



GACETA DEL GOBIERNO



Periódico Oficial del Gobierno del Estado de México
REGISTRO DGC NUM. 001 1021 CARACTERÍSTICAS 113282801

Mariano Matamoros Sur No. 308 C.P. 50130
Tomo CLXXX A:2023/001/02

Toluca de Lerdo, Méx., lunes 19 de septiembre del 2005
No. 56

SECRETARIA DE ECOLOGIA

ANTEPROYECTO DE NORMA TÉCNICA ESTATAL AMBIENTAL PROY-NTEA-006-SEGEN-RS-2005 QUE ESTABLECE LOS REQUISITOS PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS MEJORADORES DE SUELOS ELABORADOS A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS.

SUMARIO:

"2005. AÑO DE VASCO DE QUIROGA: HUMANISTA UNIVERSAL"

SECCION QUINTA

PODER EJECUTIVO DEL ESTADO

SECRETARIA DE ECOLOGIA

ANTEPROYECTO DE NORMA TÉCNICA ESTATAL AMBIENTAL
PROY-NTEA-006-SEGEN-RS-2005 QUE ESTABLECE LOS REQUISITOS
PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS MEJORADORES DE SUELOS ELABORADOS A PARTIR DE RESIDUOS
ORGÁNICOS.

Con fundamento en lo dispuesto en los artículos 27 y 115 fracción III de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; 18 de la Constitución Política del Estado Libre y Soberano de México; 9º fracción II de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos; 7º fracción VI de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente; 1.31, 1.32, 1.33, 1.36, 4.1, 4.2 fracciones II y III, 4.4, 4.7, 4.12 fracción III, 4.17, 4.19, 4.21, 4.50, 4.64, 4.65, 4.67 y 4.73 del Código Administrativo del Estado de México; 3, 5 fracciones II, VIII, XVII y XX, 17, 18, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 107, 108, 113, 125, 126, 131 y 154 del Reglamento del Libro Cuarto del Código Administrativo del Estado de México; 1, 2, 5, 6 fracciones VII, VIII, XIII, XV y XVIII del Reglamento Interior de la Secretaría de Ecología; y

CONSIDERANDO

Que un gran porcentaje de los residuos sólidos generados en el Estado de México están compuestos de residuos orgánicos, principalmente de restos de alimentos, de mercados, de las actividades de las podas de parques y jardines, de los provenientes de los residuos agropecuarios, forestales y agroindustriales así como de los lodos y biosólidos provenientes del tratamiento de aguas residuales; todos ellos materia prima para la producción de mejoradores de suelos y que a su vez permitan disminuir potenciales fuentes de contaminación.

Que los sitios de disposición final tanto de residuos sólidos urbanos como de residuos de manejo especial representan un pasivo ambiental y son generadores potenciales de impactos negativos al ambiente.

Que el incremento de la generación de residuos sólidos en la entidad, ha propiciado que aumenten los problemas relacionados con su manejo y disposición final, lo cual hace imprescindible definir estrategias de reducción y manejo adecuado de residuos.

Que el compostaje constituye una de las mejores alternativas de tratamiento y valorización de los residuos sólidos urbanos de tipo orgánico, que permite reducir el volumen de residuos que ingresa en los rellenos sanitarios.

Que la Ley General de Prevención y Gestión Integral de Residuos Sólidos, establece que la valorización debe considerarse en el diseño de instrumentos, programas y planes de política ambiental para la gestión de residuos.

Que resulta indispensable promover la producción y aplicación de mejoradores de suelos que cumplan requisitos de calidad específicos, con la finalidad de disminuir los impactos negativos al ambiente.

Que el grupo de trabajo, en reunión del 02 de agosto del 2005, aprobó el Anteproyecto que establece los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos.

Que en el desarrollo del presente proyecto participaron el Instituto de Fomento Minero y Estudios Geológicos del Estado de México, el Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuario y Forestal del Estado de México, la Delegación en el Estado de México de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, el Instituto de Salud del Estado de México, la Universidad Autónoma del Estado de México, la Universidad Autónoma de Chapingo, las Facultades de Estudios Superiores Iztacala y Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, la Procuraduría de Protección al Ambiente del Estado de México, la Comisión para la Recuperación Ecológica de la Cuenca del Río Lerma, la Dirección General de Ordenamiento Ecológico e Impacto Ambiental de la Secretaría de Ecología, la Coordinación Jurídica de la Secretaría de Ecología, la Dirección de Prevención y Control de la Contaminación del Agua, Suelo y Residuos de la Secretaría de Ecología, la Academia Mexiquense de Derecho Ambiental, Recursos Naturales y Biodiversidad, la Agencia Técnica de Cooperación Alemana GTZ y la Consultoría Sistema de Ingeniería y Control Ambiental, S.A. de C.V.

Que habiéndose cumplido el procedimiento establecido en el Título Sexto del Código Administrativo del Estado de México denominado "De las Normas Técnicas", el Comité Estatal de Normalización Ambiental, en sesión extraordinaria de fecha 25 de agosto del 2005 aprobó el Proyecto de Norma Técnica Estatal Ambiental bajo la denominación PROY-NTEA-006-SEGEM-RS-2005 que establece los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos.

Que en razón de lo anterior, y de conformidad con el artículo 39 del Reglamento interior del Comité Estatal de Normalización Ambiental, se expide para consulta pública el Proyecto de Norma Técnica Estatal Ambiental PROY-NTEA-006-SEGEM-RS-2005 que establece los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos, a efecto de que los interesados, dentro de los sesenta días naturales siguientes a la fecha de su publicación en el periódico oficial "Gaceta del Gobierno", presenten sus comentarios ante el Comité Estatal de Normalización Ambiental, en las oficinas de la Coordinación Jurídica de la Secretaría de Ecología ubicadas en Ex Rancho San Lorenzo s/n, Conjunto SEDAGRO, Municipio de Metepec, Estado de México C.P. 52140 y Av. Gustavo Baz 2160 2º piso colonia La Loma, Estado de México C.P. 54060, o enviarse a los números de fax 01 55 53688261 y 01722 2756212 o al correo electrónico coordjuridica@yahoo.com.mx, para que en los términos del citado Reglamento, sean considerados, por lo que se ha tenido a bien expedir el siguiente:

Proyecto de Norma Técnica Estatal Ambiental PROY-NTEA-006-SEGEM-RS-2005 que establece los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos.

ÍNDICE

1. Introducción.
2. Objetivo y campo de aplicación.
3. Referencias.
4. Definiciones.
5. Especificaciones.
6. Grado de concordancia con Normas Oficiales Mexicanas.
7. Bibliografía
8. Observancia de esta norma.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas ambientales que requiere mayor atención en México es el relativo al manejo de residuos sólidos, ya que la cantidad y las características de los residuos generados están evolucionando de tal forma que rebasan la capacidad de los ecosistemas para integrarlos nuevamente a los ciclos naturales, por lo que es necesario definir estrategias de reducción y manejo adecuado de residuos, con lo cual se pretende disminuir el riesgo de descomposición biológica en condiciones inadecuadas. La apropiada producción y aplicación de mejoradores de suelos representa una opción para la solución de algunos problemas originados por el aumento en la generación de residuos.

En este contexto se refiere a los mejoradores de suelos que son elaborados con materias primas de origen orgánico, mediante un proceso acelerado de descomposición microbiológica y que generalmente son utilizados para mantener o mejorar la productividad de los suelos. La composta se considera un mejorador de suelos.

Algunos de los beneficios ambientales de los mejoradores de suelos es que disminuyen la erosión de la tierra, mantienen la humedad, ayudan a mejorar la calidad del suelo por su aportación de nutrientes, y contribuyen al crecimiento de la vegetación.

2. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Técnica Estatal Ambiental tiene por objetivo establecer los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos y es de observancia obligatoria para cualquier persona física o jurídico colectiva que opere una planta de producción de mejoradores de suelos.

3. REFERENCIAS

3.1 Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-1993, que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

3.2 Norma Mexicana NMX-AA-021-1985. Protección al Ambiente - Contaminación del suelo - Residuos sólidos municipales - Determinación de materia orgánica.

3.3 Norma Mexicana NMX-AA-025-1984. Protección al Ambiente - Contaminación del suelo - Residuos sólidos municipales - Determinación del pH - Método Potenciométrico.

3.4 Norma Mexicana NMX-AA-052-1985. Protección al Ambiente - Contaminación del Suelo - Residuos Sólidos Municipales - Preparación de muestras en laboratorio para su análisis.

3.5 Norma Mexicana NMX-AA-067-1985. Protección al Ambiente - Contaminación del suelo - Residuos sólidos municipales - Determinación de la relación carbono / nitrógeno.

3.6 Norma Mexicana NMX-AA-094-1985. Protección al Ambiente - Contaminación del suelo - Residuos sólidos municipales - Determinación de fósforo total.

4. DEFINICIONES

Para los efectos de esta Norma Técnica Ambiental, se asumen las definiciones que se mencionan en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, además de las siguientes:

4.1 **Análisis.** Prueba física, química o microbiológica que evalúa cuantitativamente algunas propiedades o parámetros.

4.2 **Biodegradable.** Cualidad que tiene la materia de tipo orgánico, para ser transformada por medios biológicos en componentes más simples.

4.3 **Biosólidos:** Producto resultante de la estabilización, deshidratación y mineralización de materiales orgánicos provenientes de la fracción orgánica contenida en los residuos sólidos de origen domiciliario (basuras) o del tratamiento de las aguas residuales, con características físicas, químicas y microbiológicas que permiten los usos establecidos en esta norma. No son biosólidos las escorias o cenizas producto de la incineración de los lodos; los residuos sólidos de origen domiciliario (basuras) e industrial que se retiran de los equipos e instalaciones correspondientes a la fase preliminar de los sistemas de tratamiento de aguas residuales; y los residuos cuya calidad los incorpore en la calificación de especiales o peligrosos.

4.4 **Biotransformación.** Es la utilización de procesos biológicos para obtener productos de interés energético, como el biogás, o mejoradores orgánicos de suelos.

4.5 **Coliformes.** Bacilos Gram negativos, no esporulados, facultativos que a 35°C fermentan la lactosa con formación de ácido, ocasionando en las colonias desarrolladas el vire del indicador rojo neutro presente en el medio y la precipitación de las sales biliares.

4.6 **Coliformes fecales.** Bacterias patógenas presentes en el intestino de animales de sangre caliente y humanos. Bacilos cortos Gram negativos no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35°C fermentan la lactosa con formación de ácido. También son conocidos como coliformes termo-tolerantes; pueden identificarse por su tolerancia a temperaturas de 44-45°C. Tienen la capacidad de fermentar la lactosa a temperatura de 44.5°C. Incluyen al género *Escherichia* y algunas especies de *Klebsiella*.

4.7 **Composta.** Es el producto obtenido mediante procesos microbiológicos aerobios y anaerobios, que han pasado por las diferentes etapas termofílicas y mesofílicas, que permiten obtener un producto benéfico para el suelo e inocuo para el ambiente.

4.8 **Compostaje.** Tecnología utilizada para la obtención de composta, a partir de desechos orgánicos vegetales y animales o biosólidos, utilizando un proceso de tipo microbiológico y bioquímico, basado en procesos de mineralización, transformación y estabilización bajo condiciones aeróbicas (o anaerobias) y termofílicas, bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura. de este proceso se obtiene composta como producto, que cumple con las normas de calidad y puede ser utilizado como mejoradores orgánicos de suelos.

4.9 **Estabilización.** Proceso que involucra tratamientos destinados a lograr la mineralización de la materia orgánica para obtener mejoradores orgánicos de suelos, disminuyendo así los efectos contaminantes al ambiente.

4.10 **Etapa mesofílica.** Se presenta cuando en el proceso de compostaje actúan los microorganismos capaces de vivir en un rango de temperatura de 25 a 40°C, responsable de la mayor parte de la actividad metabólica.

- 4.11 Etapa termofílica.** Se presenta cuando en el proceso de compostaje se reemplaza la población mesofílica, dando lugar a microorganismos que se desarrollan a temperaturas mayores a 40°C, los cuales continúan con el proceso de descomposición.
- 4.12 Helminto.** Término designado a un amplio grupo de gusanos parásitos (de humanos, animales y vegetales), de vida libre, con forma y tamaños variados. Poseen órganos diferenciados, y sus ciclos vitales comprenden la producción de huevo o larvas, infecciosas o no.
- 4.13 Huevos de helmintos viables.** Huevos de helmintos susceptibles de desarrollarse e infectar.
- 4.14 Laguna de evaporación.** Depósito poco profundo destinado a la captación de lixiviados, cuya función es promover la evaporación de éstos.
- 4.15 Límite máximo permisible.** Valor asignado a un parámetro, el cual no debe ser excedido.
- 4.16 Lixiviado.** Es el líquido residual generado por la descomposición biológica de la parte orgánica o biodegradable de los residuos sólidos bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas y/o como resultado de la percolación de agua a través de los residuos en proceso de degradación que contiene sustancias que pueden infiltrarse en los suelos o escurrirse fuera de los sitios en los que se depositan los residuos y que puede dar lugar a la contaminación del suelo y de cuerpos de agua, provocando su deterioro y representar un riesgo potencial a la salud humana y de los demás organismos vivos, siempre y cuando estos presenten una concentración igual o mayor a los 20,000 DBO₅ (Demanda Bioquímica de Oxígeno al quinto día).
- 4.17 Mejoradores de suelos.** Compuestos de origen orgánico que por sus características pueden utilizarse como acondicionadores de suelos y fertilizantes para mejorar la calidad productiva del suelo.
- 4.18 Método Aeróbico.** Son aquellos sistemas en los cuales el proceso de biotransformación es realizado mediante aireaciones naturales o forzadas de forma continua o intermitente, que aceleran el trabajo de bacterias y microorganismos aeróbicos que descomponen la materia orgánica por oxidación.
- 4.19 Método Anaeróbico.** Son aquellos sistemas en los cuales el proceso de descomposición biológica de los sustratos orgánicos se lleva a cabo en ausencia de oxígeno (sistema cerrado). Los productos finales del metabolismo anaerobio son metano, dióxido de carbono y numerosos productos intermedios de bajo peso molecular, como son los ácidos orgánicos y los alcoholes.
- 4.20 Método de pila con volteo.** Técnica utilizada en el proceso de compostaje basada en el volteo frecuente del material en proceso, lo que permite lograr la aireación necesaria y una mezcla completa del material; permite desplazar el material que se encuentra en el exterior de la pila hacia el interior, facilitando que toda la masa en elaboración pueda alcanzar las temperaturas y tiempos de descomposición y pasteurización requeridos.
- 4.21 Método de pila estática aireada.** Técnica utilizada en el proceso de compostaje, que permite un control de la aireación y de otros parámetros importantes del proceso, especialmente temperatura y humedad; utiliza un sistema de tuberías perforadas conectado a una bomba, que permite succionar e insuflar aire a la pila (aeración activa).
- 4.22 Pasteurización.** Efecto de eliminación de microorganismos patógenos a través de mantener la temperatura de toda la masa en compostaje en un nivel de temperatura mayor o igual a 55 °C por lo menos durante tres días consecutivos.
- 4.23 Parásito.** Organismo animal o vegetal que vive a expensas de otro (hospedero) causándole algún tipo de daño e incluso la muerte.
- 4.24 Patógeno.** Microorganismo capaz de causar enfermedades, si está presente en cantidad suficiente y condiciones favorables.
- 4.25 Peso en base seca.** Peso de los sólidos medidos después de ser secado a 104 ± 1°C.
- 4.26 Potencial de hidrógeno (pH).** Logaritmo negativo de la actividad de los iones de hidrógeno en el suelo. El grado de acidez o alcalinidad de un suelo, expresado en términos de la escala de 0 a 14.
- 4.27 Pila.** Espacio o depósito en el que se colocan los materiales para la realización del proceso de compostaje.
- 4.28 Planta de producción de mejoradores de suelos.** Establecimiento en el que se realiza el tratamiento de los residuos orgánicos, por la acción de diversas y sucesivas poblaciones de microorganismos benéficos, que se desarrollan bajo condiciones controladas de aire, temperatura y humedad. Este proceso permite obtener un producto final suficientemente estable para el almacenamiento e incorporación al suelo sin efectos ambientales adversos.
- 4.29 Residuo orgánico.** Fracción de residuos vegetales o animales provenientes de residuos sólidos urbanos o rurales, con alto contenido de carbono y nitrógeno y de fácil biodegradación.

4.30 Residuos Verdes. Son residuos vegetales tales como pastos cortados, hojas secas y ramas, los que se generan como resultado del cultivo y mantenimiento de jardines, parques, espacios públicos, así como de la conservación de paisajes y la cosecha.

4.31 Salmonella spp. Bacilos móviles por sus flagelos peritricos, que fermentan de manera característica glucosa y manosa sin producir gas, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. La mayoría produce sulfuro de hidrógeno (H_2S). A menudo, son patógenos para el hombre y los animales cuando se ingieren, ocasionando fiebre tifoidea y enterocolitis (conocida también como gastroenteritis).

4.32 Tratamiento. Es el conjunto de operaciones, procesos o técnicas mediante los cuales se modifican las características del material orgánico, incrementando sus posibilidades de utilización benéfica o para minimizar los impactos ambientales y los riesgos para la salud humana.

4.33 Valorización de los residuos. Conjunto de acciones cuyo objetivo es recuperar el valor de los residuos mediante su reutilización, remanufactura, reciclado y recuperación de materiales secundarios.

5. ESPECIFICACIONES

5.1. Requisitos que deben reunir los sitios en donde se tenga contemplado el desarrollo de una planta de producción de mejoradores de suelos.

5.1.2. Los requisitos que deben de reunir los sitios para instalar una planta de producción de mejoradores de suelos son los siguientes:

5.1.2.1. La ubicación de la planta deberá ser acorde con los planes de desarrollo urbano, así como con los planes o programas de ordenamiento ecológico territorial, estatales y municipales.

5.1.2.2. El sitio donde se instaló una planta de producción de mejoradores de suelos se deberá contar con caminos transitables durante todo el año, para ingresar la materia prima y sacar el producto final.

5.1.2.3. El terreno deberá tener un espacio suficientemente amplio para la recepción de la cantidad de residuos orgánicos que se vayan a tratar, maniobras, tratamiento y el almacenamiento temporal del producto final y de rechazo, así como para las instalaciones necesarias.

5.1.2.4. La ubicación de la planta de mejoradores de suelos deberá garantizar la protección al ambiente y a la salud de la población.

5.1.2.5. No se deberán instalar plantas de producción de mejoradores de suelos en terrenos con riesgos de inundación, con período de retorno de 5 años.

5.1.2.6. Los proyectos ubicados en áreas naturales protegidas deberán cumplir los requisitos establecidos en los decretos de creación y los planes de manejo correspondientes.

5.1.2.7. Obtener la autorización en materia de impacto ambiental que otorga la Secretaría de Ecología.

5.2 Infraestructura

5.2.1. Las plantas de producción de mejoradores de suelo deberán contar con la siguiente infraestructura básica:

5.2.1.1. Delimitación perimetral del predio con cerca de malla ciclónica de 55 por 55 milímetros, de 2.5 metros de altura, a partir del nivel del suelo y con soportes, o de cualquier otro material que garantice el no ingreso de animales o personas no autorizadas.

5.2.1.2. Un sistema de captación del lixiviado que se genere durante el proceso, y en su caso la infraestructura necesaria que impida la infiltración del mismo al subsuelo.

5.2.1.3. En su caso, un sistema que evite el ingreso de las aguas pluviales.

5.2.1.4. Una caseta de control y vigilancia.

5.2.2. Deberá contar con instalaciones sanitarias para el personal que labore en la planta de producción de mejoradores de suelos.

5.2.3. Las plantas que traten una cantidad menor a 5 toneladas por día de residuos, quedarán exentas del cumplimiento de los puntos 5.2.1.2 y 5.2.1.4.

5.3. Medidas de control del Proceso

5.3.1. En caso que la permeabilidad del suelo del terreno, donde se prevé realizar la planta de producción de mejoradores de suelos sea mayor de 1×10^{-5} cm/s, los lechos para montar las pilas y la laguna de evaporación deben ser impermeabilizados para evitar la infiltración de los lixiviados.

5.3.2. Los materiales ingresados a la planta de mejoradores de suelos deberán ser preparados de tal forma que la estructura resultante permita llevar a cabo la biotransformación aerobia o anaerobia.

5.3.3. Durante el proceso se deberá controlar la temperatura, de tal forma que se garantice la eliminación de microorganismos patógenos.

5.3.4. Todos los residuos verdes, con excepción del pasto fresco deberán ser sometidos a trituración o a un proceso equivalente.

5.3.5. Identificar y documentar todos los procesos que se realicen durante la producción de mejoradores de suelos y llevar el control de cada uno de ellos a través de registros en bitácoras con foliación.

5.3.6. Los contenedores, recipientes y vehículos utilizados para el transporte de material no tratado deberán limpiarse en una zona designada para tal efecto.

5.3.7. Se deberá llevar un programa de control de plagas dentro de las instalaciones.

5.3.8. Se deberá establecer un programa de limpieza para todas las zonas de las instalaciones. Contando con los equipos de limpieza y agentes limpiadores adecuados.

5.3.9. El control de la higiene deberá incluir inspecciones periódicas del entorno y del equipo.

5.3.10. Las instalaciones y el equipo deberán mantenerse en buen estado de conservación.

5.3.11. Las plantas de mejoradores de suelos que utilicen reactor cerrado, deberán estar equipadas con:

5.3.11.1. Instalaciones para comprobar la evolución de la temperatura a lo largo del tiempo.

5.3.11.2. Se deberá establecer un programa de monitoreo continuo con registros para tener un control de la evolución de la temperatura de los residuos orgánicos sometidos al proceso.

5.3.11.3. Dispositivos que registren de forma continua los resultados de esas mediciones.

5.3.11.4. Un sistema de seguridad adecuado para evitar un calentamiento insuficiente.

5.3.12. Durante el proceso, la humedad de los residuos deberá mantenerse en un intervalo del 40% a 70%. No se deberá rebasar el 70% de humedad, para evitar la generación de lixiviados y olores desagradables.

5.3.13. Los productos de rechazo deberán enviarse a reciclaje o disponerse conforme a la normatividad correspondiente.

5.3.14. Los residuos a los que se refiere la NOM-052-SEMARNAT-1993, sólo podrán emplearse para la elaboración de mejoradores de suelos, cuando no presenten características de peligrosidad, conforme al análisis CRETIB.

5.3.15. El pH óptimo para sustratos orgánicos deberá ser entre 6.5 y 8.0 unidades, excepto que se trate de lodos biológicos estabilizados.

5.3.16. Cuando se aplique el método de compostaje de apilamiento estático con aireación forzada, la temperatura se deberá mantener a un nivel mayor o igual a 55°C, durante tres días consecutivos; de manera uniforme en toda la pila.

5.3.17. Cuando se aplique el método de compostaje de apilamiento con volteos, la temperatura se deberá mantener mayor o igual a 55°C por un periodo de al menos tres días consecutivos antes de un volteo o bien, mantener la temperatura entre 45°C y 50°C por 12 días consecutivos. Durante el período de compostaje, las pilas deben ser volteadas un mínimo de cinco veces.

5.3.18. No se deberá rebasar los 70°C de temperatura.

5.4. Requisitos Físico-químicos y sanitarios para los mejoradores de suelos

5.4.1. Cumplir con las características establecidas en la tabla 5.1.

Tabla 5.1

Característica	Método de determinación ⁽³⁾	Resultado
pH	NMX-AA-025-1984	6.5 a 8.0
Materia orgánica	NMX-AA-021-1985	mayor al 15%
Relación carbono-nitrógeno	NMX-AA-067-1985	menor a 12
Fósforo	NMX-AA-094-1985	mayor a 0.10% ó 1,000 partes por millón

Potasio	Acetato de amonio Anexo I	mayor a 0.25% o 2,500 partes por millón
Relación potasio-sodio	Extracción con Acetato de amonio y determinado por absorción atómica o flamometría Anexo I	mayor a 5
Hongos fitopatógenos	Siembra en agar dextrosa papa Anexo II	ausente
Huevos de helmintos/ g en base seca ⁽¹⁾	Anexo III	menor a 10
Coliformes fecales NMP ⁽²⁾ /g en base seca	Anexo IV	menor a 1000
Salmonella spp/ g en base seca	Anexo V	menor a 3

(1) Huevos de helmintos viables

(2) Número más probable

(3) La preparación de muestras se deberá llevar a cabo conforme a la NMX-AA-052-1985.

5.4.2. Las impurezas contenidas en los mejoradores de suelos no deberá superar los valores indicados en la tabla 5.2.

Tabla 5.2

Material	Número de Tamiz ASTM	Cantidad (%peso en base seca)
Plástico flexibles y/o película	3.5 (Tamaño de abertura 5.60 mm)	menor o igual a 0.05
Vidrio y/o metales y/o plásticos rígidos	10 (Tamaño de abertura 2.00 mm)	menor o igual a 0.5

5.4.3. No rebasar los límites de metales pesados asimilables establecidos en la tabla 5.3.

Tabla 5.3

Contaminante	Concentración máxima permitida ppm ⁽¹⁾	Método de determinación
Arsénico	5.0	Absorción Atómica (Digestión húmeda)
Cadmio	1.0	Absorción Atómica (Digestión húmeda)
Cromo hexavalente	5.0	extracción (UV-VISIBLE)
Cobre	30.0	Absorción Atómica (Digestión húmeda)
Plomo	5.0	Absorción Atómica (Digestión húmeda)
Níquel	5.0	Absorción Atómica (Digestión húmeda)
Zinc	90.0	Absorción Atómica (Digestión húmeda)
Molibdeno	15.0	Absorción Atómica (Digestión húmeda)

(1) ppm equivale a mg/Kg o mL/L, según corresponda

5.4.4. Los mejoradores de suelos producidos en las plantas deberán ser examinados conforme a lo establecido en la tabla 5.4.

Tabla 5.4

Volumen diario de mejoradores de suelos (Toneladas por día)	Volumen anual de mejoradores de suelos (Toneladas por año en base seca)	Frecuencia de muestreo y análisis	Parámetros a determinar
menor o igual a 5	Hasta 1,500	Una vez al año	Requisitos estipulados en las tablas

mayor a 5 y menor o igual a 20	Mayor de 1,500 hasta 7,500	Una vez por semestre	5.1, 5.2 y 5.3
mayor a 20	Mayor de 7,500	Una vez por trimestre	

6. GRADO DE CONCORDANCIA CON NORMAS OFICIALES MEXICANAS

No hay normas equivalentes y las disposiciones de carácter técnico que existen en el país, no reúnen los elementos y preceptos de orden técnico y jurídico que en esta Norma se integran y complementan de manera coherente, con base en los fundamentos técnicos y científicos reconocidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 7.1 Código Administrativo del Estado de México.
- 7.2 Constitución Política del Estado Libre y Soberano de México.
- 7.3 Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.
- 7.4 Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.
- 7.5 Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
- 7.6 Ley Orgánica de la Administración Pública del Estado de México.
- 7.7 Reglamento del Libro Cuarto del Código Administrativo del Estado de México.
- 7.8 Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección Ambiental.- Lodos y biosólidos.- Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de agosto del 2003.
- 7.9 Anabel Rosas Domínguez. "El Composteo". XI CENICA-SEMARNAT.
- Margarita Campos, Saskia Lugo, Udo Gitscher. "Evaluación de los proyectos de compostaje en el Ecuador". Fundación Natura-REPAMAR-CEPIS-GTZ.
- 7.10 Böhm, Reinhard "What need for specific rules for composting of biowaste and catering waste" University of Hohenheim. Institute of Environmental and Animal Hygiene, Stuttgart.
- 7.11 European Commission DG Environment. Heavy metals thresholds in compost with a view to soil protection – What approach for the community? Florian Amlinger. Workshop Biological Treatment of Biodegradable Waste-Technical Aspects- Brussels 8-10 Abril 2002.
- 7.12 Jörn Breuer. "The case of Germany-Variability in inorganic contaminants and xenobiotics in compost and measures to provide representative sampling and analysis". European Commission DG Environment. Workshop Biological Treatment of Biodegradable Waste-Technical Aspects- Brussels 8-10 Abril 2002.
- 7.13 J.W.A. Lustenhouwer and J.A. Hin (1990) "Characterization of compost with respect to its content of heavy metals". Part I: Sample digestion and ICP-AES Analyses. Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 39 pp. 209-222.
- 7.14 NRC National Research Council (1996) Use of reclaimed water and sludge in food crop production. National Academic Press Washington D.C. USA.
- 7.15 Reglamento de la Comunidad Europea No. 809/2003 de la Comisión del 12 de mayo de 2003, relativas a las normas de transformación de material de la categoría 3 y estiércol en las plantas de compostaje.
- 7.16 Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo 2000/0259, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.
- 7.17 Resolución del 14 de junio de 2001. Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales 2001-2006. Ministerio de Medio Ambiente de España (Archivo: r_140601_lodos.pdf) (<http://www.boe.es/boe/dias/2001-07-12/pdfs/A25298-25304.pdf>).
- 7.18 Sampling protocols for ensuring legal compliance and standardisation: the Case of Italy. Fabricio De Poli, Ministerio de Medio Ambiente.
- 7.19 Tania Volke Sepúlveda "Microbiología de la Composta. XI Semana de Biología". Universidad Autónoma Metropolitana.

7.20 Wehenpohl, Günther "Gestión Integral de Residuos Sólidos Municipales. Parte 3. Compostaje de materia orgánica de los residuos sólidos municipales".

8. OBSERVANCIA DE ESTA NORMA.

8.1 Las personas jurídico colectivas, poseedoras o propietarias de alguna planta de mejoradores de suelos tienen un plazo de 180 días naturales, a partir de la publicación de la presente Norma en la Gaceta del Gobierno del Estado de México, para regularizar su situación de acuerdo a los preceptos de esta Norma.

8.2 La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma Técnica Estatal Ambiental, corresponde a la Secretaría de Ecología, a través de la Procuraduría de Protección al Ambiente del Estado de México, cuyo personal realizará los trabajos de verificación que sean necesarios. Las violaciones a la misma se sancionarán en los términos del Código Administrativo, el Código de Procedimientos Administrativos y demás ordenamientos jurídicos aplicables.

8.3 Tratándose de los permisos obtenidos con anterioridad a la fecha de la publicación de la presente Norma, serán respetados en los términos en que fueron expedidos.

TRANSITORIOS

PRIMERO.- La presente Norma Técnica Estatal Ambiental, entrará en vigor a los 60 días posteriores a su publicación en el periódico oficial "Gaceta del Gobierno" del Estado de México.

Dado en la Ciudad Típica de Metepec, México, a los 25 días del mes de agosto del 2005.

La Secretaría de Ecología,

M. en C. Arlette López Trujillo.
(Rúbrica)

ANEXO I DETERMINACIÓN DEL POTASIO (K) Y SODIO (Na) ASIMILABLE

Extracción de los elementos con solución extractora de Acetato de Amonio 1N pH 7.

Para extraer el K y Na asimilables del mejorador de suelos, se usa la solución de AcNH_4 1N pH 7, que inicialmente fue diseñada con el fin de simular la acción disolvente del CO_2 encontrado en el suelo, saturando la solución adyacente a las raíces de las plantas, la solución permite el desarrollo de pruebas de los diferentes constituyentes involucrados en el nivel nutritivo del suelo, de tal forma que es capaz de extraer cantidades tales de los elementos que en combinación con las técnicas analíticas se puede cuantificar un rango suficientemente amplio de valores que permitan hacer una estratificación de dichos valores, dando la clasificación entre bajos y altos de acuerdo a la concentración de elementos en la solución.

Procedimiento de Extracción

Reactivos:

Solución extractora de Acetato de Amonio 1N pH 7 (disolver 50 g de acetato de Amonio en un litro de agua destilada o desionizada).

Material y Equipo:

Matraz Erlenmeyer de 125 mL

Papel filtro No. 42

Embudo

Pipeta volumétrica o dispensado ajustado a 10 mL

Pipeta volumétrica o dispensado ajustado a 5 mL

Agitador mecánico.

Desarrollo:

Se pesan 2 g de mejorador de suelos tamizado por malla 10 (2 mm) y se deposita en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se le adicionan 20 mL de la solución extractora de Acetato de Amonio 1N pH 7 y se agita mecánicamente durante 30 minutos, a velocidad alta, posteriormente se procede a filtrar a través del embudo, el cual contendrá el papel filtro y el filtrado se recibe en un segundo matraz Erlenmeyer.

Del extracto se obtienen diferentes alcuotas, en las cuales se determinarán los elementos Potasio y Sodio.

Determinación:

Reactivos	Material
Óxido de Lantano 0.01 N solución estándar de 1 y 2 ppm de K	Pipeta Volumetrica o dispensador ajustado a 5mL
solución estándar de 1 y 2 ppm de Na	Pipeta automática de 0.05 mL Tubo de ensaye

Desarrollo

Se toma una alícuota de 0.05 mL del extracto de mejorador de suelos y se le adicionan 5 mL de solución óxido de lantano 0.01 N , y se determinan por absorción atómica Potasio y Sodio, bajo las siguientes condiciones

Elemento	Longitud de onda	Apertura	Flama
Potasio	764.5	2.0	aire-acetileno
Sodio	589.1	0.7	aire-acetileno

Cálculos

K asimilable = lectura x 1000

Na asimilable = lectura x 1000

ANEXO II AGAR DEXTROSA Y PAPA

Ingredientes:

Infusión de Papa	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g

Preparación: Se suspenden 39 g del polvo en un litro de agua destilada. Después mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta su disolución completa, esterilizar a 121°C por 15 minutos. Vaciar el medio de cultivo esterilizado en cajas petri. Ajustar el pH final a 5.6 ± 0.2 .

ANEXO III MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS

El presente método tiene por objeto establecer la técnica para la detección, enumeración, determinación y de la viabilidad, en caso requerido, de huevos de helmintos en muestras de mejoradores de suelos, con el fin de evaluar su calidad.

1. Principio

La prueba se basa en el siguiente principio:

1.1 Por medio de lavados continuos, combinados con diversas etapas de filtración y flotación se logra la separación de los huevos de helmintos del resto de las partículas de mayor y menor tamaño, así como su concentración.

1.2 Permite, en caso de ser requerido, determinar la viabilidad de los huevos de helminto y con ello confirmar la calidad de diversos procesos de estabilización en mejoradores de suelos.

2. Preparación y acondicionamiento de la muestra

2.1 Preparar recipientes de plástico Inerte de 500 mL de boca ancha y de cierre hermético, previamente desinfectados con cloro comercial, lavados con agua potable a chorro y enjuagados con agua destilada.

2.2 A la muestra, antes de ser procesada, se le determinará el contenido de sólidos totales (ST) en por ciento en peso para, posteriormente, tomar en los recipientes el peso en fresco (X) que corresponda a 2 g de ST.

2.3 Mantener la muestra a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su llegada al laboratorio.

2.4 A partir de su toma y hasta antes de ser procesada, la muestra debe estar en refrigeración hasta su análisis.

3. Reactivos y materiales

3.1 Reactivos

3.1.1 Acetato de etilo ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OCCOCH}_3$) (opcional).

3.1.2 Acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (opcional).

3.1.3 Ácido acético (CH_3COOH) (opcional).

3.1.4 Ácido sulfúrico 0,1 N (H_2SO_4).

3.1.5 Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

- 3.1.6 Agua destilada.
- 3.1.7 Éter etílico.
- 3.1.8 Hipoclorito de sodio 10% (NaClO).
- 3.1.9 Formaldehído 37% (opcional).
- 3.1.10 Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).
- 3.1.11 Tween 80 al 0.1%.
- 3.2 Materiales
 - 3.2.1 Barras magnéticas.
 - 3.2.2 Bulbo de goma.
 - 3.2.3 Embudo de plástico con diámetro de 20 cm.
 - 3.2.4 Espátula.
 - 3.2.5 Gradillas para tubos de centrifuga 50 mL.
 - 3.2.6 Guantes de látex.
 - 3.2.7 Manguera para conexión de matraz.
 - 3.2.8 Matraces aforados Erlenmeyer de 1 L de capacidad.
 - 3.2.9 Matraz Kitazato de 4 L.
 - 3.2.10 Pipetas de 10 mL de plástico.
 - 3.2.11 Pizeta de plástico de 1 L.
 - 3.2.12 Probetas graduadas de 10 mL, 50 mL y de 1 L.
 - 3.2.13 Recipientes de cierre hermético de 1 a 3 L de capacidad.
 - 3.2.14 Recipientes de plástico inerte con paredes internas lisas de 3 L de capacidad.
 - 3.2.15 Recipientes de plástico inerte, boca ancha, de 500 mL de capacidad y susceptibles de ser esterilizados en autoclave.
 - 3.2.16 Tamiz de 20 μm (milimicras) de poro (opcional).
 - 3.2.17 Tamiz de 150 a 170 μm (milimicras) de poro.
 - 3.2.18 Tapabocas.
 - 3.2.19 Tubos de centrifuga cónicos, de plástico 50 y 200 mL (o de mayor capacidad).
4. Aparatos y/o instrumentos
 - 4.1 Agitador de tubos con control de velocidad y adaptable a tubos de diferentes tamaños.
 - 4.2 Autoclave capaz de operar a una presión de 1.05 kg/cm² y una temperatura de 121°C.
 - 4.3 Balanza granataria con intervalo de medición de 2.0 a 800 g \pm 0.2 g.
 - 4.4 Bomba de vacío con control de velocidad de succión.
 - 4.5 Cámara de Sedgwich-Rafter o disco Doncaster.
 - 4.6 Campana de extracción.
 - 4.7 Centrifuga, capaz de mantener los intervalos de operación de 660 \pm 300 g.
 - 4.8 Densímetro (hidrómetro), con intervalo de medición de 1.0 a 1.4 g/cm³.
 - 4.9 Incubadora con capacidad para operar a una temperatura de 26°C \pm 0.2°C.
 - 4.10 Licuadora con contenedor de plástico inerte, paredes lisas y con capacidad de 2 L.
 - 4.11 Mascarilla antigás con carbón activado o similar.
 - 4.12 Microscopio óptico equipado para hacer iluminación (Köhler), campo claro, con objetivos de 10 a 100 X, y platina móvil removible.
 - 4.13 Parrilla con agitación magnética.
 - 4.14 Potenciómetro con intervalo de medición de 0 a 14 \pm 0.2 unidades de precisión.
 - 4.15 Refrigerador con capacidad para operar a una temperatura de 4°C \pm 0.2°C.
5. Procedimiento
 - 5.1 Preparación de soluciones

Los siguientes puntos describen la secuencia del método de prueba, el cual debe realizarse conforme a lo descrito, con el fin de minimizar sesgos en los datos obtenidos.

 - 5.1.1 Solución ácido alcohol, homogeneizar 650 mL de ácido sulfúrico 0.1 N con 350 mL de alcohol etílico. Almacenar la solución en un recipiente hermético.
 - 5.1.2 Solución de formalina al 0.5%, añadir 5 mL de formaldehído al 37% y aforar a 1 000 mL con agua destilada. Homogeneizar y almacenar en recipiente hermético.
 - 5.1.3 Solución patrón de aceto-acético, agregar 15 g de acetato de sodio trihidratado, 3.6 mL de ácido acético y aforar a 1 000 mL de agua destilada. Homogeneizar y almacenar en frasco hermético durante 2 a 3 meses.
 - 5.1.4 Solución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) con gravedad específica de 1.3. Disolver 800 g de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) en 1 000 mL de agua destilada, mezclar en la parrilla magnética hasta homogeneizar totalmente. Medir la densidad con el densímetro y, según sea el caso, ajustar la densidad a 1.3 agregando sulfato de zinc o agua destilada, según se requiera. Almacenar en recipiente hermético y verificar densidad cada mes.
 - 5.1.5 Tween 80 al 0.1%, añadir 1 mL del reactivo en 999 mL de agua destilada y homogeneizar en parrilla de agitación hasta su completa disolución. Almacenar en recipiente hermético durante 2 a 3 meses.
 - 5.2 Calibración de aparatos

Todos los equipos deben ser calibrados o ajustados de acuerdo con las especificaciones del fabricante, o bien, contra equipos certificados.

5.3 Seguridad

5.3.1 Durante el procesamiento de la muestra se debe utilizar guantes de látex y cubreboca, para evitar cualquier riesgo de infección.

5.3.2 Se debe lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista, antes y después del ensayo.

5.3.3 La agitación de las soluciones con éter deberá realizarse en sitios ventilados o dentro de una campana de extracción, considerando su inflamabilidad. Evitar la inhalación, el contacto con los ojos, piel o ropa, ya que es un reactivo sumamente tóxico.

5.4 Manejo de residuos

5.4.1 Todos los residuos de la muestra analizada serán esterilizados en autoclave antes de su desecho.

5.4.2 Aquel material que sea reutilizado, pero que no pueda ser esterilizado en autoclave deberá ser colocado en hipoclorito de sodio (10%), durante un día, antes de ser lavado.

5.5 Concentración y separación de los huevos de helminto. La recuperación de los huevos de helminto de la muestra se realizará efectuando los siguientes pasos:

a) Por 1 minuto y con la ayuda de una licuadora homogeneizar el peso en fresco que corresponda a 2 g de ST. Utilizar para ello 200 mL de una solución de Tween 80 al 0.1%, integrando los enjuagues del recipiente que originalmente contenía la muestra.

b) Recuperar homogeneizado y enjuagues del vaso de la licuadora en un recipiente de plástico de 2 L, utilizar para ello 800 mL de la solución de Tween 80 al 0.1%.

c) Dejar sedimentar la muestra al menos durante 3 horas.

d) Aspirar el sobrenadante por vacío y filtrar el sedimento a través del tamiz de poro seleccionado (150 a 170 μm). Enjuagar recipiente y tamiz con 1 L de agua destilada, para lo cual se recomienda utilizar una pizeta. El filtrado y los enjuagues se recuperan en el recipiente de plástico de 2 L.

e) Dejar sedimentar al menos durante 3 horas.

f) Aspirar el sobrenadante por vacío y recuperar sedimento y enjuagues, con agua destilada, en un tubo de centrifuga de 200 mL o mayor capacidad.

g) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos.

h) Aspirar el sobrenadante por vacío y desecharlo. Resuspender la pastilla en 150 mL de la solución de sulfato de zinc. Homogeneizar la pastilla con ayuda de un agitador de tubos y, sólo en caso de ser necesario, utilizar aplicadores de plástico o espátula de teflón para lograr su completa disolución.

i) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos.

j) En caso de contar con un tamiz de 20 μm de poro se recomienda efectuar un segundo filtrado, cuya finalidad es remover el detritus de menor tamaño y facilitar la lectura de los huevos de helminto en el sedimento final al microscopio. Para ello, filtrar el sobrenadante y recuperar la película que ha quedado retenida sobre la malla con el volumen de agua destilada que sea necesario (utilizar pizeta), en un tubo de 200 mL de centrifuga, desechar filtrado y pasar al inciso i. En caso contrario verter el sobrenadante en un recipiente de 2 L y romper la densidad con 1 L de agua destilada.

k) Sedimentar al menos durante 3 horas.

l) Una vez transcurrido el tiempo de sedimentación aspirar el sobrenadante por vacío y recuperar el sedimento resultante en un tubo de centrifuga de 200 mL o mayor capacidad, incluir los enjuagues del recipiente.

m) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos.

n) Aspirar el sobrenadante por vacío y resuspender el sedimento por agitación, con ayuda de un agitador de tubos (si es necesario, utilizar aplicadores). La solución resultante se recupera en un tubo cónico de centrifuga de 50 mL, incluyendo el agua destilada de enjuague.

o) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos.

p) Aspirar el sobrenadante y con ayuda de un agitador de tubos resuspender la pastilla en 15 mL de la solución de alcohol-ácido (u opcionalmente, el patrón de aceto-acético) y, posteriormente, agregar 10 mL de éter (o acetato de etilo, que es menos tóxico). Agitar suavemente y, de vez en cuando, destapar para dejar escapar el gas que se desprenda. Por seguridad, realizar todo este proceso dentro de la campana de extracción (en el laboratorio) o con mascarilla de protección antigás (en campo).

q) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos.

r) Aspirar el sobrenadante, hasta 2 mm por arriba de la parte cónica del tubo de 50 mL (aproximadamente 5 mL). Realizarlo bajo las mismas condiciones de seguridad (en el laboratorio) dentro de la campana de extracción o (en campo) con mascarilla de protección antigás.

s) Efectuar un primer enjuague agregando H_2SO_4 0.1 N (o formalina 0.5%).

t) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos.

u) Aspirar el sobrenadante, dejando 5 mL y realizar un segundo enjuague agregando H_2SO_4 0.1 N (o formalina 0.5%).

v) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos.

w) Aspirar el sobrenadante dejando 5 mL del mismo.

5.6 Determinación de viabilidad y lectura al microscopio

a) Si no es necesario determinar la viabilidad, proceder a la cuantificación, en caso contrario, incubar el tubo con la muestra durante 4 semanas a $26^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Dejar la tapa del tubo floja para que entre aire y, por lo menos una vez por semana, verificar que el nivel del líquido no disminuya. Si es necesario, agregar agua destilada.

b) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, homogeneizar la pastilla y proceder a la cuantificación de los huevos. Para la lectura verter el sedimento final en una celda de Sedgwich Rafter o Disco Doncaster. En caso necesario, y para evitar la sobreposición de estructuras y del detritus no eliminado, distribuir en alícuotas y homogeneizar con agua destilada. Sólo aquellos huevos donde se observe la larva se consideran viables.

El Anexo 1 muestra algunos ejemplos.

c) Como paso opcional, y antes de realizar la lectura al microscopio, añadir hipoclorito de sodio (10%) en igual volumen al sedimento final y dejar reposar durante 10 minutos. Aforar con agua destilada.

d) Centrifugar a 660 g durante 5 minutos y decantar hasta dejar 5 mL del sobrenadante.

e) Realizar un segundo enjuague con agua destilada y centrifugar bajo las mismas condiciones.

Lo anterior permite una mayor claridad en el contenido interno de los huevos (especialmente de *Ascaris* y *Trichuris*), una mejor diferenciación y, en consecuencia, un conteo más rápido.

f) Aspirar sobrenadante hasta 5 mL del volumen final.

6. Cálculos

6.1 La fórmula para calcular g es:

$$g = \frac{r \text{ (rpm)}}{k}$$

donde:

g = fuerza relativa de centrifugación

k = constante cuyo valor es 89.456

r = radio de la centrífuga en cm

rpm = revoluciones por minuto

6.2 Para el cálculo del por ciento de sólidos totales (ST), se utiliza el % de humedad como sigue:

$$\% \text{ de sólidos totales} = 100\% - \% \text{ de humedad (2)}$$

7. Expresión de resultados

% de sólidos totales = 100% - % de humedad

7.1 Expresar los resultados en número de huevos/2 g de sólidos totales (volumen de muestra analizada).

$$H/2g \text{ ST} \quad (3)$$

donde:

H = número de huevos leídos en la muestra

gST = gramos de sólidos totales de la muestra analizados

7.2 Interferencias

7.2.1 La sobreposición de estructuras y/o detritus no eliminados en el sedimento puede dar una evaluación errónea al dificultar la lectura. En tal caso, es importante diluir con agua destilada y hacer las alícuotas que se consideren necesarias para que en cada una se realice el conteo.

7.2.2 La falta de experiencia en la identificación de géneros es un elemento común de sobreconteo.

7.2.3 En caso de que la muestra presente la formación de hongos durante el proceso de incubación se recomienda reemplazar el H_2SO_4 0.1 N por una solución de formalina 0.5%.

8. Informe de la prueba

Incluye especificar los siguientes puntos:

a) Todos los datos necesarios para la identificación completa de la muestra.

b) Los resultados, expresados de acuerdo con lo establecido en el inciso 8.

c) Cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis, así como cualquier operación no especificada en el método, o considerada opcional, que pueda haber influido en los resultados.

ANEXO IV MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES

El presente método establece la técnica para llevar a cabo la cuantificación del grupo coliformes fecales en mejoradores de suelos, con el fin de evaluar su calidad.

1. Principios del método

Este método de análisis se basa en que:

1.1 Las bacterias presentes en una muestra pueden ser separadas por agitación, dando por resultado una suspensión de células bacterianas, uniformemente distribuidas.

1.2 A través de diluciones sucesivas de la muestra se obtienen inóculos de, al menos, una célula para obtener crecimiento en el medio de cultivo (tubos positivos), y otros que al sembrarse dan resultado en por lo menos, un tubo de la serie.

1.3 La combinación de resultados positivos y negativos permite realizar una estimación de la densidad bacteriana por medio de cálculos de probabilidad.

1.4 La técnica seleccionada permite el estudio de un volumen de muestra suficiente para obtener resultados significativos, considerando la alta turbidez que la muestra pudiera presentar a causa de la gran cantidad de material acumulado. En caso de aplicar técnicas como filtro de membrana se correría el riesgo de un cálculo de coliformes fecales inferior al real.

2. Preparación y acondicionamiento de la muestra

2.1 La muestra deberá ser tomada en frascos de 500 mL de capacidad, de boca ancha y previamente esterilizados.

2.2 Las muestras deben ser colocadas en hieleras con bolsas refrigerantes o hielo inmediatamente después de su toma.

2.3 Los tiempos de conservación en refrigeración y transporte deben reducirse al mínimo.

2.4 A la muestra, antes de ser procesada, se le determinará el contenido de sólidos totales (ST) en por ciento en peso y posteriormente se obtendrá el peso en fresco que corresponda a 4 g de ST.

2.5 A partir de su toma y hasta antes de ser procesada, la muestra debe estar en refrigeración y no transcurrir más de 48 horas.

3. Reactivos y materiales

3.1. Reactivos

3.1.1 Alcohol etílico.

3.1.2 Caldo lauril-triptosa con púrpura de bromocresol (C.L.T.).

3.1.3 Caldo lactosado con púrpura de bromocresol (C.L.).

3.1.4 Medio EC.

3.1.5 Fosfato monopotásico.

3.1.6 Cloruro de magnesio.

3.1.7 Hidróxido de sodio.

3.1.8 Agua destilada.

3.2 Materiales

3.2.1 Asa de inoculación.

3.2.2 Barras magnéticas.

3.2.3 Bulbo de goma.

3.2.4 Espátula.

3.2.5 Frascos de 500 mL de capacidad con tapa de cierre hermético, boca ancha y con capacidad de esterilización en autoclave.

3.2.6 Gradillas y canastillas de acero inoxidable.

3.2.7 Guantes de látex.

3.2.8 Mechero de Bunsen, lámpara de alcohol o similar.

3.2.9 Pipetas graduadas de vidrio de 1.5 y 10 mL.

3.2.10 Portapipeteros de acero inoxidable.

3.2.11 Tapabocas.

3.2.12 Tapones de acero inoxidable para tubos de ensayo (18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm o de 12 mm x 120 mm).

3.2.13 Tubos de Durham (7 mm x 4.5 mm o de 5 mm x 4 mm).

3.2.14 Tubos de ensayo (18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm o 12 mm x 120 mm).

3.2.15 Tubos de rosca (13 mm x 100 mm).

4. Aparatos e instrumentos

4.1 Autoclave a una presión de 1.05 kg/cm² y una temperatura de 121°C.

4.2 Balanza analítica con intervalo de medición de 0.0001 a 10.00 g.

4.3 Balanza granataria con intervalo de medición de 0.1 a 100 g.

4.4 Baño de agua (con agitación) con capacidad para operar a una temperatura de 44.5°C ± 0.2°C.

4.5 Estufa de esterilización con capacidad para medir temperatura de 170°C ± 10°C.

4.6 Incubadora con capacidad para operar a una temperatura de 37°C ± 0.2°C.

4.7 Parrilla con agitación y calentamiento.

4.8 Potenciómetro con intervalo de medición de 6.9°C ± 0.2°C.

4.9 Refrigerador con capacidad para operar a una temperatura entre 2 y 4°C ± 0.2°C.

5. Procedimiento

Los puntos siguientes describen la secuencia del método de prueba, el cual debe realizarse conforme a lo descrito, con el fin de minimizar sesgos en los datos obtenidos.

5.1 Preparación de medios de cultivo y soluciones

5.1.1 Caldo lauril-triptosa con púrpura de bromocresol (C.L.T.).

Fórmula	
Triptosa	20.00 g
Lactosa	5.00 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2.75 g
Fosfato monopotásico(KH ₂ PO ₄)	2.75 g
Cloruro de sodio(NaCl)	5.00 g
Lauril sulfato de sodio	0.10 g
Púrpura de bromocresol	0.01 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver los ingredientes o 35.6 g del medio que se encuentra en forma deshidratada en el mercado y 0.01 g de púrpura de bromocresol, con la ayuda de una parrilla de agitación, en 1 L de agua destilada.

Verificar que el pH sea de 6.8 ± 0.2 , en caso contrario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo. Tapar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

El volumen final no debe variar más de 0.1 mL

El medio ya una vez preparado puede almacenarse a temperatura ambiente, en un lugar limpio y libre de polvo, durante no más de una semana.

5.1.2 Caldo lactosado con púrpura de bromocresol (C.L.).

Fórmula	
Extracto de carne	06.00 g
Peptona	10.00 g
Lactosa	10.00 g
Púrpura de bromocresol	0.01 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver los ingredientes o 13.0 g del medio C.L. que se encuentra en forma deshidratada en el mercado y 0.01 g de púrpura de bromocresol, con la ayuda de una parrilla de agitación, en 1 L de agua destilada.

Verificar que el pH sea de 6.9 ± 0.2 , en caso contrario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Distribuir volúmenes de 10 mL del medio en tubos de ensayo. Tapar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

El volumen final no debe variar más de 0.1 mL

El medio ya una vez preparado puede almacenarse a temperatura ambiente, en un lugar limpio y libre de polvo, durante no más de una semana.

5.1.3 Medio líquido A-1

Fórmula	
Lactosa	5.00 g
Triptosa	20.00 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.00 g
Salicina	0.50 g
Éter p-isooctilfenil de polietilenglicol (Tritón X-100 y Haas, o equivalente)	01.00 mL
Agua destilada	1 000.00 mL

Calentar hasta la disolución de los ingredientes sólidos. Añadir el éter p-isooctilfenil de polietilenglicol.

Verificar que el pH sea de 6.9 ± 0.1 , en caso contrario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Distribuir volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo con campana de Durham, tapar con tapones de aluminio. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos.

Este medio se debe conservar en oscuridad a temperatura ambiente durante no más de 7 días.

5.1.4 Medio EC

Fórmula	
Triptosa o tripticasa	20.00 g
Lactosa	5.00 g
Mezcla de sales biliares	1.50 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	4.00 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.50 g

Fórmula	
Cloruro de sodio (NaCl)	5.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver los ingredientes o 37.0 g del medio EC que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, con la ayuda de una parrilla de agitación, en 1 L de agua destilada. Verificar que el pH sea de 6.9 ± 0.2 , en caso contrario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Distribuir volúmenes de 10 mL del medio en tubos de ensayo, conteniendo en su interior tubos de Durham invertidos, tapar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121°C , durante 15 minutos. El volumen final no debe variar más de 0.1 mL.

El medio ya preparado puede almacenarse a temperatura ambiente, en un lugar limpio y libre de polvo, durante no más de una semana.

5.1.5 Solución madre de tampón A

Fórmula	
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	34.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver el fosfato monopotásico en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 con la solución de hidróxido de sodio 1 N y aforar a 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C , durante 15 minutos y almacenar en refrigeración (entre 2 y 4°C). La solución es estable durante meses. Desechar cuando se observe turbiedad.

5.1.6 Solución madre de tampón B

Fórmula	
Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	8.10 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver el cloruro de sodio de magnesio en 500 mL de agua destilada y aforar a 1 000 mL con agua destilada, posteriormente esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración (entre 2 y 4°C). La solución es estable durante meses, desechar cuando haya turbiedad.

Solución tampón de fosfatos (agua de dilución).

5.1.7 Adicionar 1.25 mL de la solución madre de tampón A y 5 mL de la solución madre de tampón B y aforar a 1 L con agua destilada. Distribuir volúmenes de 9.2 mL y 36 mL en tubos de rosca y frascos con tapa de cierre hermético, respectivamente. Esterilizar en autoclave a 121°C , durante 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

5.1.8 Solución de hidróxido de sodio 0.1 N

Fórmula	
Hidróxido de sodio (NaOH)	4.00 g
Agua recién destilada	1 000.00 mL

Preparación:

Pesar 4.0 g de hidróxido de sodio y disolver en 1 000 mL de agua recién destilada y libre de CO_2 para abatir la carbonatación de la solución. Almacenar en frasco con tapón de rosca.

5.1.9 Solución de hidróxido de sodio 1 N

Fórmula	
Hidróxido de sodio (NaOH)	40.00 g
Agua recién destilada	1 000.00 mL

Preparación:

Pesar 40 g de hidróxido de sodio y disolver en 1 000 mL de agua recién destilada y libre de CO_2 para abatir la carbonatación de la solución. Almacenar en frasco con tapón de rosca.

5.2 Calibración de aparatos

Todos los equipos utilizados deben ser calibrados o ajustados de acuerdo a las especificaciones del fabricante o bien contra equipos certificados.

5.3 Seguridad

Durante el procesado de la muestra se debe utilizar guantes de látex y cubrebocas, para evitar cualquier riesgo de infección.

Se debe lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista, antes y después del ensayo.

5.4 Manejo de residuos

Todos los residuos de la muestra analizada y sobrantes serán esterilizados en autoclave antes de su desecho.

5.5 Preparación de la muestra

- Suspender X g de materia fresca que correspondan a 4 g de sólidos totales en 36 mL de agua de dilución y así obtener una dilución de 10⁻¹.
- Mezclar durante 2 o 3 minutos, con ayuda de una parrilla de agitación, a velocidad baja (800 rpm), hasta la completa disolución.

5.6 Preparación de diluciones

Por el origen de las muestras se requieren inóculos menores a 1 mL, utilizando diluciones seriadas de submúltiplos de 10.

- Se preparan diluciones decimales seriadas a partir del homogeneizado resultante (10⁻¹) lo antes posible, reduciendo al mínimo la sedimentación. Transferir 1 mL en 9 mL de agua de dilución (10⁻²) y así sucesivamente hasta obtener la dilución deseada.
- Cada dilución debe ser homogeneizada perfectamente agitando 25 veces en 7 segundos, haciendo un arco con la muñeca de 30 cm de arriba abajo o con un sistema de agitación que proporcione resultados equivalentes. Es importante efectuar la agitación siempre de la misma manera, para obtener resultados comparables.
- Se debe utilizar una pipeta estéril diferente, para cada una de las diluciones decimales subsecuentes. Para aforar el líquido de la pipeta, deberá aplicarse la punta de ésta en el interior del cuello manteniéndola en posición vertical, inclinando el tubo. Nunca se debe introducir, a la muestra, más de la tercera parte de la pipeta.
- Si una muestra o un lote de muestras va a ser analizado por primera vez, utilizar al menos cuatro series de tres (o cinco) tubos cada una, posteriormente tres series de tres tubos serán suficientes.

5.7 Determinación de coliformes fecales

5.7.1 Prueba directa (medio A-1)

La prueba directa del medio líquido A-1 es un método de un solo paso que no requiere confirmación. Sin embargo, su uso representa un mayor costo ya que este medio no se encuentra en forma deshidratada, siendo necesario prepararlo a partir de sus ingredientes básicos.

- Adicionar por triplicado 1 mL de cada una de las diluciones preparadas en tubos conteniendo líquido A-1 correctamente etiquetados. Incubar durante 3 horas a 35 ± 0.5°C.
- Una vez transcurrido el tiempo los tubos se transfieren a un baño de agua a una temperatura de 44.5 ± 0.2°C y se incuban durante otras 21 ± 2 horas.
- La presencia de gas en cualquier cultivo en medio A-1 a las 24 horas o menos de incubación es una reacción positiva que indica la existencia de coliformes de origen fecal.

5.7.2 Prueba indirecta

5.7.2.1 Prueba presuntiva (caldo lauril-triptosa o caldo lactosado)

- Transferir 1 mL de las diluciones seleccionadas a cada una de las series de tubos correspondientes conteniendo el caldo lauril o caldo lactosado e incubar a 35 ± 0.5°C.
- Examinar cada tubo a las 24 ± 2 horas. La acidificación, con o sin producción de gas (cambio de coloración de púrpura a amarillo), a partir de la fermentación de la lactosa en el medio de cultivo, indica una prueba presuntiva positiva de la presencia de bacterias del grupo coliformes. En caso contrario reincubar durante otras 24 horas más.
- La acidificación del medio, con o sin formación de gas dentro de las 48 ± 3 horas, constituye una prueba presuntiva positiva. Cuando no existe acidificación del medio, constituye una prueba.

5.7.2.2 Prueba confirmativa flama del (medio EC)

- Los tubos positivos de la prueba presuntiva se resiembran por triple asada (esterilizada al mechero y enfriada) en tubos de fermentación presuntiva negativa que contengan caldo EC e incubados a 44.5 ± 0.2°C en baño de agua.
- Examinar cada tubo a las 24 ± 2 horas.
- El resultado será positivo cuando haya producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa contenida en el medio EC. Los tubos sin formación de gas se desechan.

6. Cálculos

6.1. El NMP de coliformes fecales se obtiene a partir del código compuesto por los tubos con resultado positivo en el medio EC o en A-1. Si se inoculan tres series de tres tubos y se utilizan volúmenes decimales diferentes a los indicados en la tabla, se obtiene el código formado por el número de tubos con resultados positivos en las tres series consecutivas, verificando el valor del NMP correspondiente, a través de la siguiente fórmula:

$$NMP = (NMP \text{ de tablas}) \times (10 / \text{mayor volumen inoculado}) \quad (1)$$

Por ejemplo: en medio EC se obtuvo el código 3/3 para la serie de la dilución 0.01; 2/3 para la serie de la dilución 0.001 y 1/3 para la serie de la dilución 0.0001.

6.2 El código es de 3, 2, 1; el índice de coliformes en tabla es de 150, por lo que el resultado es:

$$NMP/g \text{ ST} = (150) \times (10/0.01) = 150\,000 \quad (2)$$

$$NMP/g \text{ ST} = 1.5 \times 10^5 \text{ coliformes fecales} \quad (3)$$

6.3 Cuando se inoculan más de tres volúmenes decimales, para la composición del código se utilizan los resultados positivos correspondientes a tres series consecutivas inoculadas.

6.4 En ocasiones algunos de los posibles resultados de tubos múltiples son omitidos de las tablas del NMP. Así los códigos como 0-0-3, 0-0-4 y 0-0-5 junto con muchos otros, no están incluidos. Ello se debe a que la probabilidad de su ocurrencia es muy baja. Si en un laboratorio dichos resultados improbables aparecen con una frecuencia mayor de 1%, es posible que se deban a procedimientos equivocados en el mismo, por lo que deben ser revisados. Cuando el código del NMP no aparezca en tablas, se utilizará la siguiente fórmula:

$$\text{NMP} = (\text{Número de tubos positivos} \times 100) / \sqrt{[(\text{mL muestra tubos neg.}) \times (\text{mL muestra total})]} \quad (4)$$

La frecuencia de obtención de resultados que no se encuentren en las tablas debe ser baja (< 1%), de otra forma se tendrá que revisar y confirmar el procedimiento de la prueba.

7. Expresión de resultados

7.1. La densidad de los coliformes fecales se expresa como NMP de coliformes por g de materia seca o ST, el cual se obtiene a partir de tablas ya establecidas, las cuales incluyen los límites de confianza al 95% para cada una de las combinaciones de tres (o cinco) series de tubos positivos posibles. Para su utilización se proporcionan códigos formados por tres algoritmos correspondientes al número de tubos con resultados positivos en tres series consecutivas.

7.2. Interferencias

La posible presencia de otras bacterias que producen ácido a partir de lactosa, lo que se elimina en la prueba confirmativa a la temperatura de 44.5°C.

Es importante que los tubos de Durham colocados en los tubos de fermentación, una vez preparados y esterilizados, no presenten aire en su interior. En caso contrario se pueden obtener resultados positivos falsos.

8. Informe de prueba

El informe de prueba incluye especificar los siguientes puntos:

- a) Todos los datos necesarios para la identificación completa de la muestra;
- b) Los resultados, expresados de acuerdo con lo establecido en el inciso 8, y
- c) Cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis, así como cualquier operación no especificada en el método, o considerada opcional, que pueda haber influido en los resultados.

ANEXO V MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp

El presente método establece la técnica para llevar a cabo la cuantificación de *Salmonella* spp. mediante la técnica de tubos múltiples o número más probable (NMP) en mejoradores de suelos, con el fin de evaluar su calidad.

1. Principio

Este método de análisis se basa en los siguientes principios:

1.1 A partir de un enriquecimiento con medios selectivos, que contienen sustancias inhibitoras, se favorece la multiplicación de *Salmonella* spp., reconstituyendo a su vez la vitalidad de las células dañadas y, de igual forma, impidiendo el desarrollo de bacterias coliformes asociadas.

1.2 Una vez realizada la selección, las bacterias presentes en una muestra pueden ser separadas por agitación, dando por resultado una suspensión de células bacterianas, uniformemente distribuidas, a través de diluciones sucesivas de la muestra.

1.3 La aplicación de pruebas bioquímicas que permiten conocer el perfil bioquímico de las cepas en estudio para compararlo, con el que generalmente exhiben las cepas del género *Salmonella* spp.

2. Preparación y acondicionamiento de la muestra

2.1 La muestra deberá ser tomada en frascos de 500 mL de capacidad, de boca ancha y previamente esterilizados.

2.2 Las muestras deben ser colocadas en hieleras con bolsas refrigerantes o hielo inmediatamente después de su toma.

2.3 Los tiempos de conservación en refrigeración y transporte deben reducirse al mínimo.

2.4 A la muestra, antes de ser procesada, se le determinará el contenido de sólidos totales (ST) en por ciento en peso y posteriormente se obtendrá el peso en fresco que corresponda a 4 g de ST.

2.5 A partir de su toma y hasta antes de ser procesada, la muestra debe estar en refrigeración y no transcurrir más de 48 horas.

3. Reactivos y materiales

3.1 Reactivos

3.1.1 Agar Hierro Lisina (LIA).

3.1.2 Agar Sulfito de Bismuto.

3.1.3 Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).

3.1.4 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).

3.1.5 Alcohol etílico.

- 3.1.6 Caldo de Selenito Cistina.
 3.1.7 Caldo de Tetrionato.
 3.1.8 Cloruro de magnesio.
 3.1.9 Cristales de yodo.
 3.1.10 Fosfato monopotásico.
 3.1.11 Solución de hidróxido de sodio 0.1 N.
 3.1.12 Solución de hidróxido de sodio 1 N.
 3.1.13 Solución tampón de fosfatos (agua de dilución).
 3.1.14 Verde brillante.
 3.1.15 Yoduro de potasio
- 3.2 Materiales
 3.2.1 Barras magnéticas.
 3.2.2 Bulbo de goma.
 3.2.3 Cajas Petri estériles (100 x 15 mm.).
 3.2.4 Espátula.
 3.2.5 Frascos de 100 mL de capacidad con tapa de cierre hermético y capacidad de esterilizado en autoclave.
 3.2.6 Frascos de 1 L de capacidad con tapa de cierre hermética.
 3.2.7 Gradillas y canastillas de acero inoxidable, matraces Ertenmeyer de vidrio, de 1 y 2 L de capacidad.
 3.2.8 Guantes de látex.
 3.2.9 Matraz aforado de 1 L.
 3.2.10 Mechero de Bunsen, lámpara de alcohol o similar.
 3.2.11 Pipetas graduadas de vidrio de 1, 5 y 10 mL
 3.2.12 Portapipeteros de acero inoxidable.
 3.2.13 Tapabocas.
 3.2.14 Tapones de acero inoxidable para tubos de ensayo (18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm o 12 mm x 120 mm).
 3.2.15 Tubos de ensayo (18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm o de 12 mm x 120 mm).
 3.2.16 Tubos de rosca (13 mm x 100 mm).
4. Aparatos e instrumentos
 4.1 Autoclave a una presión de 1.05 kg/cm², y una temperatura de 121°C.
 4.2 Balanza analítica con intervalo de medición de 0.000 1 a 10.00 g.
 4.3 Balanza granataria con intervalo de medición de 0.1 a 100 g.
 4.4 Baño de agua (con agitación) con capacidad para operar a una temperatura de 44.5°C ± 0.2°C.
 4.5 Estufa u horno con capacidad para operar a una temperatura de 180°C ± 10°C.
 4.6 Incubadora con capacidad para operar a una temperatura de 37°C ± 0.2°C.
 4.7 Incubadora con capacidad para operar a una temperatura de 41°C ± 0.2°C.
 4.8 Parrilla con agitación y calentamiento.
 4.9 Potenciómetro con intervalo de medición de 6.5 a 7.5 ± 0.2 pH.
 4.10 Refrigerador con capacidad para operar entre 2 y 4°C ± 0.5°C.

5. Procedimiento

Los siguientes puntos describen la secuencia del método de prueba, el cual debe realizarse conforme a lo descrito, con el fin de minimizar sesgos en los datos obtenidos.

5.1 Preparación de medios de cultivo y soluciones

5.1.1 Caldo tetrionato

Fórmula	
Proteosa peptona o triptona	5.00 g
Sales biliares	1.00 g
Carbonato de calcio	10.00 g
Tiosulfato de sodio	30.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver los ingredientes o 16 g del medio, que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en agua destilada y calentar hasta ebullición, posteriormente distribuir en volúmenes de 100 mL en recipientes estériles y conservar entre 5 y 8°C. Antes de usar el medio, agregar 2 mL de solución de yodo yoduro y 1 mL de solución de verde brillante 1:1 000 por cada 100 mL de caldo, a cada recipiente.

Una vez que la solución de yodo yoduro ha sido adicionada al medio, éste deberá ser utilizado de forma inmediata. Nunca se debe volver a calentar.

5.1.2 Caldo selenito cistina

Fórmula	
Triptona o polipeptona	5.00 g

Lactosa	4.00 g
Fosfato disódico	10.00 g
Selenito ácido de sodio	4.00 g
L- Cistina	0.01 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Preparación:

Disolver los ingredientes o 23 g del medio, que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en agua destilada. Calentar hasta ebullición durante 10 minutos en un baño de agua y distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo, para esterilizar 10 minutos por arrastre de vapor. Verificar que el pH sea de 7.0 ± 0.2 , en caso contrario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

El medio se debe utilizar el mismo día de su preparación.

5.1.3 Agar sulfito de bismuto

Fórmula	
Extracto de carne de res	5.00 g
Peptona	10.00 g
Glucosa	5.00 g
Fosfato disódico (anhidro)	4.00 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0.30 g
Sulfito de bismuto	08.00 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Suspender los ingredientes o 52 g del medio, que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en 1 L de agua destilada, calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente.

Verificar que el pH sea de 7.6 ± 0.2 , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Enfriar a 60°C y distribuir en cajas de Petri estériles.

El medio no debe esterilizarse en autoclave, el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

5.1.4 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Fórmula	
Xilosa	3.75 g
L Lisina	5.00 g
Lactosa	7.50 g
Sacarosa	7.50 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Rojo de fencil	0.08 g
Agar	15.00 g
Tiosulfato de sodio	6.80 g
Desoxicolato de sodio	2.50 g
Citrato de hierro y amonio	0.80 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Suspender los ingredientes o 52 g del medio, que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en 1L de agua destilada. Agitar frecuentemente y dejar que hierva durante 1 minuto, evitar un sobrecalentamiento, si bien, su reacción puede ser satisfactoria, las colonias tienden a ser muy pequeñas. El medio nunca se debe esterilizar en autoclave.

Verificar que el pH sea de 6.9 ± 0.2 , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Enfriar a no menos de 50°C pero abajo de 60°C y vaciar en cajas Petri estériles.

5.1.5 Agar verde brillante (VB)

Fórmula	
Extracto de levadura	3.00 g
Proteosa peptona número 3 polipeptona	10.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Sacarosa	10.00 g

Rojo de fenol	0.08 g
Verde brillante	0.012 5 g
Agar	20.00 g

Preparación

Suspender los ingredientes o lo indicado por el medio, que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en 1 L de agua destilada, mezclar bien y calentar hasta ebullición. Verificar que el pH sea de 6.9 ± 0.1 en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Esterilizar en autoclave a 121°C por 12 minutos, cualquier sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfríar a no menos de 50°C pero debajo de 60°C y distribuir en cajas de Petri estériles.

5.1.6 Agar S.S.

Fórmula	
Extracto de carne	5.00 g
*Polipeptona	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Sales biliares	8.50 g
Citrato de sodio	8.50 g
Tiosulfato de sodio	8.05 g
Citrato férrico	1.00 g
Agar	13.50 g
Verde brillante solución al 0.1%	0.33 g
Rojo neutro	0.25 g

* La polipeptona se puede sustituir por 2.5 gramos de peptona de caseína y 2.5 gramos de peptona de carne.

Suspender los ingredientes o 60 g del medio que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en 1 L de agua destilada y calentar a ebullición hasta disolución completa. No esterilizar en autoclave. Posteriormente verificar que el pH sea de 7.0 ± 0.2 , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Enfríar a no menos de 50°C pero debajo de 60°C y distribuir en cajas Petri estériles.

5.1.7 Agar nutritivo**

Fórmula	
Extracto de carne	3.00 g
Peptona	5.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

** Se puede sustituir por agar infusión cerebro-corazón o similar.

Suspender los ingredientes en agua, dejar reposar entre 5 y 10 minutos, calentar a ebullición hasta su completa disolución, para posteriormente verificar que el pH sea de 6.8 ± 0.2 , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Dejar enfríar a no menos de 50°C y debajo de 60°C y distribuir en cajas Petri estériles.

5.1.8 Agar triple azúcar hierro (TSI)

Fórmula	
Polipeptona	20.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Sacarosa	10.00 g
Glucosa	1.00 g
Sulfato ferroso amónico	0.20 g
Tiosulfato de sodio	0.20 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	13.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Suspender los ingredientes o 65 g del medio, que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en 1L de agua destilada; mezclar perfectamente y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta su completa disolución. Verificar que el pH sea de 6.9 ± 0.2 , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Enfriar a 60°C y distribuir en volúmenes de 4 mL en tubos de rosca y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Los tubos se inclinan, de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una altura de 3 cm y una parte inclinada de 2 a 3 cm.

5.1.9 Agar hierro lisina (LIA)

Fórmula	
Peptona o gelisato	5.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Glucosa	1.00 g
L Lisina	10.00 g
Citrato férrico amónico	0.50 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Suspender los componentes o según indicaciones del medio que se encuentra en forma deshidratada en el mercado, en 1 L de agua destilada, y calentar hasta ebullición con agitación frecuente. Verificar que el pH sea de 6.7 ± 0.2 , en caso contrario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Enfriar a no menos de 50°C pero debajo de 60°C y distribuir en volúmenes de 4 mL en tubos de rosca, para esterilizar en presión a 121°C por 12 minutos. Posteriormente dejar enfriar los tubos en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada de 2 cm.

5.1.10 Solución madre de tampón A

Fórmula	
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	34.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver el fosfato monopotásico en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 con la solución de hidróxido de sodio 1 N y aforar a 1 000 mL con agua destilada y esterilizar en autoclave a una presión de 1.05 kg/cm² y una temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración entre 2 y 4°C.

La solución es estable durante meses, pero se debe desechar cuando se observe turbiedad.

5.1.11 Solución madre de tampón B

Fórmula	
Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	81.00 g
Agua destilada	1 000.00 mL

Disolver el cloruro de magnesio en 500 mL de agua destilada y aforar a 1 000 mL con agua destilada y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración entre 2 y 4°C. La solución es estable durante meses, pero se debe desechar cuando se observe turbiedad.

5.1.12 Solución tampón de fosfatos (agua de dilución)

Adicionar 1.25 mL de la solución patrón A y 5 mL de la solución patrón B y aforar a 1 L con agua destilada, para distribuir volúmenes de 9.2 mL y 36 mL en tubos de rosca y frascos con tapa de cierre hermético, respectivamente, y esterilizar en autoclave a una presión de 1.05 kg/cm² y una temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

5.1.13 Solución de hidróxido de sodio 0.1 N

Fórmula	
Hidróxido de sodio (NaOH)	4.00 g
Agua recién destilada	1 000.00 mL

Preparación:

Pesar 4.0 gramos de hidróxido de sodio y disolver en 1 000 mL de agua recién destilada y libre de CO₂ para abatir la carbonatación de la solución y almacenar en frasco con tapón de rosca.

5.1.14 Solución de hidróxido de sodio 1 N

Fórmula	
Hidróxido de sodio (NaOH)	40.00 g
Agua recién destilada	1 000.00 mL

Preparación:

Pesar 40.0 gramos de hidróxido de sodio y disolver en 1 000 mL de agua recién destilada y libre de CO₂ para abatir la carbonatación de la solución, almacenar en frasco con tapón de rosca.

5.1.15 Solución de yodo yoduro

Fórmula	
Cristales de yodo	6.00 g
Yoduro de potasio	6.00 g
Agua destilada	20.00 mL

Disolver el yoduro de potasio en el agua destilada y agregar lentamente los cristales de yodo hasta su completa disolución y almacenar en oscuridad.

5.2 Calibración de aparatos

Todos los equipos utilizados deben ser calibrados o ajustados de acuerdo a las especificaciones del fabricante o bien contra equipos certificados.

5.3 Seguridad

Durante el procesado de la muestra se deben utilizar guantes de látex y cubrebocas, para evitar cualquier riesgo de infección.

Se debe lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista, antes y después del ensayo.

5.4 Manejo de residuos

Todos los residuos de la muestra analizada y sobrantes serán esterilizados en autoclave antes de su desecho.

5.5 Preparación de la muestra

a) Suspender X gramos de materia fresca que correspondan a 4 gramos de sólidos totales en 36 mL de agua de dilución y así obtener una dilución de 10-1.

b) Mezclar durante 2 o 3 minutos, con ayuda de una parrilla de agitación, a velocidad baja (800 rpm), hasta la completa disolución.

5.6 Enriquecimiento

a) Suspender X g de materia fresca que correspondan a 4 g de sólidos totales en 36 mL de caldo de tetrionato, obteniendo una dilución de 10-1.

b) Mezclar durante 2 o 3 minutos, con la ayuda de una parrilla de agitación, a baja velocidad (800 rpm) hasta la completa disolución.

c) Incubar durante 22 ± 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

5.7 Preparación de diluciones

a) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, preparar las diluciones decimales seriadas transfiriendo 1 mL de caldo de tetrionato en 9 mL de agua de dilución (10-2) y así sucesivamente hasta obtener la dilución deseada.

b) En cada dilución se debe homogeneizar perfectamente agitando 25 veces en 7 segundos, haciendo un arco con la muñeca de 30 cm de arriba a abajo o con un sistema de agitación que proporcione resultados equivalentes. Es importante efectuar la agitación siempre de la misma manera, para obtener resultados comparables y utilizar una pipeta estéril diferente, para cada una de las diluciones decimales subsiguientes.

c) Adicionar por triplicado 1 mL de cada una de las diluciones preparadas en tubos conteniendo caldo selenito cistina correctamente etiquetados. Para aforar el líquido de la pipeta, deberá aplicarse la punta de ésta en el interior del cuello manteniéndola en posición vertical, inclinando el tubo. Nunca se debe introducir en la muestra, más de la tercera parte de la pipeta.

d) Incubar durante 24 ± 2 horas a $41^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

e) Realizar la observación del virado de coloración, considerando un color anaranjado intenso como positivo de la prueba correspondiente.

5.8 Aislamiento e identificación bioquímica de Salmonella spp.

a) El aislamiento y la identificación no son indispensables para la cuantificación de Salmonella spp., pero son necesarios como control para el laboratorio de que las bacterias fueron correctamente identificadas.

b) A partir de un cierto número de tubos positivos (con virado anaranjado), con la ayuda de un asa, sembrar por estría para obtener colonias aisladas sobre la superficie de placas de alguno de los medios diferenciales selectivos. Los medios utilizados pueden ser agar verde brillante, agar sulfito de bismuto, agar XLD, agar SS.

c) Incubar a 35°C durante 24 horas.

d) Observar los cultivos para identificar las colonias sospechosas para Salmonella spp. como sigue:

- agar verde brillante: colonias rojas o rosas rodeadas del medio rojo.

- agar bismuto de sulfito: colonias negras con o sin brillo metálico, rodeadas de un halo café que posteriormente se transforma en negro.
 - agar XLD: colonias rojas, generalmente presentan el centro negro.
 - agar SS: colonias translúcidas, transparentes u opacas y algunas veces con centro negro.
- e) Para la identificación bioquímica se seleccionan al menos 2 colonias típicas sospechosas de cada placa, que se encuentren bien aisladas.
- f) Tocar con un asa recta cada colonia e inocular por estría en una placa conteniendo agar nutritivo (u otro medio similar). Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- g) A partir de colonias perfectamente aisladas inocular 2 tubos, uno con agar triple azúcar y hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA), por estría en la superficie inclinada y por picadura en el fondo. Incubar a 35°C durante 24 horas.
- h) Observar el crecimiento en los tubos y considerar positivas las colonias que den las siguientes reacciones:
- agar TSI: en el fondo del tubo se observa virado color amarillo debido a la fermentación de la glucosa, en la superficie del medio se intensifica el color rojo. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la picadura, debido a la producción de H_2S .
 - agar LIA: se observa coloración púrpura en todo el tubo, en ocasiones se observa la producción de H_2S , con ennegrecimiento a lo largo de la picadura.
- i) Existen pruebas alternas cualitativas, aunque de mayor costo, que pueden ser empleadas como es el caso de la prueba miniaturizada API-20E y la confirmación serológica que permiten identificar la especie y el serotipo, respectivamente.
- j) Si el laboratorio lo prefiere es factible utilizar el caldo de selenito cistina como medio de enriquecimiento y el caldo de tetrationato como medio selectivo.

6. Cálculos

6.1 El NMP de Salmonella spp. se obtiene a partir del código compuesto por los tubos con resultado positivo en el caldo de selenito cistina. Si se inoculan tres series de tres tubos y se utilizan volúmenes decimales diferentes a los indicados en tablas, se obtienen el código formado por el número de tubos con resultados positivos en las tres series consecutivas, verificando el valor del NMP correspondiente, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{NMP} = (\text{NMP de tablas}) \times (10/\text{mayor volumen inoculado}) \quad (1)$$

Por ejemplo: en medio selenito cistina se obtuvo el código 3/3 para la serie de la dilución 0.1; 2/3 para la serie de la dilución 0.01 y 1/3 para la serie de la dilución 0.001.

El código es de 3, 2, 1 al consultar en las tablas obtenemos un valor de 150, el resultado es:

$$\text{NMP/g ST} = (150) \times (10/0.1) = 15\ 000 \quad (2)$$

$$\text{NMP/g ST} = 1.5 \times 10^4 \text{ Salmonella} \quad (3)$$

6.2 Cuando se inoculan más de tres volúmenes decimales, para la composición del código se utilizan los resultados positivos correspondientes a tres series consecutivas inoculadas.

6.3 En ocasiones algunos de los posibles resultados de tubos múltiples son omitidos de las tablas del NMP. Así los códigos como 0-0-3, 0-0-4 y 0-0-5 junto con muchos otros, no están incluidos. Ello se debe a que la probabilidad de su ocurrencia es muy baja. Si en un laboratorio dichos resultados improbables aparecen con una frecuencia mayor de 1%, es posible que se deban a procedimientos equivocados en el mismo, por lo que deben ser revisados. Cuando el código del NMP no aparezca en tablas, se utilizará la siguiente fórmula:

$$\text{NMP} = (\text{Número de tubos positivos} \times 100) / \sqrt{[(\text{mL muestra tubos neg.}) \times (\text{mL muestra total})]} \quad (4)$$

La frecuencia de obtención de resultados que no se encuentren en las tablas debe ser baja (menor 1%), de otra forma se tendrá que revisar y confirmar.

7. Expresión de resultados

7.1 La densidad de Salmonella spp. se expresa como NMP de coliformes por g de materia seca o ST, el cual se obtiene a partir de tablas ya establecidas, las cuales incluyen los límites de confianza al 95% para cada una de las combinaciones de tres (o cinco) series de tubos positivos posibles.

7.2 Para su utilización se proporcionan códigos formados por tres algoritmos correspondientes al número de tubos con resultados positivos en tres series consecutivas.

8. Informe de prueba

El informe de prueba incluye especificar los siguientes puntos:

- a) Todos los datos necesarios para la identificación completa de la muestra.
- b) Los resultados, expresados de acuerdo con lo establecido en el inciso 8.
- c) Cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis, así como cualquier operación no especificada en el método, o considerada opcional, que pueda haber influido en los resultados.

(RUBRICA).