

## SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

### **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.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SEMARNAT-2002, PROTECCION AMBIENTAL- LODOS Y BIOSOLIDOS.- ESPECIFICACIONES Y LIMITES MAXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES PARA SU APROVECHAMIENTO Y DISPOSICION FINAL.

CASSIO LUISELLI FERNANDEZ, Subsecretario de Fomento y Normatividad Ambiental de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, con fundamento en lo dispuesto en los artículos 32 Bis fracciones I, II, IV, V y 39 fracciones I, VIII y XXI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 8 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 5o. fracciones V y VI, 36, 37, 37 Bis, 119, 139 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; 5o. fracción VI y 6o. del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Impacto Ambiental; 38 fracción II, 40 fracciones I y X; 41, 43, 44 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28, 31 fracción II, 33 y 34 de su Reglamento, expide la siguiente 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, y

#### CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo establecido en la fracción I del artículo 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, con fecha 18 de febrero de 2002 se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, con carácter de proyecto la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-004-ECOL-2001, Protección ambiental- Lodos y biosólidos- Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final, con el fin de que dentro de los 60 días naturales siguientes a su publicación, los interesados presentaran sus comentarios ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, sito en bulevar Adolfo Ruiz Cortines número 4209, piso 5o., colonia Jardines en la Montaña, código postal 14210, Delegación Tlalpan, Distrito Federal o se enviaron al correo electrónico o al fax que para el efecto se señalaron. Durante el citado plazo, la Manifestación de Impacto Regulatorio correspondiente estuvo a disposición del público en general para su consulta en el citado domicilio, de conformidad con el artículo 47 fracción I del citado ordenamiento.

Que en el plazo de los 60 días antes señalado, los interesados presentaron sus comentarios al proyecto en cuestión, los cuales fueron analizados por el citado Comité, realizándose las modificaciones procedentes al mismo. La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales publicó las respuestas a los comentarios recibidos en el **Diario Oficial de la Federación** el día 18 de junio de 2003.

Que habiéndose cumplido con el procedimiento establecido en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, en sesión ordinaria de fecha 24 de septiembre de 2002, aprobó la 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. Por lo expuesto y fundado se expide la siguiente:

### **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SEMARNAT-2002, PROTECCION AMBIENTAL-LODOS Y BIOSOLIDOS -ESPECIFICACIONES Y LIMITES MAXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES PARA SU APROVECHAMIENTO Y DISPOSICION FINAL**

#### INDICE

0. Introducción
1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones

4. Especificaciones
5. Muestreo y métodos de prueba
6. Evaluación de la conformidad
7. Grado de concordancia con normas y lineamientos internacionales
8. Bibliografía
9. Observancia de esta Norma

#### **Anexos**

- I Opciones para la reducción de atracción de vectores
- II Método de muestreo de lodos y biosólidos
- III Método para la cuantificación de coliformes fecales en lodos y biosólidos
- IV Método para la cuantificación de *Salmonella spp.*, en lodos y biosólidos
- V Método para la cuantificación de huevos de helmintos en lodos y biosólidos
- VI Método para la cuantificación de metales pesados en biosólidos
- VII Contenido de la bitácora de control de lodos y biosólidos

#### **0. Introducción**

En las actividades de desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, así como en las correspondientes a la operación de las plantas potabilizadoras y de plantas de tratamiento de aguas residuales se generan volúmenes de lodos, que en caso de no darles una disposición final adecuada, contribuyen de manera importante a la contaminación de la atmósfera, de las aguas nacionales y de los suelos, afectando los ecosistemas del área donde se depositen.

Se ha considerado que los lodos por sus características propias o por las adquiridas después de un proceso de estabilización pueden ser susceptibles de aprovechamiento siempre y cuando cumplan con los límites máximos permisibles de contaminantes establecidos en la presente Norma Oficial Mexicana o, en su caso, se dispongan en forma definitiva como residuos no peligrosos; para atenuar sus efectos contaminantes para el medio ambiente y proteger a la población en general.

#### **1. Objetivo y campo de aplicación**

##### **1.1 Objetivo**

Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones y los límites máximos permisibles de contaminantes en los lodos y biosólidos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales, con el fin de posibilitar su aprovechamiento o disposición final y proteger al medio ambiente y la salud humana.

##### **1.2 Campo de aplicación**

Es de observancia obligatoria para todas las personas físicas y morales que generen lodos y biosólidos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

#### **2. Referencias**

Constancia de no peligrosidad de residuos, anteriormente trámite INE-04-007 modificada su homoclave el 29 de mayo de 2003, mediante el acuerdo por el que se dan a conocer todos los trámites y servicios inscritos en el Registro Federal de Trámites y Servicios que aplica la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, ahora procedimiento SEMARNAT-07-007.

NMX-B-231-1990, Cribas para la clasificación de materiales granulares, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 27 de diciembre de 1990.

#### **3. Definiciones**

Para efectos de la presente Norma Oficial Mexicana, se establecen las siguientes definiciones:

### 3.1 Aguas residuales

Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas.

### 3.2 Almacenamiento

Acción de mantener en un sitio los lodos y biosólidos, hasta su aprovechamiento o disposición final.

### 3.3 Aprovechamiento

Es el uso de los biosólidos como mejoradores o acondicionadores de los suelos por su contenido de materia orgánica y nutrientes, o en cualquier actividad que represente un beneficio.

### 3.4 Atracción de vectores

Es la característica de los lodos y biosólidos para atraer vectores como roedores, moscas, mosquitos u otros organismos capaces de transportar agentes infecciosos.

### 3.5 Biosólidos

Lodos que han sido sometidos a procesos de estabilización y que por su contenido de materia orgánica, nutrientes y características adquiridas después de su estabilización, puedan ser susceptibles de aprovechamiento.

### 3.6 Coliformes fecales

Bacterias patógenas presentes en el intestino de animales de sangre caliente y humanos. Bacilos cortos Gram negativos no esporulados, también conocidos como coliformes termotolerantes. Pueden identificarse por su tolerancia a temperaturas de 44°C-45°C. Tienen la capacidad de fermentar la lactosa a temperatura de 44.5°C. Incluyen al género *Escherichia* y algunas especies de *Klebsiella*.

### 3.7 Desazolve

La acción de extraer sólidos provenientes de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, no incluye los provenientes de las presas o vasos de regulación.

### 3.8 Digestión aerobia

Es la transformación bioquímica de la materia orgánica presente en los lodos, que es transformada en bióxido de carbono y agua por los microorganismos en presencia de oxígeno.

### 3.9 Digestión anaerobia

Es la transformación bioquímica de la materia orgánica presente en los lodos, que es transformada en gas metano y bióxido de carbono y agua por los microorganismos en ausencia de oxígeno disuelto y combinado.

### 3.10 Disposición final

La acción de depositar de manera permanente lodos y biosólidos en sitios autorizados.

### 3.11 Estabilización

Son los procesos físicos, químicos o biológicos a los que se someten los lodos para acondicionarlos para su aprovechamiento o disposición final para evitar o reducir sus efectos contaminantes al medio ambiente.

### 3.12 Estabilización alcalina

Es el proceso mediante el cual se añade suficiente cal viva (óxido de calcio CaO) o cal hidratada (hidróxido de calcio Ca(OH)<sub>2</sub>) o equivalentes, a la masa de lodos y biosólidos para elevar el pH.

### 3.13 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 huevos o larvas, infecciosas o no.

### 3.14 Huevos de helmintos viables

Huevos de helmintos susceptibles de desarrollarse e infectar.

### 3.15 La Secretaría

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

**3.16 Límite máximo permisible**

Valor asignado a un parámetro, el cual no debe ser excedido por los lodos y biosólidos para que puedan ser dispuestos o aprovechados.

**3.17 Lixiviado**

Líquido proveniente de los lodos y biosólidos, el cual se forma por reacción o percolación y que contiene contaminantes disueltos o en suspensión.

**3.18 Lodos**

Son sólidos con un contenido variable de humedad, provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales, que no han sido sometidos a procesos de estabilización.

**3.19 Mejoramiento de suelos**

Es la aplicación de los biosólidos en terrenos para mejorar sus características físicas, químicas o microbiológicas.

**3.20 Muestra**

Parte representativa de un universo o población finita, obtenida para conocer sus características.

**3.21 Parásito**

Organismo animal o vegetal que vive sobre o dentro de un individuo de otra especie.

**3.22 Patógeno**

Microorganismo capaz de causar enfermedades, si está presente en cantidad suficiente y condiciones favorables.

**3.23 *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<sub>2</sub>S). A menudo, son patógenos para el hombre y los animales cuando se ingieren, ocasionando fiebre tifoidea y enterocolitis (conocida también como gastroenteritis).

**3.24 Sistema de alcantarillado urbano o municipal**

Es el conjunto de obras y acciones que permiten la prestación de un servicio público de alcantarillado, incluyendo el saneamiento, entendiéndose como tal la conducción, tratamiento, alejamiento y descarga de las aguas residuales.

**3.25 Sólidos Totales (ST)**

Son los materiales residuales que permanecen en los lodos y biosólidos, que han sido deshidratados entre 103°C a 105°C, hasta alcanzar un peso constante y son equivalentes en base a peso seco.

**3.26 Sólidos Volátiles (SV)**

Son sólidos orgánicos totales presentes en los lodos y biosólidos, que se volatilizan cuando éstos se queman a 550°C en presencia de aire por un tiempo determinado.

**3.27 Tasa Específica de Absorción de Oxígeno (TEAO)**

Es la masa de oxígeno consumida por unidad de tiempo y por unidad de masa en peso seco de los sólidos totales de los lodos y biosólidos.

**3.28 Terrenos con fines agrícolas**

Son las superficies sobre las cuales se pueden cultivar productos agrícolas para consumo humano y animal, incluyendo los pastizales.

**4. Especificaciones**

**4.1** Las personas físicas o morales interesadas en llevar a cabo el aprovechamiento o disposición final de los lodos y biosólidos a que se refiere esta Norma Oficial Mexicana, deberá de recabar la "constancia de no peligrosidad de los mismos" en términos del trámite SEMARNAT-07-007.

**4.1.1** En el caso del proceso de estabilización alcalina, las muestras de lodos deben ser tomadas antes de ser sometidas a este proceso.

**4.2** Los lodos y biosólidos que cumplan con lo establecido en la especificación 4.1, pueden ser manejados como residuos no peligrosos para su aprovechamiento o disposición final como se establece en la presente Norma Oficial Mexicana.

**4.3** Para que los biosólidos puedan ser aprovechados, deben cumplir con la especificación 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8; y lo establecido en las tablas 1, 2 y 3 de la presente Norma Oficial Mexicana.

**4.4** Los generadores de biosólidos deben controlar la atracción de vectores, demostrando su efectividad. Para lo cual se pueden aplicar cualquiera de las opciones descritas, de manera enunciativa pero no limitativa, en el Anexo 1 u otras que el responsable demuestre que son útiles para ello. Se deben conservar los registros del control por lo menos durante los siguientes 5 (cinco) años posteriores a su generación.

**4.5** Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana los biosólidos se clasifican en tipo: excelente y bueno en función de su contenido de metales pesados; y en clase: A, B y C en función de su contenido de patógenos y parásitos.

**4.6** Los límites máximos permisibles de metales pesados se establecen en la tabla 1.

**TABLA 1**

**LIMITES MAXIMOS PERMISIBLES PARA METALES PESADOS EN BIOSOLIDOS**

<b>CONTAMINANTE (determinados en forma total)</b>	<b>EXCELENTES mg/kg en base seca</b>	<b>BUENOS mg/kg en base seca</b>
Arsénico	41	75
Cadmio	39	85
Cromo	1 200	3 000
Cobre	1 500	4 300
Plomo	300	840
Mercurio	17	57
Níquel	420	420
Zinc	2 800	7 500

**4.7** Los límites máximos permisibles de patógenos y parásitos en los lodos y biosólidos se establecen en la tabla 2.

**TABLA 2**

**LIMITES MAXIMOS PERMISIBLES PARA PATOGENOS  
Y PARASITOS EN LODOS Y BIOSOLIDOS**

<b>CLASE</b>	<b>INDICADOR BACTERIOLOGICO DE CONTAMINACION</b>	<b>PATOGENOS</b>	<b>PARASITOS</b>
		Coliformes fecales NMP/g en base seca	<i>Salmonella spp.</i> NMP/g en base seca
<b>A</b>	Menor de 1 000	Menor de 3	Menor de 1(a)
<b>B</b>	Menor de 1 000	Menor de 3	Menor de 10
<b>C</b>	Menor de 2 000 000	Menor de 300	Menor de 35

(a) Huevos de helmintos viables

NMP número más probable

**4.8** El aprovechamiento de los biosólidos, se establece en función del tipo y clase, como se especifica en la tabla 3 y su contenido de humedad hasta el 85%.

**TABLA 3**  
**APROVECHAMIENTO DE BIOSOLIDOS**

<b>TIPO</b>	<b>CLASE</b>	<b>APROVECHAMIENTO</b>
<b>EXCELENTE</b>	<b>A</b>	☞ Usos urbanos con contacto público directo durante su aplicación ☞ Los establecidos para clase B y C
<b>EXCELENTE O BUENO</b>	<b>B</b>	☞ Usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación ☞ Los establecidos para clase C
<b>EXCELENTE O BUENO</b>	<b>C</b>	☞ Usos forestales ☞ Mejoramientos de suelos ☞ Usos agrícolas

**4.9** La aplicación de los biosólidos en terrenos con fines agrícolas y mejoramiento de suelos se sujetará a lo establecido en la Ley Federal de Sanidad Vegetal y conforme a la normatividad vigente en la materia.

**4.10** Para la disposición final de los lodos y biosólidos, éstos deben cumplir con la especificación 4.1 y con los límites máximos permisibles para el contenido del indicador de contaminación, patógenos y parásitos especificados en la tabla 2, para clase C.

**4.11** Los sitios para la disposición final de lodos y biosólidos, serán los que autorice la autoridad competente, conforme a la normatividad vigente en la materia.

**4.12** Los lodos y biosólidos que cumplan con lo establecido en la presente Norma Oficial Mexicana, pueden ser almacenados hasta por un periodo de dos años. El predio en el que se almacenen debe ser habilitado para que no existan infiltraciones al subsuelo y contar con un sistema de recolección de lixiviados.

**4.13** Se permite la mezcla de dos o más lotes de lodos o biosólidos, siempre y cuando ninguno de ellos esté clasificado como residuo peligroso y su mezcla resultante cumpla con lo establecido en la presente Norma Oficial Mexicana.

**4.14 Muestreo y análisis de lodos y biosólidos**

El generador de lodos y biosólidos por medio de laboratorios acreditados debe realizar los muestreos y análisis correspondientes para demostrar el cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana y deberá conservar los registros por lo menos los siguientes 5 (cinco) años posteriores a su realización.

**4.15** La frecuencia de muestreo y análisis para los lodos y biosólidos se realizará en función del volumen de lodos generados como se establece en la tabla 4.

**TABLA 4**  
**FRECUENCIA DE MUESTREO Y ANALISIS**  
**PARA LODOS Y BIOSOLIDOS**

<b>Volumen generado por año (Ton/Año) en base seca</b>	<b>Frecuencia de muestreo y análisis</b>	<b>Parámetros a determinar</b>
Hasta 1,500	Una vez al año	Metales pesados, indicador bacteriológico de contaminación, patógenos y parásitos
Mayor de 1,500 hasta 15,000	Una vez por semestre	Metales pesados, indicador bacteriológico de contaminación, patógenos y parásitos
Mayor de 15,000	Una vez por trimestre	Metales pesados, indicador bacteriológico de contaminación, patógenos y parásitos

**4.16** El generador podrá quedar exento de realizar el muestreo y análisis de alguno o varios de los parámetros establecidos en la presente Norma Oficial Mexicana, siempre y cuando la detección de éstos sea en cantidades menores que los límites máximos establecidos, o cuando por la procedencia de los lodos y biosólidos éstos no contengan los contaminantes regulados en la presente Norma Oficial Mexicana, en ambos casos, deberá manifestarlo ante la Secretaría por escrito y bajo protesta de decir verdad. La autoridad se reserva el derecho de verificar dicha información.

**4.17** El generador deberá contar con una bitácora de control de lodos y biosólidos, de acuerdo a lo establecido en el Anexo VII.

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

Para el muestreo y determinación de los valores y concentraciones de los parámetros establecidos en esta Norma, se deberán aplicar los métodos de prueba establecidos en los anexos II, III, IV, V y VI de la presente Norma Oficial Mexicana.

## **6. Evaluación de la conformidad**

La evaluación de la conformidad de la presente Norma Oficial Mexicana se realizará a petición de parte, de conformidad a lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y su Reglamento.

El procedimiento de verificación se realizará por la PROFEPA o por las unidades de verificación y laboratorios acreditados y aprobados para llevar a cabo la verificación. En caso de que existan unidades de verificación acreditadas para la presente Norma, la verificación se realizará exclusivamente a través de las mismas.

## **7. Grado de concordancia con normas y lineamientos internacionales**

Esta Norma Oficial Mexicana no concuerda con ninguna norma o lineamiento internacional, tampoco existen normas mexicanas que hayan servido de base para su elaboración.

## **8. Bibliografía**

**8.1** A Guide to the Biosolids Risk Assessments for the EPA Part 503 Rule. EPA 832-B-93-005.

Environmental Protection Agency USA. September 1995. (Guía para la evaluación de riesgos en los biosólidos por la EPA. Parte 503, Reglamento EPA 832-B-93-005.- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América. Septiembre 1995).

**8.2** A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule. EPA/832/R-93/003. Environmental Protection Agency USA. September 1994. (Guía sencilla de la EPA. Parte 503 Biosólidos Reglamento EPA/832/R-93/003.- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América. Septiembre 1994).

**8.3** APHA, AWWA, WPCF. 1992 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Ed. American Public Health Association. Washington, D.C. (Métodos establecidos para el análisis de agua y agua residual. 18ava. Edición. Asociación Americana de Salud Pública. Washington, D.C.).

**8.4** Biosolids Treatment and Management. Processes for Beneficial Use. Marcel Dekker, Inc. 1996. (Tratamiento y Manejo de los Biosólidos.- Procesos para Uso Benéfico.- Marcel Dekker, Inc. 1996).

**8.5** Campos, R., Maya, C. y Jiménez, B. "Estabilización Térmica Alcalina de Lodos Químicos con un Alto Contenido de Microorganismos Patógenos". XIX Encuentro Nacional AMIDIQ, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. Memorias pp. 365-366, Ixtapa- Zihuatanejo, Gro., del 13 al 15 de mayo de 1998.

**8.6** Environmental Regulations and Technology. Use And Disposal Of Municipal Wastewater Sludge. EPA 625/10-84-003. Environmental Protection Agency USA. September 1984. (Tecnologías y Regulaciones Ambientales.- Uso y disposición de lodos de aguas municipales. EPA 625/10-84-003. Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América. Septiembre 1984).

**8.7** Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens in Municipal Wastewater Sludge. EPA/625/10-89/006. Environmental Protection Agency USA. September 1989. (Tecnologías y Regulaciones Ambientales.- Control de Patógenos en lodos de aguas municipales. EPA/625/10-89/006. Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América. Septiembre 1989).

**8.8** Fundamento técnico para la elaboración de la Norma Oficial Mexicana en materia de estabilización, manejo y aprovechamiento de lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas municipales e industriales. Instituto de Ingeniería de la UNAM. 1997.

**8.9** Geochemistry, Groundwater and Pollution. C.A.J. Appelo y D. Postma.- A.A. Balkema/Rotterdam/Brookfield/1996. (Geoquímica, aguas subterráneas y contaminación. C.A.J. Appelo y D. Postma.- A.A. Balkema/ Rotterdam/ Brookfield/ 1996).

**8.10** Goepfert, J., Olson, N. and Marth, E., 1968. Behavior of *Salmonella typhimurium* During Manufacture and Curing of Cheddar Cheese. Applied Microbiology. 16: 862-866. (Comportamiento de la *Salmonella typhimurium* durante el procesamiento y curado del queso Cheddar. Microbiología aplicada 16: 862-866).

**8.11** Ground Water, Quality Protection. Larry W. Canter, Robert C. Knox y Deborah M. Fairchild. Lewis Publishers, Inc. 198 (Aguas subterráneas, características de protección.- Larry W. Canter, Robert C. Knox y Deborah M. Fairchild. Lewis Publishers, Inc. 1987).

**8.12** Guía para el manejo, tratamiento y aprovechamiento de lodos residuales de plantas de tratamiento municipales. Comisión Nacional del Agua. SGIHUI. 1994.

**8.13** Guía para el manejo, estabilización y disposición de lodos químicos. Tema Potabilización. Comisión Nacional del Agua. SGIHUI. 1994.

**8.14** Jawetz, E., Melnick, J. y Adelberg, E., 1995. Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno. México. pp. 803.

**8.15** Jiménez B., Barrios, J.A. and Maya, C. 1999. Class B Biosolids Production from Wastewater Sludge with High Pathogenic Content Generated in an Advanced Primary Treatment. Disposal and Utilisation of Sewage Sludge: Treatment Methods and Application Modalities. Water Resources, Hydraulics and Maritime Engineering NTUA. Athens, Greece 13-15 October 1999 (Producción de biosólidos clase "B" de los lodos de aguas residuales con alto contenido patógeno generados en un tratamiento primario avanzado. Disposición y utilización de lodos residuales. Métodos de tratamiento y técnicas de aplicación. Recursos de agua, ingeniería marítima e hidráulica NTUA. Atenas, Grecia, 13-15 octubre 1999).

**8.16** Jiménez C.B., Muñoz C.A. M. y Barrios Pérez, J. A., 1997. Fundamento Técnico para la Elaboración de la Norma Oficial Mexicana en Materia de Estabilización, Manejo y Aprovechamiento de Lodos Provenientes de Plantas de Tratamiento de Aguas Municipales e Industriales. Elaborado para la Comisión Nacional del Agua (CNA) por el Instituto de Ingeniería, UNAM. Proyecto 8313, pp. 107 (diciembre, 1997).

**8.17** Jiménez, B., Chávez, A., Barrios, J.A., Maya, C. y Salgado, G., 1998. Manual "Curso: Determinación y Cuantificación de Huevos de Helminto Norma Mexicana NMX-AA-113-SCFI/992". Grupo Tratamiento y Reuso, Instituto de Ingeniería UNAM. pp. 160,

**8.18** Jiménez, B., Maya, C. y Pulido, M., 1996. Evaluación de las Diversas Técnicas para la Detección de los Huevos de Helminto, y Selección de una para Conformar la NMX Correspondiente. Instituto de Ingeniería, UNAM. México. pp. 52.

**8.19** Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. 1996.

**8.20** Manual of good practice for utilization of sewage sludge in agriculture. 2nd. Revision october 1991. Anglian Water. (Manual de buenas prácticas para la utilización de lodos residuales en la Agricultura.- 2a. Revisión octubre 1991. Agua).

**8.21** Miller, V. And Banwart, G., 1965. Effect of Various Concentration of Brilliant Green and Bile Salts on Salmonellae and Other Microorganisms. Applied Microbiology. 13: 77-80. (Efecto de varias concentraciones de sales de verde brillante y biliares en la *Salmonella* y otros microorganismos. Microbiología aplicada. 13: 77-80).

**8.22** Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL/1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. (**Diario Oficial de la Federación** 6 de enero de 1997).

**8.23** Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI/1993, Sistema General de Unidades de Medida. (**Diario Oficial de la Federación** 14 de octubre de 1993).

**8.24** Norma Oficial Mexicana NMX-AA-015-1985, Protección al Ambiente-Contaminación del Suelo-Residuos Sólidos Municipales -Muestreo-Método de Cuarteo-Environmental Protection-Soil Pollution-Municipal Solid Residues -Sampling-Quarter Method (**Diario Oficial de la Federación** 18 de marzo de 1985).

**8.25** Norma Mexicana NMX-AA-113-SCFI/1999, Análisis de Agua.- Determinación de Huevos de Helminto. Método de Prueba. (**Diario Oficial de la Federación** 5 de agosto de 1999).



- 8.26** Reglamento de lodos de clarificación. Alemania. 15 de abril de 1992.
- 8.27** Reglamentación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (U.S.E.P.A.) para el Uso o Aplicación de Lodos de Drenaje, Parte 503 del 40 CFR, publicada en el Federal Registry el 19 de febrero de 1993.
- 8.28** Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en materia de Residuos Peligrosos. (**Diario Oficial de la Federación** 25 de noviembre de 1988).
- 8.29** Santos Mendoza, Salvador. "Estabilización con Cal de Lodos de la Planta Piloto del Tratamiento Primario Avanzado". Ingeniería Ambiental, DEPMI- UNAM. 15 de junio de 1998. Tesis de Maestría.
- 8.30** Santos M., S., Campos M., R. y Jiménez C., B. "Una Opción de Manejo para el Lodo Generado al Tratar el Agua Residual del Gran Canal de la Ciudad de México. 1er. Simposio Latinoamericano de Tratamiento y Reuso del Agua y Residuos Industriales. Memorias Tomo I, pp. 28-1-28-10, del 25 al 29 de mayo de 1998, México, D.F.
- 8.31** Satchwell, G.M., 1986. An Adaptation of Concentration Techniques for the Enumeration of Parasitic Helminth Eggs from Sewage Sludge (Adaptación de la Técnica de Concentración para la Enumeración de Huevos de Helmintos Parásitos Provenientes de Lodos Residuales). *Water Res.* 20: 813-816.
- 8.32** Schaffner, C., Mosbach K., Bibit V. and Watson C., 1967. Coconut and *Salmonella* Infection. *Applied Microbiology.* 15: 471-475. (Infección de la *Salmonella* y coco. *Microbiología aplicada.* 15: 471-475).
- 8.33** Shiflett M., Lee J. and Sinnhuber, R., 1967. Effect of Food Additives and Irradiation on Survival of *Salmonella* in Oysters. *Applied Microbiology.* 15: 476-479. (Efecto de aditivos alimenticios e irradiación en la supervivencia de la *Salmonella* en ostras. *Microbiología aplicada.* 15: 476-479).
- 8.34** Silliker, J. Deibel, R. and Chiu, J., 1964. Occurrence of Gram-Positive Organisms Possessing Characteristics Similar to Those of *Salmonella* and the Practical Problem of Rapid and Definitive *Salmonella* Identification. *Applied Microbiology.* 12: 395-399. (Aparición de organismos Gram positivos, poseyendo características similares a la *Salmonella*, y el problema práctico de identificación rápida y definitiva de *Salmonella*. *Microbiología aplicada.* 12: 395-399).
- 8.35** Silliker, J., Deibel, R. and Fagan, P., 1964. Isolation of *Salmonella* from Food Samples: VI Comparison of Methods for the Isolation of *Salmonella* from Egg Products. *Applied Microbiology.* 12: 224-228. (Aislamiento de la *Salmonella* de muestras alimenticias: VI. Comparación de métodos para el aislamiento de la *Salmonella* desde productos de huevo. *Microbiología aplicada.* 12: 224-228).
- 8.36** Sludge Management & Disposal. For The Practicing Engineer. P.A. Vesilind, G.C., Hartman y E.T., Skene. Lewis Publishers, Inc. 1986. (Manejo y disposición de lodos. Para Ingenieros Profesionales. P.A. Vesilind, G.C. Hartman y E.T., Skene. Lewis Publishers, Inc. 1986).
- 8.37** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th. Edition. American Public Health Association. American Water Works Association. Water Environment Federation. 1995. (Métodos Estándar para la examinación del agua y aguas residuales, 19th. Edición Asociación Americana de salud pública. Asociación Americana de aguas tratadas. Federación Ambiental del Agua 1995).
- 8.38** Sludge Stabilization. Manual of Practice FD-9. Facilities Development. Water Environment Federation 1993. (Estabilización de lodos. Manual de prácticas FD-9. Facilidades de Desarrollo. Federación Ambiental del Agua 1993).
- 8.39** Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge; Final Rules. 40 CFR Parts 257, 403 and 503. Environmental Protection Agency. USA. Federal Register Friday February 19, 1993. (Estándares para el Uso o Disposición de lodos residuales, Reglamento 40 CFR Parte 257, 403 y 503. Agencia de Protección Ambiental de EUA. Registro Federal 19 de febrero de 1993).
- 8.40** Sludge Conditioning. Manual of Practice FD-14. Water Pollution Control Federation. 1988. Alexandria, VA. (Manual de prácticas de acondicionamiento de lodos FD-14. Federación para el control de la contaminación en el agua. 1988.) y Alejandría, V. A.
- 8.41** Stuart, P. and Pivnick, H., 1965. Isolation of *Salmonellae* by Selective Motility Systems Applied Microbiology 13: 365-372 (Aislamiento de la *Salmonella* por selectos sistemas de motilidad. *Microbiología aplicada* 13: 365-372).
- 8.42** Taylor, W., Betty, C. and Muriel, E., 1964. Comparison of Two Methods for Isolation of *Salmonella* from Imported Foods. *Applied Microbiology* 12: 53-56. (Comparación de dos métodos para el aislamiento de *Salmonella* de alimentos importados. *Microbiología aplicada.* 12: 53-56).

**8.43** US EPA 1994, Land Application of Sewage Sludge: A Guide for Land Appliers on the Requirements of the Federal Standards for the Use of Disposal of Sewage Sludge, 40 CFR Part 503. Water Environment Federation. USA. pp. 62. (Aplicación de lodos residuales al suelo: una Guía para aplicadores al suelo en los requerimientos de las normas federales para el uso y disposición de lodos residuales, 40 CFR Parte 503. Federación Ambiental del Agua. EUA. pp. 62).

**8.44** US EPA/625/R92/013 1992, Environmental Regulation and Technology, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge pp. 152. (Tecnología y Regulación Ambiental. Control de patógenos y atracción de vectores en lodos residuales).

## **9. Observancia de esta Norma**

**9.1** La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana corresponde a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, por conducto de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, así como a los gobiernos estatales, municipales y del Distrito Federal, en el ámbito de sus respectivas competencias. Las violaciones a la misma se sancionarán en los términos de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, sus reglamentos y demás ordenamientos jurídicos aplicables. La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, por conducto de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, así como los gobiernos estatales, municipales y del Distrito Federal, en el ámbito de su respectiva competencia, llevarán a cabo de manera periódica o aleatoria los muestreos y análisis de los lodos y biosólidos, con objeto de verificar el cumplimiento de los límites máximos permisibles de contaminantes establecidos en la presente Norma Oficial Mexicana.

## **TRANSITORIOS**

**PRIMERO.-** La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 60 días posteriores al de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

**SEGUNDO.-** Con fundamento en lo dispuesto en el artículo 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, provéase la publicación de este proyecto en el **Diario Oficial de la Federación**.

México, Distrito Federal, a los quince días del mes de abril de dos mil tres.- El Subsecretario de Fomento y Normatividad Ambiental de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, **Cassio Luiselli Fernández**.- Rúbrica.

## **ANEXO I**

### **OPCIONES PARA LA REDUCCION DE ATRACCION DE VECTORES**

Los responsables podrán aplicar cualquiera de las siguientes opciones para el control de atracción de vectores o cualquier otra que se demuestre que es efectiva.

#### **Opción 1: Reducción en el contenido de sólidos volátiles**

La atracción de vectores se reduce si la masa de sólidos volátiles en los biosólidos es reducida por lo menos un 38% durante su tratamiento. Este porcentaje es equivalente al conseguido mediante digestión aeróbica o anaeróbica más alguna reducción adicional que ocurra después de que los biosólidos salen de las instalaciones de estabilización, tales como el procesamiento en lechos de secado o lagunas o mediante el composteo.

#### **Opción 2: Digestión adicional de los biosólidos digeridos anaeróbicamente**

Frecuentemente, los biosólidos han sido reciclados a través del tratamiento biológico de las aguas residuales o han transitado durante largos periodos por los sistemas de alcantarillado. Durante este tiempo, sufren una degradación biológica sustancial. Si los biosólidos son subsecuentemente tratados mediante digestión anaerobia, su atracción de vectores será reducida adecuadamente. Debido a que ingresan al digestor parcialmente estabilizados, la reducción de sólidos volátiles después del tratamiento frecuentemente es menor de 38%. Bajo estas circunstancias, pudiera no ser factible la reducción de 38% requerida en la opción 1. La opción 2 permite al operador demostrar la reducción de atracción de vectores probando una porción de los biosólidos previamente digeridos en una unidad a escala de laboratorio. Se demuestra la reducción, si después de la digestión anaerobia de los biosólidos por 40 días adicionales, a una temperatura entre 30°C y 37°C, la reducción de los sólidos volátiles en los biosólidos es menor de 17%.

**Opción 3: Digestión adicional de los biosólidos digeridos aeróbicamente**

Esta opción es apropiada para los biosólidos digeridos aeróbicamente que no pueden cumplir con la opción 1, incluye a aquellos producidos por plantas de aireación extendida donde el tiempo mínimo de residencia para los biosólidos en el tren de aguas generalmente excede de 20 días. En estos casos, los biosólidos ya estarán sustancialmente degradados antes de la digestión aerobia.

Bajo esta opción, se considera que los biosólidos digeridos aeróbicamente con 2% de sólidos o menos, han logrado la reducción de atracción de vectores si después de 30 días de digestión aerobia en una prueba de laboratorio a 20°C, la reducción de los sólidos volátiles es menor de 15%. Esta prueba solamente es aplicable a los biosólidos líquidos digeridos aeróbicamente.

**Opción 4: Procesos aerobios a más de 40°C**

Esta opción se aplica primordialmente a los biosólidos composteados que también contienen agentes abultadores orgánicos parcialmente descompuestos. Los biosólidos deben ser tratados aeróbicamente por 14 días o más, tiempo durante el cual la temperatura deberá rebasar siempre los 40°C y el promedio será mayor de 45°C. Esta opción pudiera aplicarse a otros procesos aeróbicos, tales como la digestión aeróbica, sin embargo, las opciones 3 y 4 parecen más fáciles de cumplir para los otros procesos aeróbicos.

**Opción 5: Adición de materia alcalina**

Se considera que los biosólidos reducen adecuadamente su atracción de vectores si se adiciona suficiente materia alcalina para lograr lo siguiente:

- ☞ Elevar el pH por lo menos hasta 12, medido a 25°C, y sin añadir más materia alcalina, mantenerlo por 2 horas, y
- ☞ Mantener un pH de al menos 11,5 sin la adición de más materia alcalina durante otras 22 horas.

Estas condiciones tienen la intención de asegurar que los biosólidos puedan ser almacenados por lo menos durante varios días en las instalaciones de tratamiento, transportados y posteriormente aplicados sin que el pH descienda a niveles en los que ocurre la putrefacción y se atraen vectores.

**Opción 6: Reducción en la humedad de biosólidos que no contienen sólidos sin estabilizar**

Se considera que la atracción de vectores se reduce si los biosólidos no contienen sólidos sin estabilizar generados durante el tratamiento primario y su contenido de sólidos es por lo menos del 75% antes de ser mezclados con otros materiales. Por consiguiente, la reducción debe lograrse removiendo agua y no mediante la adición de materiales inertes.

Es importante que los biosólidos no contengan sólidos sin estabilizar porque los desechos de comida parcialmente degradados que seguramente existen en tales biosólidos atraerían a pájaros, algunos mamíferos y posiblemente a insectos a un si el contenido de sólidos es mayor del 75%.

**Opción 7: Reducción en la humedad de biosólidos que contienen sólidos no estabilizados**

Se considera que la habilidad para atraer vectores de cualesquier biosólido se reduce adecuadamente si su contenido de sólidos se incrementa al 90% o más sin importar si se trata de biosólidos provenientes del tratamiento primario. El incremento debe conseguirse removiendo agua y no mediante la dilución con sólidos inertes. El secado hasta este punto limita severamente la actividad biológica y destroza o descompone los compuestos volátiles que atraen vectores.

La manera en que se manejan los biosólidos secos, incluyendo su almacenamiento antes de la aplicación puede propiciar la atracción de vectores. Si éstos se exponen a una humedad alta, la superficie exterior tendrá un alto contenido de humedad y posiblemente atraerá vectores. Esto debe ser prevenido adecuadamente.

**Opción 8: Tasa específica de absorción de oxígeno (TEAO) para biosólidos digeridos aeróbicamente**

Frecuentemente, los biosólidos digeridos aeróbicamente son circulados a través de los procesos biológicos de tratamiento aeróbico de las aguas residuales hasta por 30 días. En estos casos, los biosólidos que entran al digestor aeróbico ya están parcialmente digeridos, lo cual dificulta cumplir con la Opción 1.

La Tasa Específica de Absorción de Oxígeno (TEAO) es la masa de oxígeno consumida por unidad de tiempo y por unidad de masa en peso seco de los sólidos totales de los biosólidos. La reducción en la atracción de vectores puede demostrarse si la TEAO de los biosólidos que son aplicados, determinada a 20°C, es igual o menor de 1,5 mg de O<sub>2</sub>/h/g de sólidos totales (peso seco).

Esta prueba se basa en el hecho de que, si los biosólidos consumen muy poco oxígeno, su valor como fuente alimenticia para los microorganismos es muy baja como para atraerlos. Se pueden utilizar otras temperaturas para la prueba si los resultados se corrigen sobre la base de 20°C. Esta prueba solamente es aplicable a los biosólidos aeróbicos.

#### **Opción 9: Incorporación de biosólidos al suelo**

Los biosólidos deben ser incorporados al suelo dentro de las 6 horas posteriores a su aplicación sobre el terreno. La incorporación se consigue arando o mediante algún otro método que mezcle los biosólidos con el suelo. Si los biosólidos son Clase A con respecto a patógenos, el tiempo entre la aplicación y el procesado no debe exceder de 8 horas.

### **ANEXO II**

#### **MÉTODOS DE MUESTREO DE LODOS Y BIOSOLIDOS**

Consiste en obtener una porción del volumen generado, la cual debe conservar la integridad de todos sus constituyentes desde el momento en que es tomada la muestra (parte representativa de un universo o población finita obtenida para conocer sus características) y hasta el final de su análisis o determinación en el laboratorio. El tiempo en que éstas permanecen estables dependerá de sus características y método de preservación utilizado. El muestreo constituye una parte integral y fundamental para evaluar la calidad de los lodos y biosólidos, para su depósito final.

El tamaño y número de muestras dependen de las fuentes generadoras, así como de los procesos utilizados para su estabilización. Es importante considerar la selección del sitio de muestreo, la homogeneidad y representatividad de la muestra, el grado de degradación, el volumen, tipo de análisis y la accesibilidad al sitio seleccionado para el muestreo.

#### **1. Método**

Obtener muestras representativas de lodos y biosólidos para determinar su contenido de Coliformes fecales, *Salmonella* spp., huevos de helmintos, tasa específica de absorción de oxígeno, contenido de sólidos totales y sólidos volátiles, arsénico, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel y zinc.

##### **1.1 Equipo y materiales**

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

##### **1.1.1 Equipo.**

**1.1.1.1** Báscula con capacidad mínima de 100 kg y precisión de 10 g.

**1.1.1.2** Báscula con capacidad mínima de 10 kg y precisión de 1 g.

**1.1.1.3** Criba M 2.00 según Norma Mexicana NMX-B-231-1990.

##### **1.1.2 Materiales .**

**1.1.2.1** Bieldos.

**1.1.2.2** Bolsas de polietileno de 0,70 m x 0,50 m y calibre mínimo del No. 200.

**1.1.2.3** Bolsas de polietileno de 1,10 m x 0,90 m y calibre mínimo del No. 200.

**1.1.2.4** Botas de hule.

**1.1.2.5** Brocha de tamaño adecuado para la limpieza.

**1.1.2.6** Cascos de seguridad.

**1.1.2.7** Escobas.

**1.1.2.8** Guantes de carnaza.

**1.1.2.9** Ligas de hule de 1,5 mm de ancho.

**1.1.2.10** Marcadores de tinta permanente, preferentemente color negro.

**1.1.2.11** Mascarillas protectoras.

**1.1.2.12** Overoles.

**1.1.2.13** Papelería y varios (formatos de muestreo, lápices, gomas y otros).

**1.1.2.14** Papelería y varios (informe de campo, marcadores, ligas, etc.).

**1.1.2.15** Palas curvas.

**1.1.2.16** Recogedores.

**1.1.2.17** Tablas de inventario, tamaño carta u oficio.

**1.1.2.18** Tambos metálicos de forma cilíndrica, con capacidad de 20 L.

**1.1.2.19** Bolsas de polietileno estéril sin pastilla de tiosulfato o recipientes de polietileno o propileno inerte, de boca ancha y con tapa y cierre hermético, de 500 ml de capacidad y susceptibles de ser esterilizados en autoclave, para coliformes fecales.

**1.1.2.20** Recipientes de polietileno o propileno inerte o de vidrio, de boca ancha y con tapa y cierre hermético, de 50 ml, para metales.

**1.1.2.21** Recipientes de polietileno o propileno inerte, de boca ancha y con tapa y cierre hermético, de 500 ml de capacidad, para huevos de helmintos, sólidos y TEAO.

## **2. Tipos de lodos**

### **2.1. Muestras líquidas o semisólidas**

Colectar la muestra directamente del vertedor en un recipiente de plástico de 20 L, hasta obtener el doble del volumen por utilizar para cada uno de los análisis por realizar, como mínimo.

#### **2.1.1 Tuberías**

Colectar la muestra directamente de la tubería a través del grifo de purga que presente un diámetro interno mínimo de 3,8 cm.

#### **2.1.2 Canales**

Colectar la muestra en el vertedor o en otro punto donde el lodo esté bien mezclado.

#### **2.1.3 Digestores**

Colectar la muestra de un tanque mezclado que es alimentado a través de líneas provenientes de diferentes niveles en el digestor. Antes del muestreo asegurarse de eliminar el lodo acumulado previamente en las líneas.

#### **2.1.4 Tanques**

Mezclar completamente el tanque y colectar varias muestras a diferentes profundidades y puntos. Juntar todas las muestras en una sola antes de realizar el análisis.

#### **2.1.5 Lodos de sitios específicos en plantas de tratamiento**

Los siguientes puntos de muestreo se recomiendan para el muestreo de lodo en plantas de tratamiento de agua residual.

#### **2.1.6 Lodo primario**

Conducir el lodo desde el tanque de estabilización hasta el cárcamo antes del bombeo, mezclar perfectamente y colectar una muestra representativa en este punto. Alternativamente colectar muestras de la bomba de lodos y de las tuberías, cercanas a éstas.

#### **2.1.7 Lodo activado**

Colectar muestras en:

- a)** cárcamo de bombeo
- b)** de la bomba o tubería adyacente
- c)** del punto de descarga de los lodos de retorno al afluente primario

El punto de muestreo se debe localizar en una región de buena agitación para la suspensión de sólidos.

#### **2.1.8 Lodo digerido**

Colectar muestras en la tubería de descarga del digestor al equipo o lechos de secado.

**2.1.9 Lodos del lecho de secado**

Colectar muestras del mismo tamaño en diferentes puntos del lecho sin incluir arena. Mezclar totalmente.

**2.1.10 Lodo filtrado**

Colectar porciones del mismo tamaño (utilizar cortadores de galletas) en la descarga del filtro.

**2.1.11 Azolves**

Para el caso de los azolves, aplica cuando ha sido extraída una muestra representativa de la zona donde se encuentran depositados.

**2.2 Muestras sólidas**

Para conformar las muestras se usa el método del cuarteo. Para eso:

Se toman de 4 a 8 bolsas de polietileno de 0,70 m x 0,50 m o 1,10 m x 0,90 m, se selecciona al azar el mismo número de sitios diferentes. Posteriormente, se llena cada una de las bolsas con el material de cada sitio y se trasladan a un área plana horizontal de aproximadamente 4 m x 4 m, preferentemente de cemento pulido o similar y bajo techo y se deposita su contenido en montículo.

Traspalear el material con pala o biello, para obtener una mezcla homogénea. A continuación, dividir en cuatro partes aproximadamente iguales A, B, C y D y eliminar las partes opuestas A y C o B y D. Repetir esta operación hasta dejar 10 kg aproximadamente de lodo o biosólido. La pila resultante sirve para determinar en el laboratorio el contenido de Coliformes fecales, *Salmonella ssp.*, huevos de helmintos, contenido de sólidos totales y sólidos volátiles, arsénico, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel y zinc. El material restante se usa para determinar el peso volumétrico de los lodos *in situ*, conforme al punto 8.

Trasladar la muestra al laboratorio en bolsas de polietileno debidamente selladas e identificadas (véase marcado). Evitar que queden expuestas al sol durante su transporte, además tener cuidado en el manejo de la bolsa que contiene la muestra para que no sufra ninguna ruptura. El tiempo máximo de transporte de la muestra al laboratorio, no debe exceder de 8 horas.

**3. Preparación de la muestra**

La secuencia del muestreo por parámetro se debe realizar conforme con lo descrito en los puntos correspondiente con el propósito de minimizar sesgos en los resultados.

**4. Recipientes para cada parámetro**

A la muestra, antes de ser procesada, se le determinará el contenido de sólidos totales en por ciento en peso, para el caso del TEAO el contenido de éstos deberá ser menor o igual al 2%.

**4.1 Coliformes fecales y *Salmonella spp.***

Los recipientes de polietileno o polipropileno inerte de 500 ml de capacidad, antes del muestreo deben ser esterilizados preferentemente en autoclave. Posteriormente, se deposita la muestra que corresponda a 4 g de sólidos totales. Etiquetarlos y mantenerlos en refrigeración hasta su análisis.

**4.2 Huevos de helmintos, Sólidos totales y Sólidos volátiles y TEAO**

Los recipientes de polietileno o polipropileno inerte de 500 ml de capacidad, antes de la toma de muestra deben ser enjuagados primero con agua potable a chorro y luego con agua destilada.

Para el caso de huevos de helmintos, se toma el peso en fresco que corresponda a 2 g de sólidos totales. Para el caso de sólidos totales y volátiles y TEAO se llenan los recipientes hasta un 75% de su capacidad total, se cierran, etiquetan y mantienen en refrigeración, hasta su análisis, excepto para TEAO que se mantiene a temperatura ambiente.

**4.3 Compuestos inorgánicos: arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc**

El recipiente de polietileno o polipropileno inerte de vidrio de 50 ml de capacidad, antes de la toma de muestra se debe enjuagar primero con agua potable a chorro y luego destilada.

Posteriormente, se deposita la muestra hasta el total de la capacidad, se cierra, se etiqueta y se mantiene en refrigeración hasta su análisis.

#### 4.4 Preservación y almacenamiento de la muestra

La preservación y tiempo máximo para el análisis de cada uno de los parámetros es la siguiente:

PARAMETROS	PRESERVACION *	TIEMPO MAXIMO DE ANALISIS
Coliformes fecales y <i>Salmonella</i> spp.	4°C	48 horas
Huevos de helmintos	4°C	30 días
Arsénico, cadmio, cobre, cromo, níquel, plomo y zinc	4°C	180 días
Mercurio	4°C	13 días <sup>a</sup> (plástico) 38 días <sup>b</sup> (vidrio)
Sólidos totales	4°C	24 horas
Sólidos volátiles	4°C	24 horas
Tasa específica de absorción de oxígeno **	No requiere	Inmediato

\*A partir de su toma y hasta antes de iniciar el análisis, la muestra debe mantenerse en refrigeración.

\*\*Si la muestra es tomada en el laboratorio, debe mantenerse la temperatura constante o ambiente durante el transporte y analizarla inmediatamente.

#### 5. Control de calidad

El programa de muestreo debe operar un sistema control de la calidad.

5.1 El responsable del muestreo debe mantener los registros de los nombres y títulos de los técnicos que realizaron el muestreo y el del encargado de control de calidad que verificó los mismos y las bitácoras o formatos en los que se contengan cuando menos la siguiente información:

- a) Identificación de la muestra.
- b) Cantidad de muestra utilizada.
- c) Tipo de muestra.
- d) Tipo de análisis a realizar.
- e) Además, debe mantener la información original reportada por el personal técnico que intervino en el muestreo, traslado y recepción de las muestras, así como de la información complementaria.

#### 6. Etiquetado

La muestra se identifica con una etiqueta, la cual debe contener la siguiente información:

- ☞ Localidad, Municipio y Estado.
- ☞ Fecha y hora del cuarteo.
- ☞ Condiciones climatológicas.
- ☞ Cantidad de lodos tomados para el cuarteo, en kg.
- ☞ Cantidad de lodos obtenidos para la selección en subproductos, en kg.
- ☞ Datos del responsable del cuarteo.
- ☞ Observaciones.

#### 7. Cálculos

7.1 Para determinar el peso volumétrico del lodo se utilizan recipientes limpios, sin abolladuras. La báscula empleada deberá estar nivelada.

7.2 A continuación se pesa el recipiente vacío, tomando este peso como la tara del recipiente. Se llena hasta el tope con el lodo homogeneizado obtenido de las partes eliminadas del primer cuarteo (descrito anteriormente).

**7.3** El recipiente se golpea contra el suelo tres veces dejándolo caer desde una altura de 10 cm. Llenar hasta el tope teniendo cuidado de no presionar al colocarlo en el recipiente; esto con el fin de no alterar el peso volumétrico que se pretende determinar.

**7.4** Es importante vaciar dentro del recipiente todo el material, sin descartar los finos. Para obtener el peso neto del lodo, se pesa el recipiente con éstos y se resta el valor de la tara. Cuando no se tenga suficiente cantidad de material para llenar el recipiente se marca en éste la altura alcanzada y se determina dicho volumen.

El peso volumétrico del lodo se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$P_v = P/V \quad (1)$$

donde:

P<sub>v</sub>: Peso volumétrico del lodo, en kg/m<sup>3</sup>

P: Peso del lodo (peso bruto menos tara), en kg

V: Volumen del recipiente, en m<sup>3</sup>

## 8. Interferencias

Colectar las muestras en el momento cuando el parámetro a analizar es inestable, por ejemplo la Tasa Específica de Absorción de Oxígeno (TEAO), o cuando se requiere realizar lo antes posible el análisis (por ejemplo el análisis microbiológico).

## ANEXO III

### METODO PARA LA CUANTIFICACION DE COLIFORMES FECALES EN LODOS Y BIOSOLIDOS

El presente método establece la técnica para llevar a cabo la cuantificación del grupo coliformes fecales en lodos y biosólidos, con el fin de evaluar la calidad y la eficiencia de los diferentes tratamientos, y es aplicable para la evaluación de la calidad de lodos y biosólidos.

#### 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. Muestreo, preparación y acondicionamiento de la muestra

El muestreo constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de evaluación de calidad de lodo.

**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/cm<sup>2</sup> 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.).**

<b>Fórmula</b>	
Triptosa	20,00 g
Lactosa	05,00 g
Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ )	02,75 g
Fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ )	02,75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	05,00 g
Lauril sulfato de sodio	00,10 g
Púrpura de bromocresol	00,01 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  $\pm$  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.).**

<b>Fórmula</b>	
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  $\pm$  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**

<b>Fórmula</b>	
Lactosa	5,00 g
Triptosa	20,00 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,00 g
Salicina	0,50 g
Eter 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-isooctifenil de polietilenglicol.

Verificar que el pH sea de  $6,9 \pm 0,1$ , 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  $121^{\circ}\text{C}$  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	05,00 g
Mezcla de sales biliares	1,50 g
Fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	4,00 g
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,50 g
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  $6,9 \pm 0,2$ , 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  $121^{\circ}\text{C}$ , 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 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	34,00 g
Agua destilada	1 000,00 ml

Disolver el fosfato monopotásico en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a  $7,2 \pm 0,2$  con la solución de hidróxido de sodio 1 N y aforar a 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos y almacenar en refrigeración (entre  $2$  y  $4^{\circ}\text{C}$ ). 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  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración (entre  $2$  y  $4^{\circ}\text{C}$ ). 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  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

**5.1.8** Solución de hidróxido de sodio 0,1 N

<b>Fórmula</b>	
Hidróxido de sodio (NaOH)	04,00 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<sub>2</sub> para abatir la carbonatación de la solución. Almacenar en frasco con tapón de rosca.

**5.1.9** Solución de hidróxido de sodio 1 N

<b>Fórmula</b>	
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<sub>2</sub> 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

**a)** 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<sup>-1</sup>.

**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** Preparación de diluciones

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

**a)** Se preparan diluciones decimales seriadas a partir del homogeneizado resultante (10<sup>-1</sup>) lo antes posible, reduciendo al mínimo la sedimentación. Transferir 1 ml en 9 ml de agua de dilución (10<sup>-2</sup>) y así sucesivamente hasta obtener la dilución deseada.

**b)** 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.

**c)** 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.

**d)** 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.

**a)** 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.

**b)** 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.

**c)** 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)

**a)** 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.

**b)** 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.

**c)** 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)

**a)** 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.

**b)** Examinar cada tubo a las 24 ± 2 horas.

**c)** 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:

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

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:

$$\text{NMP/g ST} = (150) \times (10/0,01) = 150\ 000 \quad (2)$$

$$\text{NMP/g ST} = 1,5 \times 10^5 \text{ coliformes fecales} \quad (3)$$

**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:

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

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 IV**

### **METODO PARA LA CUANTIFICACION DE *Salmonella spp.* EN LODOS Y BIOSOLIDOS**

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 lodos y biosólidos, con el fin de evaluar su calidad y la eficiencia de los tratamientos de los mismos. Este método es aplicable para la evaluación de la calidad de los lodos y biosólidos.

#### **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. Muestreo, preparación y acondicionamiento de la muestra**

El muestreo constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de evaluación de calidad del lodo, por lo cual, éste deberá efectuarse de acuerdo a lo referido en el Anexo II de esta Norma.

**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 Tetracionato.

**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 Erlenmeyer 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/cm<sup>2</sup>, 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 tetratonato**

<b>Fórmula</b>	
Proteosa peptona o triptona	05,00 g
Sales biliares	01,00 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**

<b>Fórmula</b>	
Triptona o polipeptona	05,00 g
Lactosa	04,00 g
Fosfato disódico	10,00 g
Selenito ácido de sodio	04,00 g
L- Cistina	00,01 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  $7,0 \pm 0,2$ , 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**

<b>Fórmula</b>	
Extracto de carne de res	05,00 g
Peptona	10,00 g
Glucosa	05,00 g
Fosfato disódico (anhidro)	04,00 g
Sulfato ferroso (anhidro)	00,30 g
Sulfito de bismuto	08,00 g
Verde brillante	00,025 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  $7,6 \pm 0,2$ , 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)**

<b>Fórmula</b>	
Xilosa	03,75 g
L Lisina	05,00 g
Lactosa	07,50 g
Sacarosa	07,50 g
Cloruro de sodio	05,00 g
Extracto de levadura	03,00 g
Rojo de fenol	00,08 g
Agar	15,00 g
Tiosulfato de sodio	06,80 g
Desoxicolato de sodio	02,50 g
Citrato de hierro y amonio	00,80 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  $6,9 \pm 0,2$ , 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)**

<b>Fórmula</b>	
Extracto de levadura	03,00 g
Proteosa peptona número 3 polipeptona	10,00 g
Cloruro de sodio	05,00 g
Lactosa	10,00 g
Sacarosa	10,00 g
Rojo de fenol	00,08 g
Verde brillante	00,012 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  $6,9 \pm 0,1$  en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 12 minutos, cualquier sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar a no menos de  $50^{\circ}\text{C}$  pero debajo de  $60^{\circ}\text{C}$  y distribuir en cajas de Petri estériles.

**5.1.6 Agar S.S.**

<b>Fórmula</b>	
Extracto de carne	05,00 g
*Polipeptona	05,00 g
Lactosa	10,00 g
Sales biliares	08,50 g
Citrato de sodio	08,50 g
Tiosulfato de sodio	08,05 g
Citrato férrico	01,00 g
Agar	13,50 g
Verde brillante solución al 0,1%	00,33 g
Rojo neutro	00,25 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  $7,0 \pm 0,2$ , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Enfriar a no menos de  $50^{\circ}\text{C}$  pero debajo de  $60^{\circ}\text{C}$  y distribuir en cajas Petri estériles.

**5.1.7 Agar nutritivo\*\***

<b>Fórmula</b>	
Extracto de carne	03,00 g
Peptona	05,00 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  $6,8 \pm 0,2$ , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Dejar enfriar a no menos de  $50^{\circ}\text{C}$  y debajo de  $60^{\circ}\text{C}$  y distribuir en cajas Petri estériles.

#### 5.1.8 Agar triple azúcar hierro (TSI)

Fórmula	
Polipeptona	20,00 g
Cloruro de sodio	05,00 g
Lactosa	10,00 g
Sacarosa	10,00 g
Glucosa	01,00 g
Sulfato ferroso amónico	00,20 g
Tiosulfato de sodio	00,20 g
Rojo de fenol	00,025 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 1 L de agua destilada; mezclar perfectamente y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta su completa disolución. Verificar que el pH sea de  $6,9 \pm 0,2$ , en caso contrario ajustarlo con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Enfriar a  $60^{\circ}\text{C}$  y distribuir en volúmenes de 4 ml en tubos de rosca y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  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	05,00 g
Extracto de levadura	03,00 g
Glucosa	01,00 g
L Lisina	10,00 g
Citrato férrico amónico	00,50 g
Tiosulfato de sodio	00,04 g
Púrpura de bromocresol	00,02 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  $6,7 \pm 0,2$ , en caso contrario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Enfriar a no menos de  $50^{\circ}\text{C}$  pero debajo de  $60^{\circ}\text{C}$  y distribuir en volúmenes de 4 ml en tubos de rosca, para esterilizar en presión a  $121^{\circ}\text{C}$  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 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	34,00 g
Agua destilada	1 000,00 ml

Disolver el fosfato monopotásico en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a  $7,2 \pm 0,2$  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  $1,05 \text{ kg/cm}^2$  y una temperatura de  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración entre  $2$  y  $4^\circ\text{C}$ .

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  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración entre  $2$  y  $4^\circ\text{C}$ . 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  $1,05 \text{ kg/cm}^2$  y una temperatura de  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

#### 5.1.13 Solución de hidróxido de sodio 0,1 N

Fórmula	
Hidróxido de sodio (NaOH)	04,00 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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  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	06,00 g
Yoduro de potasio	06,00 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  $22 \pm 2$  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 subsecuentes.

**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  $24 \pm 2$  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  $35^{\circ}\text{C}$  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  $35^{\circ}\text{C}$  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  $\text{H}_2\text{S}$ .
- ☞ agar LIA: se observa coloración púrpura en todo el tubo, en ocasiones se observa la producción de  $\text{H}_2\text{S}$ , 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:

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

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.

## ANEXO V

### METODO PARA LA CUANTIFICACION DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSOLIDOS

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 lodos y biosólidos, con el fin de evaluar la calidad de estos subproductos y la eficiencia de los sistemas de tratamiento a los que están sujetos.

#### 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 lodos.

#### 2. Muestreo, preparación y acondicionamiento de la muestra

El muestreo constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de evaluación de calidad del lodo, por lo cual, éste deberá efectuarse de acuerdo con lo referido en el punto 5 de esta Norma.

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, para todo tipo de lodos.

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 ( $\text{C}_2\text{H}_5.\text{OCOOCH}_3$ ) (opcional).
- 3.1.2 Acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (opcional).
- 3.1.3 Acido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (opcional).
- 3.1.4 Acido sulfúrico 0,1 N ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).
- 3.1.5 Alcohol etílico ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ).
- 3.1.6 Agua destilada.
- 3.1.7 Eter etílico.
- 3.1.8 Hipoclorito de sodio 10% ( $\text{NaClO}$ ).
- 3.1.9 Formaldehído 37% (opcional).
- 3.1.10 Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

**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  $\mu$ m (milimicras) de poro (opcional).

**3.2.17** Tamiz de 150 a 170  $\mu$ m (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/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>3</sup>.

**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 procesado 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 freso 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  $\mu$ m). 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  $\mu$ m 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  $26^\circ C \pm 0,2^\circ C$ . 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:

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

## 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 VI

### METODO PARA LA CUANTIFICACION DE METALES PESADOS EN BIOSOLIDOS

El presente método tiene por objeto establecer la técnica para la determinación de arsénico, cadmio, cobre, cromo, plomo, mercurio, níquel y zinc, en muestras de biosólidos, por espectrofotometría de absorción atómica, donde el análisis de los elementos se efectúa individualmente.

#### 1. Principio

El método analítico se basa en la atomización de la muestra para liberar los átomos, a los que se les aplica una energía de una longitud de onda específica que es absorbida e induce al electrón a pasar a un estado excitado. Esta energía absorbida es proporcional a la concentración del elemento en la muestra analizada.

**2. Reactivos y materiales****2.1 Reactivos**

**2.1.1** Acido clorhídrico grado suprapuro.

**2.1.2** Acido nítrico grado suprapuro.

**2.1.3** Acido nítrico.

**2.1.4** Acido perclórico grado suprapuro.

**2.1.5** Acido sulfúrico grado suprapuro.

**2.1.6** Acetona.

**2.1.7** Agua tipo II, que tiene las siguientes características: resistividad mayor de 10  $\Omega\text{-cm}$  a 25°C y conductividad menor de 0,1 S/cm a 25°C. En lo subsiguiente se le llamará agua.

**2.1.8** Aire comprimido seco y limpio.

**2.1.9** Borohidruro de sodio.

**2.1.10** Cadmio metálico.

**2.1.11** Cloruro de mercurio.

**2.1.12** Cloruro de potasio.

**2.1.13** Cloruro o sulfato estanoso.

**2.1.14** Cobre metálico.

**2.1.15** Detergente no iónico, libre de metales .

**2.1.16** Gases: acetileno, nitrógeno, grado absorción atómica.

**2.1.17** Hexano.

**2.1.18** Hidróxido de sodio.

**2.1.19** Níquel metálico.

**2.1.20** Nitrato de plomo.

**2.1.21** Oxido de lantano.

**2.1.22** Permanganato de potasio.

**2.1.23** Soluciones estándar de referencia certificada de arsénico, cadmio, cobre, cromo, plomo, níquel, mercurio y zinc, de 100 ppm.

**2.1.24** Trióxido de arsénico.

**2.1.25** Trióxido de cromo.

**2.1.26** Zinc metálico.

**2.2 Materiales**

**2.2.1** Crisoles de platino de 40 a 50 ml de capacidad.

**2.2.2** Cápsula de porcelana de 50 ml de capacidad.

**2.2.3** Embudos de filtración de diferentes capacidades.

**2.2.4** Goteros.

**2.2.5** Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.

**2.2.6** Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

**2.2.7** Membranas de ruptura.

**2.2.8** Micropipetas o pipetas Eppendorf de diferentes capacidades.

**2.2.9** Papel filtro Whatman número 40.

- 2.2.10 Pipetas volumétricas de varias capacidades.
- 2.2.11 Puntas de plástico para micropipetas.
- 2.2.12 Recipientes de polietileno, propileno o de vidrio de 50 ml.
- 2.2.13 Vasos de precipitado de diferentes capacidades.
- 2.2.14 Vaso de teflón de 100 ml.
- 2.2.15 Vidrio de reloj.

Todo el material volumétrico utilizado por este método debe ser clase A y ser de uso exclusivo para este procedimiento.

### 3. Equipo

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

3.1 Balanza analítica con intervalo de medición de 0,0001 a 80 g? 0,0001 g

3.2 Para la digestión de las muestras:

- a) Parrilla de calentamiento con regulador.
- b) Horno de microondas, capaz de liberar de 575 W a 1 000 W de potencia. El incremento de la potencia debe ser mínimo 1%/s sistema de control de presión dentro de cada uno de los vasos y sistema de ventilación de 2,8 m<sup>3</sup>/minuto.
- c) Horno con intervalo de temperatura de 0-160°C.
- d) Autoclave con válvula de seguridad que se abra a 15 lb y un manómetro para indicar la presión interna.

3.3 Espectrofotómetro de absorción atómica, con lo siguiente:

- a) Sistema óptico. Fotómetro de haz sencillo o doble.
- b) Monocromador con rango espectral de 190 a 900 nm .
- c) Ancho de banda espectral de 0,2, 0,7 y 2,0 nm.
- d) Sistema de flama con control de gases.
- e) Sistema de generador de hidruros.
- f) Sistema de quemador con alineación de la flama manual o automática, y quemador de 10 cm.
- g) Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodo, de acuerdo a los metales a analizar.
- h) Interfase con registrador o un adecuado sistema automatizado para el procesamiento de datos.

### 4. Recolección, preservación y almacenamiento de muestras

#### 4.1 Recolección

La muestra debe tomarse en recipientes de polietileno o de vidrio y boca ancha de 50 ml y llenando hasta el tope.

#### 4.2 Preservación y almacenamiento de la muestra

La muestra debe refrigerarse inmediatamente a 4°C por un tiempo máximo de 6 meses, excepto para el caso del mercurio que se requiere analizar antes de 28 días.

### 5. Procedimiento

Los siguientes puntos describen la secuencia del método de prueba, el que se debe realizar conforme a lo descrito.

#### 5.1 Preparación de disoluciones

5.1.1 Acido nítrico al 10% v/v. Diluir 16 ml de HNO<sub>3</sub> RA, en 100 ml de agua.

5.1.2 Acido clorhídrico al 15% v/v. Diluir 40 ml de HCl RA, en 100 ml de agua.

**5.1.3** Acido clorhídrico 1:1. Diluir 50 ml de HCl RA con 50 ml de agua.

**5.1.4** Acido clorhídrico al 1,5% v/v. Diluir 3,4 ml de HCl en 100 ml de agua.

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

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

**5.1.7** Solución de permanganato de potasio. Pesar 5 g de permanganato de potasio y diluirlo a 100 ml. Considerar el porcentaje de pureza.

**5.1.8** Agua regia. Añadir tres volúmenes de HCl RA a un volumen de HNO<sub>3</sub> RA.

**5.1.9** Soluciones para realizar la curva de calibración. A partir de la solución que se indica en el punto 3.1.2.3, realizar las diluciones necesarias con un pH = 2. Preparar mínimo cinco concentraciones, las que deben estar en el intervalo de trabajo del laboratorio.

**5.1.10** Soluciones para verificar el 0,2 unidades de absorbancia. A partir de la solución que se indica en el punto 3.1.2.3, realizar las diluciones necesarias con un pH = 2, hasta obtener 2 ppm.

También se pueden preparar estas soluciones en el laboratorio, como se indica a continuación, siempre y cuando se verifique su concentración con una solución estándar de referencia.

- a) Arsénico: Disolver 1,320 g de trióxido de arsénico, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en agua conteniendo 4 g de NaOH. Diluir a 1 000 ml con agua. 1,00 ml = 1.00 mg As (III).
- b) Cadmio: Disolver 0,10 g de cadmio metálico en 4 ml de HNO<sub>3</sub>, adicionar otros ocho ml de HNO<sub>3</sub> y diluir a 1 000 ml con agua. 1,00 ml = 100 ?g de Cd.
- d) Cobre: Disolver 0,10 g de cobre metálico en dos ml de HNO<sub>3</sub>, adicionar 10 ml de HNO<sub>3</sub> y diluir a 1 000 ml con agua. 1,00 ml = 100 ?g Cu.
- e) Cromo: Disolver 0,1923 g de CrO<sub>3</sub> en agua. Cuando la disolución sea completa, acidificar con 10 ml de HNO<sub>3</sub>, y diluir a 1 000 ml con agua. 1,00 ml = 100 ?g Cr.
- f) Mercurio: Disolver 0,1354 g de cloruro de mercurio, HgCl<sub>2</sub>, en aproximadamente 70 ml de agua, añadir un ml de HNO<sub>3</sub> y diluir a 100 ml con agua. 1,00 ml = 1,00 mg Hg.
- g) Níquel: Disolver 0,10 g de níquel metálico en 10 ml de HNO<sub>3</sub> caliente, enfriar y diluir a 1 000 ml con agua. 1,00 ml = 100 ?g Ni.
- h) Plomo: Disolver 0,1598 g de nitrato de plomo, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, en una mínima cantidad de HNO<sub>3</sub> 1:1, adicionar 10 ml de HNO<sub>3</sub> y diluir a 1 000 ml con agua. 1,00 ml = 100 ?g Pb.
- i) Zinc: Disolver 0,100 g de Zinc metálico en 20 ml de HCl 1:1 y diluir a 1 000 ml en agua. 1,00 ml = 100 ?g Zn.

El ácido nítrico utilizado para la preparación de estas soluciones es grado suprapuro.

## 5.2 Limpieza del material

**5.2.1** El material de vidrio debe sumergirse durante una hora en una disolución de ácido nítrico al 10% (ver 6.1.1) y enjuagarse con agua.

**5.2.2** En caso de que el material presente adherencias, debe dejarse remojando de 12 a 24 horas con ácido nítrico al 10% (6.1.1), o con ácido clorhídrico 15% (ver 6.1.2) o con agua regia (ver 6.1.8). Después debe ser enjuagado con suficiente agua, hasta remover toda la disolución ácida.

**5.2.3** En los casos en que el material presente grasa, agregarle acetona o hexano y distribuirlo por todas las paredes del material. Desechar el disolvente de acuerdo al procedimiento de desechos y, posteriormente, enjuagar con agua. Continuar como se indica en el punto 6.2.

**5.2.4** Los recipientes de muestras deben lavarse con disolución de detergente, enjuagarse con agua de la llave y dejarlo remojando toda la noche en ácido nítrico al 10% (6.1.1). Posteriormente, enjuagarlo con agua.

**5.2.5** Verificar que el lavado de material se efectuó correctamente.

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

### 5.3 Preparación de la muestra

Las muestras de lodos y biosólidos, requieren, en general, un tratamiento previo antes del análisis. Los metales totales incluyen la combinación de los que se encuentran en la fase orgánica y en la inorgánica, así como los disueltos y en partículas.

#### Notas:

- a) Durante todo el procedimiento analítico donde se mencione utilización de ácidos, éstos deben ser grado suprapuro.
- b) Procesar las muestras de control establecidas en su programa de AC, por cada serie de digestión.

#### 5.3.1 Digestión por horno

Homogeneizar perfectamente la muestra, verificando que no existan sólidos adheridos en el fondo del recipiente. En seguida, vaciar aproximadamente 10 g en una cápsula de porcelana (a peso constante) y colocarla en el horno hasta que el material esté a peso constante. El horno debe estar a 100°C.

#### 5.3.2 Digestión por parrilla

**5.3.2.1** Pesar y registrar de uno a dos gramos de la muestra en un vaso de precipitado de 100 ml o en un crisol de platino y añadir 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado. Cubrir con un vidrio de reloj y calentar lentamente hasta que exista reflujo de vapores, cuidando que no alcance la temperatura de ebullición. Calentar casi a sequedad.

**5.3.2.2** Enfriar y lavar el vidrio de reloj con agua. Adicionar otros 5 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado. Cubrir y continuar calentando hasta digestión completa, que es cuando la solución adquiere apariencia cristalina y los vapores son blancos. Agregar el ácido necesario para obtener esto.

**5.3.2.3** Evaporar hasta obtener un volumen aproximado de 2 ml, enfriar y enjuagar el vidrio de reloj con agua. Añadir 10 ml de HCL 1:1 (ver 6.1.3) y 15 ml de agua. Calentar nuevamente por 15 minutos para redissolver precipitados que se hayan formado.

**5.3.2.4** Enfriar, enjuagar las paredes del vaso y vidrio de reloj con agua. Vaciar el contenido a un matraz volumétrico de 50 ml, filtrando a través de papel filtro número 40, para remover el material insoluble que pueda tapar el nebulizador. Aforar al volumen correspondiente.

#### 5.3.3 Digestión por autoclave

**5.3.3.1** En un vaso de teflón de 100 ml, transfiera 0,5 g de la muestra seca. Marque y pese los vasos antes y después para obtener el peso exacto de la muestra.

**5.3.3.2** Añadir 5 ml de HNO<sub>3</sub>, tapar los recipientes herméticamente y la autoclave. Encender el equipo y dejarlo en operación a 15 lb, aproximadamente una hora. El laboratorio debe validar el tiempo de digestión, con el equipo que utilizará para tal fin.

**5.3.3.3** Sacar y enfriar a temperatura ambiente los vasos de teflón.

**5.3.3.4** Abrir y filtrar a través de papel filtro número 40, si se requiere, para retener materiales insolubles. Lavar las paredes con agua y diluir la muestra a 50 ml.

#### 5.3.4 Digestión por horno de microondas

Para usar el horno de microondas como fuente de energía, en la digestión de la muestra, se sigue el mismo procedimiento descrito en el punto 6.3.3, excepto que el tiempo de la digestión puede variar de 30 a 50 min dependiendo de las características de la muestra y de la potencia aplicada.

### 5.4 Análisis instrumental

**5.4.1** Determinación de cadmio, cobre, cromo, níquel, plomo y zinc, por aspiración directa flama-aire-acetileno.

**5.4.1.1** Conectar la lámpara de cátodo hueco o descarga sin electrodos y encender el equipo.

**5.4.1.2** Seleccionar la longitud de onda y el ancho de banda espectral de acuerdo al metal a analizar, siguiendo el protocolo del laboratorio o el manual del fabricante. En la tabla 1 se proponen las longitudes de onda y el ancho de banda espectral con los que se pueden analizar los elementos.

**Tabla 1. Relación de longitud y ancho de banda para los elementos analizados por flama**

Elemento	Longitud de onda (?)	Ancho de banda espectral (nm)
Cd	228,8	0,7
Cr	357,9	0,7
Cu	324,8	0,7
Ni	232,0	0,7
Pb	217,0	0,7
Zn	213,9	0,7

**5.4.1.3** Alinear la lámpara vertical, horizontal y rotacionalmente, hasta obtener la máxima energía.

**5.4.1.4** Esperar de 10 a 20 minutos para que se estabilice el instrumento.

**5.4.1.5** Ajustar las condiciones de la flama aire-acetileno, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Encender la flama. Permitir que el sistema alcance el equilibrio de temperatura.

**5.4.1.6** Aspirar el blanco y ajustar el instrumento a cero.

**5.4.1.7** Aspirar la disolución del estándar (5.1.10) con la concentración necesaria (ver tabla 2) para obtener 0,2 unidades de absorbancia. Ajustar con esta disolución el instrumento y si es necesario también ajustar el quemador, hasta obtener el valor más cercano a 0,2 unidades de absorbancia.

**Tabla 2. Relación de concentraciones para calibración del instrumento utilizando flama**

Elemento	Concentración ppm
Cd	1,5
Cr	4,0
Cu	2,0
Ni	7,0
Pb	9,0
Zn	1,0

**5.4.1.8** Aspirar las disoluciones estándar, mínimo cinco concentraciones (ver 5.1.10), para realizar la curva de calibración y un blanco de reactivos. El primer punto debe ser igual o mayor al límite de cuantificación del método y el último debe estar dentro del intervalo lineal.

**5.4.1.9** Proceder a analizar las muestras problema y las muestras control. Si las lecturas de las muestras están fuera del intervalo de la curva de calibración, efectuar la(s) dilución(es) que sean necesarias, hasta obtener valores en el intervalo de trabajo.

**5.4.2** Determinación de mercurio y arsénico por generador de hidruros .

**5.4.2.1** Instalar la lámpara correspondiente al metal que se va a analizar en el instrumento y encenderlo. Esperar de 20 a 30 minutos para su estabilización.

**5.4.2.2** Seleccionar la longitud de onda y el ancho de banda espectral. En la tabla 3 se proponen las longitudes de onda y ancho de banda para cada uno de los elementos.

**Tabla 3. Relación de longitud y ancho de banda para los elementos analizados por generador de hidruros**

Elemento	Longitud de onda (?)	Ancho de banda espectral (nm)
As	193,7	0,7
Hg	253,7	0,7

**5.4.2.3** Alinear la lámpara vertical, horizontal y rotacionalmente, hasta obtener la máxima energía.

**5.4.2.4** Alinear la celda de cuarzo vertical, horizontal y rotacionalmente, hasta obtener la mínima energía. Esperar de 20 a 30 minutos para su estabilización.

**5.4.2.5** Ajustar y optimizar los flujos de aire-acetileno y encender la flama. Esperar aproximadamente 10 minutos para su estabilización. Este ajuste sólo se requiere para la determinación de arsénico.



**5.4.2.6** Abrir el tanque de nitrógeno y ajustar la presión de acuerdo a las especificaciones del fabricante, para transportar el hidruro formado a la celda de cuarzo.

**5.4.2.7** Colocar en el recipiente del reductor la disolución de borohidruro de sodio (ver punto 5.1) y conectar al sistema según las especificaciones del instrumento.

**5.4.2.8** Conectar el vaso de reacción vacío al sistema generador y esperar el tiempo suficiente a que se estabilice el sistema. Cuando se ha estabilizado, registrar el cero en el espectrofotómetro (autocero). Retirar el vaso.

**5.4.2.9** Conectar otro vaso de reacción con 10 ml de HCl 1,5%, permitir la entrada del hidruro formado y registrar el cero. Repetir esta operación hasta obtener el cero por lo menos tres veces. Retirar el vaso.

**5.4.2.10** Vaciar en otro vaso de reacción, 10 ml de disolución estándar, para obtener el 0,2 unidades de absorbancia. En la tabla 4 se indican las concentraciones, con las que se obtiene el 0,2 unidades de absorbancia. Repetir esta operación hasta que se obtenga por lo menos tres veces la misma lectura, la cual deberá ser aproximadamente de 0,2. En caso de existir variación en las lecturas, verificar la alineación de la lámpara y de la celda de cuarzo.

**Tabla 4. Relación de concentraciones para calibración del instrumento utilizando generador de hidruros**

Elemento	Concentración, ng
As	5
Hg	50

**5.4.2.11** De forma similar al punto anterior, realizar la curva de calibración con un mínimo de cinco concentraciones y por lo menos tres lecturas independientes. Limpiar el sistema haciendo pasar ácido clorhídrico al 1,5% cada tres lecturas.

**5.4.2.12** Una vez determinada la curva de calibración, proceder a analizar el blanco, las muestras problema y las muestras control, como se indica en los dos puntos anteriores. Si las lecturas de las muestras están fuera del intervalo de la curva de calibración, efectuar la(s) dilución(es) que sean necesarias, hasta obtener valores en el intervalo de trabajo.

## 6. Calibración

Todos los instrumentos y materiales de medición utilizados, deben ser calibrados y verificar su calibración periódicamente con materiales y/o sustancias de referencia certificadas, de acuerdo con el AC establecido.

### 6.1 Verificación de la calibración espectrofotómetro de absorción atómica

Independientemente del elemento a analizar, realizar dicha verificación del instrumento como se indica a continuación.

**6.1.1** Conectar la lámpara de cobre y encender el equipo.

**6.1.2** Seleccionar la longitud de onda a 324,8 nm y el ancho de banda a 0,7 nm.

**6.1.3** Alinear la lámpara horizontal, vertical y rotacionalmente, hasta obtener la máxima energía.

**6.1.4** Una vez encendida la lámpara y alineada, esperar de 10 a 20 min. para la estabilización del instrumento.

**6.1.5** Ajustar las condiciones de la flama aire-acetileno, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Encender la flama. Permitir que el sistema alcance el equilibrio de temperatura.

**6.1.6** Aspirar un blanco.

**6.1.7** Aspirar una disolución estándar de cobre de 2 ppm (ver punto 5.1.10), la que debe dar 0,2 unidades de absorbancia,  $\pm$  lo establecido en los resultados obtenidos de las validaciones analíticas.

## 7. Cálculos

**7.1** Interpolan los valores de absorbancia o altura de pico de la muestra analizada en la curva de calibración, para obtener la concentración en mg/l (A). En seguida realizar los cálculos, tomando en cuenta los factores de dilución y peso de la muestra con la fórmula siguiente:

$$mg / kg ? \frac{AxBxFD}{C} \quad (2)$$

donde:

- A: Concentración en mg/l de la muestra a interpolar en la curva de calibración.
- B: Volumen al que se llevó la muestra (ml).
- C: Peso de la muestra (g).
- FD: Factor de dilución.

En los instrumentos que tienen integrado un procesador de datos, se puede obtener directamente la concentración del elemento.

## 7.2 Reporte de resultados

**7.2.1** No se deben reportar concentraciones de elementos por debajo del límite de cuantificación.

**7.2.2** Reportar los resultados del análisis en mg/kg.

## 8. Interferencias

Probablemente no existirá nunca un método analítico que esté totalmente libre de alguna interferencia por parte de la naturaleza de la muestra, sin embargo, en absorción atómica, por ser una técnica muy específica, las interferencias están bien definidas como también los medios para su tratamiento.

**8.1** Interferencia por matriz: la principal interferencia para este tipo de muestras es la presencia de materia orgánica y sólidos en suspensión, lo que se elimina mediante una adecuada digestión de la muestra.

**8.2** Interferencia de absorción no específica (fondo). La absorción molecular y la dispersión de la luz causadas por partículas sólidas en la flama pueden causar errores positivos. Para evitar este problema se debe utilizar la corrección de fondo del instrumento. Estos sólidos además de presentar una barrera física al paso de la luz de la lámpara en la flama, forman depósitos en la cabeza del quemador, sin embargo, esto se puede evitar aspirando continuamente agua acidulada.

**8.3** Interferencias físicas. Están relacionadas con las diferentes propiedades existentes entre las muestras y los estándares. Las cuales pueden afectar a la aspiración y eficiencia de nebulización en el sistema de atomización. Si las soluciones presentan diferencias de viscosidad y/o tensión superficial, la eficiencia de nebulización no será igual y los resultados analíticos se ven afectados. La presencia de otros compuestos además del elemento de interés puede afectar a los resultados analíticos. Estas interferencias pueden ser corregidas utilizando el método de adición interna (adición de estándares).

**8.4** Las interferencias en generador de hidruros se presentan por presencia de otros elementos o moléculas presentes en la muestra. Los efectos se ven reflejados en una disminución de la cantidad de hidruro formado y por lo tanto, en una disminución de la señal analítica. La forma de eliminar este tipo de interferencias es modificando la concentración del ácido y/o del borohidruro de sodio.

## 9. Manejo de residuos

**9.1** Cada laboratorio debe considerar dentro de su programa de control de calidad (CC) el tratamiento de los residuos generados durante la determinación.

**9.2** Confinamiento. El laboratorio debe contar con áreas especiales, que tengan señalamientos adecuados, para almacenar temporalmente las soluciones contaminadas con metales pesados.

**9.3** Todas las muestras que cumplan con la norma de descarga al alcantarillado pueden descargarse en el mismo.

## ANEXO VII

### CONTENIDO DE LA BITACORA DE CONTROL DE LODOS Y BIOSOLIDOS

- 1.- Generador
  - 2.- Producción en base seca (Ton.) por: día y mes
  - 3.- Fecha muestreo
  - 4.- Laboratorio que analizó
  - 5.- Salida del producto:
    - ☞ fecha
    - ☞ cantidad en base seca (Ton.)
    - ☞ destinatario
-