La alberca no debe contener más de 10 unidades de materia flotante por metro cuadrado del total de su superficie, misma que debe ser retenida en una malla de aproximadamente 1 cm de abertura.

**5.12.** El agua de la alberca deberá ser desinfectada previamente a su uso y cumplir con lo señalado en el cuadro 1.

Cuadro 1. Límites permisibles de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, método de detección y frecuencia mínima de muestreo del agua de alberca.

Parámetro	Límite Permissible	Método de Detección	Frecuencia de Medición
<b>pH</b>			
	6.5 □ 8.5	Potenciométrico o colorimétrico	Cada 4 horas durante el periodo de operación, iniciando con la apertura de servicio al público.
<b>Turbidez1</b>			

	5 UTN o penetración de luz mayor a 2 m con disco Secchi.	Nefelométrico o visual	Una vez al día a mitad del periodo de operación.
<b>Cloro residual libre<sup>2</sup></b>			
	1.0 □ 5.0 mg/L	Colorimétrico con reactivo DPD 1 o amperométrico	Cada 4 horas durante el periodo de operación, iniciando con la apertura de servicio al público, para los métodos amperométrico y ORP incluir una medición con DPD al inicio.
	>650 milivolts	ORP	
<b>Cloraminas<sup>2</sup></b>			
	0.0 - 0.5 mg/L	Colorimétrico con reactivo DPD 3	Semanal
<b>Bromo residual libre<sup>3</sup></b>			
	2.0 □ 6.0 mg/L	Colorimétrico con reactivo DPD 1 o amperométrico	Cada 4 horas durante el periodo de operación, iniciando con la apertura de servicio al público, para los métodos amperométrico y ORP incluir una medición con DPD al inicio.
	>650 milivolts	ORP	
<b>Bromaminas<sup>3</sup></b>			
	0.0 □ 0.5 mg/L	Colorimétrico con reactivo DPD 3	Semanal
<b>Acido cianúrico o isocianuratos clorados<sup>2</sup></b>			
Alberca no techada	100.0 mg/L	Turbidimétrico con reactivo para ácido cianúrico o colorimétrico	Semanal
Alberca techada	0.0 mg/L		
<b>Coliformes fecales<sup>5</sup></b>			
	< 40 NMP/100 mL	Ver, Apéndice Normativo B.	Bimensual, durante la temporada de uso.
<b>Amebas de vida libre (<i>Naegleria spp</i>, <i>Acanthamoeba spp</i>)<sup>4, 5</sup></b>			
	Ausente	Ver, Apéndice Normativo A	Bimensual, durante la temporada de uso.

**Notas:**

- 1 No aplica para aguas termales que por su naturaleza sean opacas.
- 2 Aplica sólo para albercas en que se utilicen compuestos de cloro como desinfectante.
- 3 Aplica sólo para albercas en que se utilice bromo como desinfectante.
- 4 Aplica para albercas con temperatura de agua mayor a 30°C.
- 5 El método de prueba para el análisis de estos microorganismos, se incluye en los apéndices.

**5.13.** Quedan exentas de desinfección y de cumplir los parámetros fisicoquímicos del cuadro 1, las albercas construidas por encauce de una corriente superficial o de un manantial, cuando presenten las características siguientes:

**5.13.1.** Las que tengan renovación de agua por lo menos tres veces al día durante el horario de servicio, asegurando por lo tanto ausencia de remolino.

**5.13.2.** El agua de estas albercas deberá muestrearse por lo menos tres veces en un mes, antes del inicio de temporada de mayor afluencia de visitantes para corroborar que se cumplen los límites permisibles de Coliformes fecales y Amebas de vida libre específicamente *Naegleria spp* y *Acanthamoeba spp*.

## **6. Control sanitario**

**6.1.** La autoridad sanitaria:

**6.2.** Podrá corroborar en cualquier momento mediante revisión de bitácora que el agua que se utiliza en las albercas se encuentre dentro de los límites permisibles establecidos.

**6.3.** Bajo situaciones de contingencia, podrá establecer los agentes biológicos, químicos y físicos, nocivos a la salud que se deban evaluar; así como su frecuencia de muestreo.

## **7. Muestreo y métodos de prueba**

**7.1.** El muestreo de agua para análisis microbiológico y fisicoquímico debe realizarse conforme a los procedimientos siguientes:

**7.1.1.** Los puntos de muestreo deberán ubicarse en la orilla de la alberca, lo más alejado de los sitios de alimentación y salida de agua, donde las paredes sean rugosas y donde exista la menor movilidad del agua.

**7.1.2.** Para el análisis de coliformes fecales, la muestra de agua debe ser colectada de 30 a 45 centímetros bajo la superficie del agua, donde la profundidad es de aproximadamente 1 m, cuando la alberca tenga una profundidad menor a 50 cm la muestra deberá tomarse a una profundidad media, en bolsas o recipientes estériles con tiosulfato de sodio, el volumen mínimo de la muestra de agua debe ser de 100 mL y ser transportada al laboratorio en refrigeración a una temperatura entre 4 y 8°C con un tiempo máximo de preservación de 24 horas entre la colecta de la muestra y el análisis en el laboratorio. El análisis debe ser realizado por un laboratorio tercero autorizado conforme al método descrito en el Apéndice Normativo B.

**7.1.3.** Para el análisis de ameba de vida libre, el volumen mínimo la muestra de agua debe ser de 500 mL, la cual debe ser colectada lo más alejado posible de la entrada o salida de agua, de 10 a 15 centímetros bajo la superficie del agua, en bolsas o recipientes estériles con tiosulfato de sodio, después de un raspado de las paredes de la alberca, teniendo cuidado de colectar el material que se pueda desprender. Transportar la muestra al laboratorio en la oscuridad y a temperatura ambiente, con un tiempo máximo de preservación de 48 horas entre la colecta de muestra y el análisis. El análisis debe ser realizado por un laboratorio tercero autorizado conforme al método descrito en el Apéndice Normativo A.

**7.1.4.** El análisis de los parámetros fisicoquímicos debe ser en el sitio, colectando la muestra de agua de 5 a 30 centímetros bajo la superficie del agua.

## **8. Concordancia con normas internacionales**

Esta Norma no es equivalente a ninguna norma internacional.

## **9. Procedimiento de evaluación de la conformidad**

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.

## **10. Bibliografía**

**10.1.** Implementation Guidance for Ambient Water Quality Criteria for Bacteria, EPA, 2002.

**10.2.** Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 2: Swimming pools and similar environments. WHO, 2006.

**10.3.** Guías para la Calidad del Agua Potable. Volumen 1. Recomendaciones. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 1995.

**10.4.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 20th Ed. Washington D.C. 2001. EUA.

**10.5.** Norma técnica sanitaria para albercas. Secretaría de Salud Pública del Estado de Sonora, 25 de abril del 2003.

### **11. Observancia de la Norma**

La vigilancia del cumplimiento de esta norma corresponde a la Secretaría de Salud y a los Gobiernos de las Entidades Federativas en sus respectivos ámbitos de competencia.

### **12. Vigencia**

Esta norma entrará en vigor a los 60 días naturales posteriores a su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 21 de mayo de 2012.- 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.

### **Apéndice Normativo A**

#### **Aislamiento e identificación de *Naegleria spp* y *Acanthamoeba spp***

##### **A.1. Objetivo**

Aislar e identificar a amebas del género *Acanthamoeba spp* y *Naegleria spp* en muestras de agua de uso recreativo.

##### **A.2. Campo de aplicación**

Este método aplica a muestras de agua provenientes de albercas o balnearios.

##### **A.3. Fundamento**

Este método se basa en el aislamiento primario de amebas del género *Acanthamoeba* y *Naegleria* en cultivos monoaxénicos, para posteriormente realizar una resiembra en la cual se realizan las pruebas de enflagelación y morfología microscópica las cuales nos permitirán diferenciar entre ambos géneros, una vez diferenciadas de otras amebas se procede a incubarlas a temperatura de  $43 \pm 1^\circ\text{C}$ , si éstas continúan con su desarrollo a esta temperatura, se reporta la presencia del género potencialmente patógeno.

##### **A.4. Materiales y equipo**

**A.4.1.** Recipientes de polipropileno con tapa de rosca de capacidad de 1 000 mL

**A.4.2.** Tubos evergreen con tapa de rosca de capacidad de 50 mL

**A.4.3.** Pipetas transfer estériles

**A.4.4.** Jeringas desechables

**A.4.5.** Asas bacteriológicas estériles desechables

**A.4.6.** Cajas de Petri

**A.4.7.** Varillas de vidrio en forma de L

**A.4.8.** Tubos de vidrio 13 x100 mm

**A.4.9.** Gradillas para tubos 13 x100 mm

**A.4.10.** Gradillas para tubos evergreen

**A.4.11.** Recipiente rojo para punzocortantes

**A.4.12.** Estufa de incubación para temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y de  $43 \pm 1^\circ\text{C}$

**A.4.13.** Refrigerador

**A.4.14.** Centrifuga

**A.4.15.** Campana de flujo laminar

**A.4.16.** Microscopio invertido

##### **A.5. Reactivos**

- A.5.1.** Agar No Nutritivo (agar NN)
- A.5.2.** Agua destilada estéril
- A.5.3.** Cultivo de *Escherichia coli* (*E. coli*) desarrollado en caldo nutritivo
- A.5.4.** Hipoclorito de Sodio
- A.6.** **Preparación del medio de cultivo, agar NN/*E. coli***

Cepa *Escherichia coli*. (*E. coli*), tomar una azada de *E. coli* en tubo con caldo nutritivo e incubar a una temperatura de 37°C de 18 a 24 horas. Trascurrido el tiempo de incubación tomar de 2 a 3 gotas del medio y agregarlas en el centro de una caja de agar NN.

Realizar una distribución uniforme sobre el agar, para lo cual se utiliza una varilla de vidrio estéril en forma de L, una vez realizado esto permitir que el caldo nutritivo con la *E. coli* se seque sobre la superficie del agar NN en una atmósfera estéril.

#### **A.7. Preparación de la muestra**

Una vez que la muestra se recibe en laboratorio y cumple con las condiciones de aceptación de muestras, se refrigera a una temperatura entre 2 y 8°C por al menos 30 minutos.

#### **A.8. Descripción del método de prueba**

Después de transcurrido el tiempo sacar el recipiente del refrigerador, se agita y se toma una alícuota de aproximadamente 50 mL y centrifugar en un tubo evergreen a 2 500 RPM durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante en campana de flujo laminar, depositar de 2 a 3 gotas del sedimento, en el centro de una caja de agar NN/*E. coli*, con una pipeta estéril transfer, agitar levemente la placa con movimientos rotatorios sin retirarla de la superficie de la mesa. Las cajas ya inoculadas se incuban a una temperatura de 37°C durante un periodo de observación de 7 días, durante este lapso de tiempo se examinan diariamente en el microscopio invertido en búsqueda de trofozoítos y quistes característicos de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, los trofozoítos son identificados debido a que tienen un movimiento de contracción y expansión en su vacuola alimenticia la cual es refringente a la observación microscópica. Una vez localizados los trofozoítos señalar el sitio con un marcador y realizar una resiembra recortando un cuadro pequeño del medio con una asa bacteriológica estéril y pasarlo a otra caja con medio de agar NN/*E. coli*, el pequeño cuadro de agar recortado se coloca en forma invertida con respecto a la superficie de la nueva caja de agar NN/*E. coli*.

##### **A.8.1. Prueba de enflagelación**

La resiembra se examina al microscopio invertido en búsqueda de trofozoítos o de una probable contaminación con hongos que en caso de presentarse, la caja debe de ser descartada y solicitar nueva muestra. Si la caja presenta desarrollo de trofozoítos, en una campana de flujo laminar se agregan de 2 a 3 mL de agua destilada estéril, incubándola por un periodo de 2 horas a una temperatura de 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la caja se examina en el microscopio invertido en búsqueda de trofozoítos biflagelados característicos de *Naegleria*.

Los trofozoítos que sean localizados microscópicamente, observar su forma y si presentan locomoción. *Acanthamoeba* presenta trofozoítos en forma de estrella y sin movimientos de locomoción perceptible, en el caso de *Naegleria* presentan movimientos de locomoción rápido tanto en su trofozoíto biflagelado como en su forma ameboidea, es importante identificar sólo un par de flagelos en el caso de *Naegleria* ya que existen otros géneros de amebas que tienen de 3 a 4 flagelos. Una vez realizadas estas observaciones anotar el género de las amebas identificadas.

##### **A.8.2. Incubación de la muestra**

Las cajas que son identificadas con uno o ambos géneros de amebas (*Acanthamoeba* o *Naegleria*), proceder a incubarlas a una temperatura de  $43 \pm 1^\circ\text{C}$  por un periodo de 24 horas, transcurrido este tiempo examinar al microscopio invertido en búsqueda de trofozoítos viables los cuales son identificados mediante el movimiento de su vacuola alimenticia.

#### **A.9. Interpretación de resultados**

Las cajas que presentan desarrollo de trofozoítos en forma de estrella o de erizo sin movimiento de locomoción perceptible o lento con una vacuola contráctil, con una prueba de enflagelación negativa y continúen viables en su desarrollo a una temperatura de  $43 \pm 1^\circ\text{C}$ , se reportan positivas al género *Acanthamoeba spp.*

Las cajas que presentan desarrollo de trofozoítos en forma semiovalada con movimientos de locomoción rápido, con una vacuola contráctil, con una prueba de enflagelación positiva y continúen viables en su desarrollo a una temperatura de  $43 \pm 1^\circ\text{C}$  se reportan como positivas al género *Naegleria spp.*



Las cajas que no presentan desarrollo de trofozoítos en los 5 días de incubación a 37°C, se reportan ausente.

#### **A.10. Glosario de términos y abreviaturas**

Además de lo especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida, el significado de los símbolos y abreviaturas utilizados en este método es el siguiente:

**A.10.1.** AVL = Amebas de vida libre

**A.10.2.** ANN = Agar no nutritivo

**A.10.3.** SNN = Sistema nervioso central

**A.10.4.** RPM = Revoluciones por minuto

#### **A.11. Referencia bibliográfica**

**A.11.1.** Fernando Lares/Isidra T. Ayala/ Eduardo Verdugo E. Amibas de Vida Libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. ITSON-DIEP, Julio-Diciembre, Vol. 3, Número 10. Instituto Tecnológico de Sonora, México, p. 39-47.

**A.11.2.** Tesis de amibas de vida libre, aislamiento e identificación en agua de la zona urbana de Caborca, Sonora. Briceño Verdugo Margarita/Melo G. Joaquina, 1992.

**A.11.3.** Five Cases of Primary Amebic Meningoencephalitis in Mexicali, México: Study of the Isolates. Lares Fernando-Villa y colaboradores. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 31, No. 3 Mar. 1993, p. 685-688.

**A.11.4.** Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. Schuster Frederick. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 15, No. 3, July 2002, p. 342-354.

### **Apéndice Normativo B**

#### **Determinación de bacterias coliformes fecales. Método del número más probable (NMP)**

##### **B.1. Introducción**

Las bacterias coliformes definidas como bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que a 35°C fermentan la lactosa con producción de gas, son un grupo heterogéneo compuesto por varias especies. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico. La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. El primero, es que *Escherichia coli* es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de este método. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperadas en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad.

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

## **B.2. Símbolos y abreviaturas**

Además de lo especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida, el significado de los símbolos y abreviaturas utilizados en este método es el siguiente:

<b>B.2.1.</b>	cm	centímetro
<b>B.2.2.</b>	pH	potencial hidrógeno
<b>B.2.3.</b>	mm	milímetro
<b>B.2.4.</b>	mL	mililitro
<b>B.2.5.</b>	N	normal
<b>B.2.6.</b>	NMP	número más probable
<b>B.2.7.</b>	lb/plg <sup>2</sup>	libra por pulgada cuadrada
<b>B.2.8.</b>	h	horas
<b>B.2.9.</b>	°C	grado Celsius
<b>B.2.10.</b>	%	por ciento
<b>B.2.11.</b>	±	más o menos
<b>B.2.12.</b>	<	menor que
<b>B.2.13.</b>	µm	micrómetro

## **B.3. Medidas de seguridad y control de calidad**

Seguir las indicaciones precautorias que se señalan en el apartado de preparación de medios de cultivo.

Recomendaciones generales previas al análisis de la muestra:

### **B.3.1. Homogeneización de la muestra.**

Las muestras en recipientes con un espacio vacío (de al menos 2.5 cm), pueden homogeneizarse por inversión rápida 25 veces. Las muestras que tengan de 2/3 a 3/4 de lleno, deberán agitarse 25 movimientos de arriba hacia abajo en un arco de 30 cm, para asegurar una unidad analítica representativa.

### **B.3.2. 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.

El laboratorio debe tener implementado un sistema de control de calidad para asegurar la confiabilidad de los resultados.

## **B.4. Equipo, medios de cultivo y materiales**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada con pH cercano a la neutralidad.

### **B.4.1. Equipo**

**B.4.1.1.** Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

**B.4.1.2.** Incubadora que evite variaciones mayores a 0.5°C con termómetro calibrado y/o verificado.

**B.4.1.3.** Incubadora con recirculación de agua que evite variaciones mayores a 0.5°C con termómetro calibrado y/o verificado.

**B.4.1.4.** Termómetro de máximas y mínimas.

**B.4.1.5.** Autoclave que alcance una temperatura mínima de 121 ± 1.0°C, a 15 lb/plg<sup>2</sup>.

**B.4.1.6.** Potenciómetro con una escala mínima de 0.1 unidades de pH a 25°C.

### **B.4.2. Medios de cultivo.**

**B.4.2.1** Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Ingrediente	Medio de concentración 1.5	Medio de concentración Sencilla
Triptosa	30.0 g	20.0 g
Lactosa	7.5 g	5.0 g
Fosfato dipotásico	4.125 g	2.75 g
Fosfato monopotásico	4.125 g	2.75 g
Cloruro de sodio	7.50 g	5.0 g
Lauril sulfato de sodio	0.15 g	0.1 g
Agua destilada	1.0 L	1.0 L

Disolver los componentes en 1 L de agua, calentando si es necesario o cuando utilice medio de cultivo deshidratado seguir las instrucciones del fabricante.

Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de  $6.8 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Distribuir en volúmenes de 10 ml el medio de concentración sencilla en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm y de 20 ml el medio de concentración 1.5 en tubos de 20 x 200 mm, cada tubo debe tener campana de fermentación (Durham) invertida.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a  $121 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  a 15 lb/plg<sup>2</sup>.

Almacenar en refrigeración el medio una vez preparado.

Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire una vez atemperadas después de la esterilización.

Alternativamente a las campanas de Durham, adicionar púrpura de bromocresol a una concentración de 0.01 g/L al caldo de lauril triptosa, la producción de ácido se observará por el vire de este indicador.

#### **B.4.2.2. Caldo EC**

Ingrediente	Medio de concentración sencilla
Triptosa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Mezcla de sal de bilis	1.5 g
Agua destilada	1.0 L

Disolver los componentes en 1 L de agua, calentando si es necesario. Cuando se utilice medio de cultivo deshidratado seguir las instrucciones del fabricante.

Distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm, cada tubo debe tener campana de fermentación (Durham) invertida.

Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de  $6.9 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Esterilizar en autoclave por 12 minutos a  $121 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  a 15 lb/plg<sup>2</sup>.

Almacenar en refrigeración el medio una vez preparado.

#### **B.4.3. Materiales**

**B.4.3.1.** Pipetas bacteriológicas de 10 y 1 mL (o si es necesario de 11 y 2 mL), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

**B.4.3.2.** Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

**B.4.3.3.** Tubos de cultivo de 20 x 200 mm y 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.

**B.4.3.4.** Campanas de fermentación (tubos de Durham).

**B.4.3.5.** Gradillas.

**B.4.3.6.** Asa de platino o nicromel de 3 mm de diámetro.

Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

Horno durante 2 horas a una temperatura de 170 a 175°C ó 1 hora a 180°C.

Autoclave durante 15 minutos como mínimo a  $121 \pm 1.0^\circ\text{C}$  a 15 lb/plg<sup>2</sup>.

El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones. No debe utilizarse material de vidrio dañado por esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

#### **B.5. Procedimiento**

##### **B.5.1. Coliformes totales, presuntivo**

Inoculación. Agitar la muestra y transferir volúmenes de 10 mL a cada uno de los 5 tubos de la primera serie con 20 mL de caldo lauril sulfato triptosa de concentración 1.5 y 1.0 mL y 0.1 mL de muestra a cada uno de los tubos de la segunda y tercera serie de 5 tubos respectivamente con 10 ml de caldo lauril sulfato triptosa.

Incubación. Incubar los tubos a 35°C, durante  $24 \pm 2$  h y observar si hay formación de gas, en caso contrario, incubar por  $48 \pm 2$  h.

##### **B.5.2. Coliformes fecales, confirmativo.**

De cada tubo que muestre hidrólisis del medio o formación de gas, agitar y tomar una azada, procediendo a sembrar en un número igual de tubos con medio EC. Incubar en incubadora con recirculación de agua a  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h, observando que el tiempo entre la inoculación y la colocación de los tubos en el baño no exceda de 30 minutos y que el agua de incubación cubra por entero al medio de cultivo en los tubos.

#### **B.6. Expresión de los resultados**

Considerar los tubos del procedimiento confirmativo en que se observe formación de gas después del periodo de incubación requerido y buscar el NMP en la Tabla. Número más probable (NMP) en series de cinco (5) tubos.

##### **B.7. Consideraciones generales.**

Cuando sólo una dilución muestra tres tubos positivos, elegir ésta y las diluciones mayores posteriores.

Cuando más de una dilución muestra tres tubos positivos y la última da menos de tres, elegir esta última y las dos diluciones anteriores más bajas.

Cuando en ninguna dilución hay tres tubos positivos y éstos se encuentran en más de tres diluciones, seleccionar las dos diluciones mayores positivas y la siguiente.

Cuando los tubos positivos sólo se encuentran en la muestra sin diluir (10 mL) y en la primera dilución (1 mL), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del número más probable.

En cada caso se obtiene un número de tres cifras, lo cual es representado en la Tabla. Número más probable (NMP) en series de cinco (5) tubos. En la columna que indica el número de tubos positivos se busca el índice del NMP.

La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución.

La precisión del analista deberá estar dentro de un 5% y entre analistas 10%.

### B.8. Informe de prueba

NMP COLIFORMES FECALES/100 mL.

### B.9. Bibliografía

**B.9.1.** Edberg. S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & the National Collaborative Study, 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol. 54:1595.

**B.9.2.** Edberg, S.C. & D.B. Smith, 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. Appl. Environ. Microbiol 55:380.

Tabla. Número más probable (NMP) en series de cinco (5) tubos.

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	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	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	28	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	25	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	28	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	95
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	36	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	36	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	40	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	240
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	60	5	3	5	280
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	25	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	720
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1000
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1000

Referencia: AOAC 8ª Edición, Revisión 2 2007.