



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-121/3-SCFI-2008

**ANÁLISIS DEL AGUA - AGUAS NATURALES
EPICONTINENTALES, COSTERAS Y MARINAS –
MUESTREO. (TODAS LAS PARTES CANCELAN AL PROY-
NMX-AA-121-SCFI-2006)**

**WATER ANALYSIS – NATURAL EPICONTINENTAL, MARINE
AND COASTAL WATERS – SAMPLING.**

PARTE 3.

MUESTREO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

SAMPLING FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS



PREFACIO

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

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CIATEC, A.C.
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.C.
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A. C.
- FASIQ INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.



- GRUPO ECOTEC, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- INDEX-LAB, Q.F.B. MARTHA ELENA IZAGUIRRE VILLANUEVA
- INTEMA, S.A. DE C.V.
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C.

Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental (CITSA)

- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUIMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUIMICO INDUSTRIAL.



- LABORATORIOS ABC QUIMICA, INVESTIGACION Y ANALISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO PAJARITOS
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- CÉSAR CLEMENTE ALVARADO GARCÍA / SERVICIOS AMBIENTALES
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE INGENIERIA Y CONSULTORIA AMBIENTAL
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

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

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	3
2	REFERENCIAS	3
3	PUNTO DE MUESTREO	4
4	TÉCNICA DE MUESTREO	4
5	TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO	21
6	VIGENCIA	24
7	BIBLIOGRAFÍA	24
8	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	26
9	APÉNDICE INFORMATIVO	28



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-121 / 3-SCFI-2008

**ANÁLISIS DEL AGUA - AGUAS NATURALES
EPICONTINENTALES, COSTERAS Y MARINAS –
MUESTREO. (TODAS LAS PARTES DE ESTA NMX
CANCELAN AL PROY-NMX-AA-121-SCFI-2006)**

**WATER ANALYSIS – NATURAL EPICONTINENTAL, MARINE
AND COASTAL WATERS – SAMPLING.**

PARTE 3.

MUESTREO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

SAMPLING FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

0 INTRODUCCIÓN

El PROY-NMX-AA-121-SCFI-2005 fue publicado el día 30 de noviembre de 2005 en el Diario Oficial de la Federación para consulta pública. En el año 2008 el Comité Técnico de Normalización Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales decidió volver a publicarlo, dado que cambió sustancialmente su contenido inicial.

Este proyecto de norma mexicana está formado por varias partes.

Un muestreo adecuado resulta esencial para proporcionar muestras representativas para el laboratorio a cargo de la realización de los ensayos. Las características del muestreo dependen del objetivo perseguido con el mismo así como de la naturaleza de la muestra. Los microorganismos son organismos vivos. Además, cuando se encuentran en el agua no forman una solución perfecta, sino una suspensión con un grado de variabilidad que le es inherente.

Los objetivos del muestreo pueden servir a diferentes propósitos que se describen en las Normas de la serie ISO 5667 (ISO 5667-1, ISO 5667-2 e ISO 5667-3):

- a) Determinación de si un agua cumple una especificación de calidad reglamentaria:
- b) Caracterización de cualquier tipo de contaminación, su nivel (medio) y sus variaciones.
 - 1) ¿cuál es su variación aleatoria?
 - 2) ¿existe una tendencia?
 - 3) ¿hay ciclos?
- c) Identificación de las fuentes de contaminación.

El número o la frecuencia de muestras variarán según los objetivos del muestreo.

El número mínimo de muestras necesarias será bajo si la concentración media difiere sustancialmente del valor especificado (es mucho menor o mucho mayor) y dicho número mínimo de muestras será más elevado si la concentración media y el valor especificado se encuentran muy próximos entre sí. Igualmente, en el caso b), cuando se está investigando si existe alguna tendencia: cuanto menos obvia sea la existencia de tendencia mayor será la frecuencia de muestreo (véase también el anexo A).

ADVERTENCIA - Los usuarios de Esta norma mexicana deberían estar familiarizados con el trabajo habitual de laboratorio. En esta norma mexicana no se pretende abordar todos los aspectos relacionados con la seguridad que puedan plantearse en su aplicación. Es responsabilidad del usuario establecer las normas de seguridad y salud laborales apropiadas y asegurar el cumplimiento de las regulaciones nacionales en la materia.

IMPORTANTE - Es absolutamente esencial que los ensayos llevados a cabo conforme a esta norma mexicana se realicen por personal adecuadamente calificado.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

1.1 Esta norma mexicana proporciona directrices generales referidas a la planificación de programas de muestreo de agua, a los procedimientos de muestreo a aplicar para el análisis microbiológico y sobre el transporte, manipulación y conservación de las muestras hasta el inicio del análisis. Se centra sobre el muestreo para investigaciones microbiológicas.

- En las partes pertinentes del PROY-NMX-AA-003-SCFI-2006 se encuentra información general relativa al muestreo de distintas masas de agua.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente norma mexicana, se deben consultar las siguientes normas vigentes:

ISO 5667-1, Water quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques, o la NMX que la adopte.

ISO 5667-2, Water quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques, o la NMX que la adopte.

ISO 5667-3, Water quality — Sampling — Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples, o la NMX que la adopte.

3 PUNTO DE MUESTREO

El punto de muestreo debe proporcionar unas características representativas y considerar cualquier variación temporal, vertical u horizontal. Debe estar identificado de modo preciso, siguiendo las recomendaciones generales de las Normas ISO 5667-1 e ISO 5667-2, teniendo en cuenta además otros aspectos adicionales específicos para microbiología.

Se deberían evitar los puntos de muestreo cuyas condiciones sean inestables y se debe tener en cuenta la heterogeneidad del sistema hidráulico. En estudios sobre la eficacia de la desinfección, el punto de muestreo debe seleccionarse con el objeto de asegurar que dicha reacción sea completa.

A continuación se indican ejemplos de cómo la heterogeneidad del sistema puede influir en los resultados.

- No es equivalente tomar una muestra superficial o subsuperficial, o una muestra subsuperficial "contaminada" a su paso a través de la película superficial. En algunos casos (por ejemplo, lagos, piscinas) la concentración de la película superficial puede ser 1 000 veces superior al valor que existe bajo la superficie.
- Todos los puntos de una red no son equivalentes, ya que pueden existir espacios muertos y secciones en las cuales el flujo se reduce, particularmente si la red se alimenta de dos fuentes distintas.
- La calidad en la salida de un tanque con buena mezcla es generalmente la misma que en la masa de agua, pero puede ser bastante diferente de su entrada.

4 TÉCNICA DE MUESTREO

4.1 PERSONAL

El personal debe tener una formación apropiada así como demostrar una competencia en la actividad descrita para la toma de muestras.

4.2 RECIPIENTES DE MUESTRAS

4.2.1 GENERALIDADES

Para muestras de rutina (por ejemplo: muestreo en grifos, en aguas de uso recreativo, en aguas de piscinas) se emplean recipientes limpios y estériles. El volumen de los recipientes debe ser adecuado para la realización del análisis de todos los parámetros requeridos.

Para el muestreo por inmersión en el caso de aguas limpias, se emplean botellas estériles tanto en su interior como en su exterior y protegidas, por ejemplo, con papel kraft (para mantenerlas secas después de la esterilización), con un empaque de aluminio o con una bolsa exterior de plástico.

Se procede a abrir la bolsa estéril para la toma de muestra tomando precauciones en sujetar el recipiente de manera de tener condiciones de asepsia máxima, antes de colocar la muestra de agua.

Alternativamente, el exterior de los recipientes de muestreo puede desinfectarse inmediatamente antes de su inmersión, por medio de un desinfectante adecuado como isopropanol (4.3.1.1) y dejar secar antes de su empleo. Esto no resulta adecuado para el análisis de bacterias formadoras de esporas.

En la mayoría de los casos resulta suficiente utilizar botellas de 500 ml, ya que se suelen medir menos de cinco tipos de microorganismos, cada uno de los cuales precisa para inoculación un máximo de 100 ml.

En algunos casos, son necesarios volúmenes mayores, por ejemplo:

- para el análisis de aguas envasadas (250 mL por parámetro);
- para *legionella* spp. o *Salmonella* spp. (hasta 1 L);
- para virus, cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium*, amebas en aguas limpias, en cuyo caso los volúmenes examinados van desde 10 a unos cientos de litros. Usualmente se realiza una etapa de concentración sobre el emplazamiento, empleando para ello un filtro de cartucho que posteriormente se transporta al laboratorio.

Los recipientes pueden ser de vidrio o de distintos tipos de plásticos (polipropileno, poliestireno, polietileno, policarbonato). En general se prefiere el vidrio cuando se van a reutilizar, y el polietileno si se trata de material desechable.

La adherencia a las superficies puede reducir la detección de microorganismos y se tiene que considerar la tensión superficial crítica, y, si se emplea un material no normalizado [13].

Los cierres pueden ser de vidrio esmerilado o un tapón de plástico para botellas de vidrio, una tapa a presión, de plástico, para recipientes o tarros de plástico, o bien una tapa roscada, de plástico o de metal, para ambos tipos de recipientes. Las bocas de los recipientes con tapones de vidrio o de plástico deberían estar protegidas frente a la contaminación, por ejemplo, con papel de aluminio.

Cuando es necesario emplear volúmenes más grandes para el ensayo, caso, por ejemplo de virus, *Salmonella* spp., amebas, oocistos de *Cryptosporidium*, cistos de *Giardia*, algunas veces es necesario analizar decenas o centenas de litros. Para evitar las dificultades que conlleva manipular, refrigerar o agitar estos volúmenes, se recomienda hacer una etapa de concentración in situ (floculación, centrifugación o filtración). Pueden emplearse bombas peristálticas provistas de tuba estéril.

NOTA 1: Las tapas metálicas, especialmente las de aluminio, pueden producir toxicidad cuando se esterilizan. Esto puede evitarse incorporando un revestimiento interno hermético y resistente al calor.

NOTA 2: Ciertos materiales pueden dar lugar a subproductos tóxicos cuando se esteriliza por medio del calor, incluso en un horno seco, o bien cambios inducidos en el pH.

NOTA 3: Algunas marcas de lana de algodón empleadas para tapar diversos materiales de vidrio pueden volverse tóxicas si se calientan durante mucho tiempo a temperaturas excesivamente elevadas.

NOTA 4: Las tapas plásticas a presión que van fijadas a los recipientes o tarros presentan varias ventajas, considerando que

son tan herméticas como las roscadas y que las tapas pueden mantenerse abiertas, lo que facilita el llenado y el pipeteado. Cuando esta abierto el recipiente, la tapa permanece ligada al mismo, de modo que ambos elementos se mantienen juntos siempre, quedando así la tapa protegida de eventual contaminación.

4.2.2 ESTERILIZACIÓN DE RECIPIENTES

Si se reutilizan los recipientes y sus tapas, deben limpiarse con un detergente no tóxico y exento de fosfatos. Posteriormente se aclaran con agua desionizada o destilada.

Los recipientes se esterilizan a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ durante 15 min como mínimo. Se mantiene sin apretar el tapón de las botellas para dejar que el vapor sustituya a todo el aire presente durante el proceso de incremento de temperatura y para evitar que las botellas de plástico se aplasten durante el enfriamiento. Después de la esterilización se aprietan los tapones. Los tapones de vidrio se esterilizan por separados de su recipiente correspondiente, o bien se emplea papel de aluminio para evitar que al enfriarse se queden pegados a la botella.

Si es necesario, se esterilizan los recipientes en una estufa con calor seco, durante 1 h como mínimo, a $(170 \pm 10) ^\circ\text{C}$. Los tapones de vidrio esmerilado se separan del recipiente mediante una tira de papel o un trozo de cuerda para evitar que queden soldados durante el enfriamiento. La fecha de esterilización debería ser trazable a los recipientes.

NOTA 1: Los recipientes de polietileno pueden esterilizarse por exposición a óxido de etileno gas pero, debido a su toxicidad el procedimiento se lleva a cabo en instalaciones especializadas y se da tiempo suficiente para la desorción del óxido de etileno. Por lo tanto no se emplea como un procedimiento de rutina de laboratorio.

NOTA 2: La exposición a rayos gamma producida por una fuente emisora de ^{60}Co o ^{137}Cs o a electrones acelerados con suficiente energía (1×10^4 Gy a 2×10^4 Gy) es una técnica de esterilización muy eficiente, disponible en instalaciones especializadas. No hay actividad residual antibacteriana, pero algunos materiales pueden verse alterados por polimerización tras repetida irradiación.

4.2.3 INACTIVACIÓN DE DESINFECTANTES

Para evaluar la calidad microbiológica de un agua desinfectada con un oxidante (ejemplo, cloro, cloramina, bromo u ozono), se interrumpe la acción del oxidante tan pronto como se tome la muestra. Se añade un agente reductor, tal como el tiosulfato de sodio, a los recipientes de muestra.

La masa teórica de tiosulfato de sodio (pentahidratado) necesaria para inactivar 1 mg de cloro es 7,1 mg. Por lo tanto, se añaden 0,1 ml de solución de tiosulfato de sodio pentahidratado (4.3.1.2) por cada 100 ml de capacidad del recipiente. Esto inactivará una concentración de cloro residual de 2 mg/L como mínimo y de hasta 5 mg/L, dependiendo de la dinámica de inactivación, lo que resulta suficiente para la mayoría de las muestras.

En ciertas circunstancias, tales como en los lavapiés de las piscinas, en medidas de desinfección (por ejemplo, la erradicación de *Legionella* en los sistemas de distribución de agua potable), pueden encontrarse concentraciones más elevadas de cloro y, en estos casos, será necesaria una dosificación más alta de tiosulfato de sodio.

El tiosulfato de sodio no se destruye por esterilización o por la aplicación de calor seco. Se debe asegurar que el pH de la disolución de tiosulfato de sodio este próximo a neutralidad (un pH bajo puede originar su descomposición).

El tiosulfato de sodio no tiene efecto sobre la muestra y puede emplearse también para aguas no cloradas.

NOTA Se ha dicho que la Legionella es sensible al sodio y que es preferible utilizar tiosulfato de potasio, pero no se han detectado efectos adversos a la concentración empleada para inactivar las concentraciones habituales de cloro.

Para otros desinfectantes, es preciso aplicar las medidas de inactivación correspondientes. Si no es posible o factible realizar la inactivación, tiene que reflejarse en el informe.

Se han recomendado agentes quelantes con objeto de proteger a las bacterias frente a la acción tóxica de ciertos metales pesados como el cobre o el zinc. Pueden emplearse el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o el nitrilotriacetato de sodio (NTA) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_6$) en forma de solución esterilizada por filtración en una concentración final de 50 mg por litro aproximadamente, se deberían añadir únicamente en caso necesario (por ejemplo, agua tratada con plata o con cobre). La plata también puede inactivarse con sulfuro de sodio. Se añade 1 ml de una solución de sulfuro de sodio (4.3.1.3) a 1 l de muestra.

4.2.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS RECIPIENTES DE MUESTRA

4.2.4.1 ENSAYO DE ESTERILIDAD

El laboratorio debe asegurar la esterilidad de los recipientes de muestra, bien si se han preparado internamente o bien si se trata de recipientes comerciales, tanto si son de vidrio como si son de plástico. Los recipientes comerciales se deberían distribuir con un certificado de esterilización, como condición para su aceptación, y también es aconsejable realizar ensayos de esterilidad del lote en uso. Esto corresponde al lote de recipientes tras su etiquetado, adición de agentes de inactivación, si procede, y almacenamiento.

Usualmente se garantiza la esterilidad de los recipientes mediante el control del proceso de esterilización. En caso contrario, se debería ensayar la esterilidad de los recipientes.



A continuación se indican ejemplos de los procedimientos de ensayo (realizados normalmente en 1 de cada 100 recipientes):

a) Método del “frasco rodado”

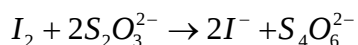
Consiste en introducir de 20 ml a 50 ml de agar nutritivo fundido (agar de recuento en placas) en el recipiente de ensayo y revestir internamente las paredes con agar haciendo rotar la botella mientras se va enfriando (añadiendo una pequeña cantidad de agua, si es necesario). La incubación a $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante cinco días no debería mostrar crecimiento alguno visible.

b) Método del caldo líquido

Consiste en introducir en el interior del recipiente de 20 ml a 50 ml de tioglicolato u otro caldo nutritivo, se hace girar la botella para humedecer las paredes y se incuba a $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante cinco días. No debería aparecer turbidez alguna si el recipiente esta estéril.

4.2.4.2 ENSAYO DE PRESENCIA DE AGENTES DE INACTIVACIÓN

La presencia de tiosulfato puede comprobarse utilizando un método iodométrico:



Se añaden 10 ml de agua destilada al recipiente y se valora con solución de yodo (4.3.1.4), empleando almidón como indicador del punto final de la valoración.

4.2.4.3 ENSAYO DE TOXICIDAD RESIDUAL EN LOS RECIPIENTES DE MUESTRA

La toxicidad residual en los recipientes de muestra puede provenir del procedimiento de lavado del material de vidrio, a partir de la liberación de componentes o aditivos de las botellas de plástico así como del proceso de esterilización. El uso en rutina de recipientes de vidrio o de polietileno no requiere la comprobación de la toxicidad de modo regular, pero en caso de que

se suscite cualquier duda, se ensaya, por ejemplo, conforme al método de Geldreich, 1975 ^[8].

4.3 REACTIVOS, APARATOS Y MATERIALES

4.3.1 REACTIVOS

4.3.1.1 Etanol, fracción en volumen $\rho(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$, isopropanol, fracción en volumen $\rho[(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}] = 70 \%$, o solución de hipoclorito $\rho(\text{ClO}^-) \approx 1 \text{ g/L}$.

4.3.1.2 Solución de tiosulfato sódico, pentahidratado, $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 18 \text{ mg/mL}$.

4.3.1.3 Solución de sulfuro de sodio, $\rho(\text{Na}_2\text{S}) = 0,1 \text{ mg/mL}$.

4.3.1.4 Solución de yodo, $c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol/L}$.

4.3.2 APARATOS Y MATERIALES

Además de los recipientes de muestra, pueden ser necesarios los siguientes elementos.

Adicionar:

De la lista que a continuación se menciona las que apliquen de acuerdo al tipo de muestreo:

4.3.2.1 Jabón y toallas

4.3.2.2 Soplete de gas y recarga

4.3.2.3 Tarros o vasos de precipitación, toallitas desinfectantes

4.3.2.4 Encendedor, cerillos

4.3.2.5 Marcadores, rotuladores, etiquetas

4.3.2.6 Llaves inglesas, alicates, destornilladores, cuchillo

4.3.2.7 Nevera y paquetes de hielo, neveras portátiles o compartimentos refrigerados en vehículos

- 4.3.2.8 Termómetro o registrador de temperatura
- 4.3.2.9 Carrito porta recipientes lastrado o equivalente, con cuerda o cadena (preferiblemente de acero inoxidable, al menos en la parte del fondo)
- 4.3.2.10 Pértiga o grandes pinzas o muestreadores adaptados a varias profundidades
- 4.3.2.11 Mapas, lista de puntos de muestreo, hojas de muestreo
- 4.3.2.12 Vehículo y documentos, identificación o tarjeta de autorización
- 4.3.2.13 Botas de agua (de seguridad)
- 4.3.2.14 Aparatos para la medida del pH, cloro, oxígeno disuelto, conductividad
- 4.3.2.15 Guantes estériles

4.4 PROCEDIMIENTO DE LLENADO

4.4.1 AGUA POTABLE DE UN GRIFO

4.4.1.1 Generalidades

El muestreo de un grifo puede tener distintos objetivos:

- a) determinar la calidad del agua en la red de distribución (que es responsabilidad del distribuidor);
- b) conocer la calidad del agua tal y como se suministra en el grifo para su consumo - agua tal y como se suministra en el grifo - (que puede estar alterada en la red de distribución o en el interior del edificio);
- c) conocer la calidad del agua tal y como se consume, es decir, como sale de un grifo (posiblemente contaminado).

Las muestras para evaluar la calidad de la red principal [caso a)] se toman mejor en grifos especiales (también en el sistema de distribución) que están próximos a los conductos principales, se encuentren limpios y sin accesorios y

que puedan ser desinfectados por flameado u otro procedimiento adecuado equivalente.

Pueden utilizarse grifos normales para evaluar la calidad en la red principal [siempre el caso a)], si pueden desinfectarse por flameado o dejar correr agua de grifo mínimo 3 minutos, pero en caso de obtención de resultados poco claros, se considera la red interior como fuente potencial de contaminación.

La situación descrita en el caso b) es el método de elección para evaluar la calidad del agua potable incluyendo la red de servicio interior del edificio. En este caso, no siempre están disponibles grifos susceptibles de desinfección por flameado y es preciso considerar otros métodos de desinfección [aplicación de solución de hipoclorito, etanol o isopropanol (4.3.1.1)].

La situación descrita en el caso c) es el método aplicado para evaluar la calidad del agua potable en situaciones especiales, por ejemplo, en caso de epidemias.

En función de los objetivos del análisis, es necesario o incorrecto:

- retirar los dispositivos accesorios e insertos;
- desinfectar el grifo;
- aclarar (véase la tabla 1).

Objetivo (véase arriba)	Tipo de agua	Retirar accesorios e insertos	Desinfectar	Aclarar
a)	Red de distribución	Sí	Sí	Sí
b)	Tal como sale del grifo	Sí	Sí	No ^a (mínimo)
c)	Tal y como se consume	No	No	No
^a Aclarar ligeramente sólo para anular los efectos de la desinfección del grifo.				

Tabla 1 – Muestreo en un grifo con distintos objetivos.

El muestreo de tanques de almacenamiento de agua potable se hace normalmente a partir del grifo situado en la salida. Algunas veces se toman muestras por debajo de la superficie del tanque mismo, en cuyo caso se

requieren recipientes que estén estériles tanto en su interior como en el exterior (véase el apartado 4.2.1).

Asegurarse de que las muestras se toman de modo aséptico manteniendo las manos limpias o utilizando guantes estériles protegiendo la muestra de corrientes de aire o salpicaduras.

Durante el llenado, el interior del cierre del recipiente no debe estar en contacto con nada (dedos, suelo, bolsillo, dientes).

Se cierra inmediatamente el recipiente. No debe emplearse esta agua para mediciones de la temperatura ni ningún otro parámetro que se analice *“in situ”*.

Para más detalle, consulte también la Norma ISO 5667-5.

4.4.1.2 Agua en estaciones de tratamiento y tanques de almacenamiento

En plantas de tratamiento y tanques de almacenamiento, deberían existir grifos de muestreo en cada salida principal y en otros puntos de muestreo. Dichos grifos deberían ser aptos para su esterilización por flameado, mantenerse en condiciones de limpieza y estar claramente etiquetados, reservando su uso exclusivamente con fines de muestreo. Para más detalle, véanse las Normas ISO 5667-5 e ISO 5667-13.

El flameado de un grifo de metal intensamente con un soplete asegura la desinfección de la boca si la temperatura en dicho punto alcanza los 80°C o más. No es este el caso si el agua permanece en la porción calentada.

4.4.1.3 Agua en la red principal de distribución

Para determinar la calidad en la red principal de distribución, se efectúa la toma de muestra en el conducto principal o en sus proximidades (usualmente justo después del medidor de caudal). Es necesario asegurarse de que no entra en la muestra contaminación procedente de la superficie exterior del grifo. Se raspa cualquier tipo de suciedad (sarro, cieno, grasa o cualquier otra materia extraña) y abrir y cerrar completamente y de forma repetitiva el grifo para expulsar la suciedad del mismo. Se desinfecta el grifo preferiblemente por

flameado u otro método químico (después del flameado y apertura del grifo debería escucharse un chisporroteo), mínimo dejar correr agua de grifo 3 minutos como se tiene en normas NMX. A continuación se abre el grifo a un caudal medio y se deja correr hasta que el agua alcance una temperatura constante (para evitar el agua que se encontrara dentro del edificio). Después se coloca el recipiente abierto en el chorro de agua y se deja llenar en condiciones de asepsia.

Sólo si no es posible flamear, se desinfecta el grifo por otros métodos. Para desinfectar la boca de un grifo de plástico, después de limpiarla cuidadosamente, se sumerge durante 2 min a 3 min en un vaso con solución de hipoclorito, de etanol, o de isopropanol (4.3.1.1). Alternativamente puede utilizarse una torunda de algodón o un frasco lavador o similar para desinfectar el exterior y el interior, en la medida de lo posible.

A continuación, se deja fluir lo suficiente el agua para minimizar la influencia de la red interior del edificio. Es necesario disponer de un esquema detallado de la red (volumen de los depósitos o sistemas de ablandamiento y tiempo de retención) para determinar el tiempo de aclarado necesario antes del muestreo. Puede realizarse el seguimiento la estabilización de la temperatura del agua para conseguir el mismo efecto con el mismo fin. Muchos microorganismos del agua tienen su origen en la ruptura de la película biológica y la re-suspensión de depósitos situados en las juntas o rótulas en caso de picos de caudal y choques de presión. Para minimizar estos efectos, se abre el grifo a máximo caudal durante un periodo entre 5 y 10 segundos después se reduce a medio caudal durante el tiempo necesario y se coloca el recipiente bajo el grifo sin cerrar y volver a abrir el mismo.

4.4.1.4 Agua tal y como se suministra en el grifo del consumidor

Para determinar la calidad tal y como se suministra en el grifo del consumidor, es preciso asegurarse de que no se produce contaminación de la muestra proveniente de la superficie exterior del grifo. Se raspa cualquier tipo de suciedad (sarro, cieno, grasa u otras materias extrañas) susceptible de caer en la muestra, antes de llenar los recipientes. No se muestrean grifos que tengan fugas en sus mandos. Se retira cualquier alcachofa u otro accesorio o inserto (debe disponerse de llaves inglesas y alicates). Se desinfecta el grifo preferiblemente mediante flameado o, si no es posible, mediante otro método apropiado (véase anteriormente). A continuación, se deja correr el agua durante tiempo suficiente para asegurar que la muestra no presenta efecto

térmico o desinfectante residual. Se coloca el recipiente bajo el grifo sin cerrar y volver a abrir el mismo.

4.4.1.5 Agua tal y como se consume

Para determinar la calidad del agua tal y como se consume (por ejemplo, en situaciones de epidemia), debería tenerse en consideración la contaminación del agua por bacterias procedentes del exterior del grifo y de cualquier otro accesorio o dispositivo. Por lo tanto, dichos accesorios deberían mantenerse en su lugar y no debería desinfectarse el grifo antes del muestreo.

4.4.2 AGUA DE MANANTIALES Y POZOS

El análisis de agua de pozo puede tener distintos propósitos:

- 1) conocer la calidad del agua subterránea;
- 2) conocer la calidad del agua de pozo;
- 3) conocer la calidad del agua tal y como se utiliza

Dependiendo del objetivo, es preciso seleccionar distintos tipos de muestreo, diferenciando entre perforaciones o pozos en los cuales hay bombas instaladas de forma permanente y aquellos otros en los que no hay dispositivos de bombeo permanentes. En las tablas 2 y 3 se da una visión general del tipo de método de muestreo que se debería elegir dependiendo del fin perseguido en pozos con y sin dispositivos permanentes de bombeo instalados.

Objetivo	Tipo de agua	Bombeo	Desinfección del grifo
1	Agua subterránea	sí (prolongado)	sí
2	Agua de pozo	no (mínimo)	sí
3	Agua tal y como se consume	no	no

Tabla 2 - Muestreo de agua de pozo con diferentes objetivos en pozos en los que hay sistemas de bombeo permanentes y un grifo u otro tipo de salida metálicos

Objetivo	Tipo de agua	Con bomba sumergible (limpia)	Con un recipiente estéril en su interior y exterior	En un cubo
1	Agua subterránea	+ ^a	–	–
2	Agua de pozo	+ ^b	+	–
3	Agua tal y como se consume	–	–	+

Tabla 3 - Muestreo de agua de pozo con diferentes fines en pozos en los que no están instalados sistemas permanentes de bombeo

Los pozos o perforaciones en los cuales hay una bomba instalada de forma permanente suelen disponer normalmente de un grifo o algún tipo de salida metálica. Dependiendo del objetivo del muestreo, es o no necesario efectuar un bombeo prolongado y es precisa o no una desinfección, preferiblemente por flameado; véase la tabla 2.

Un bombeo prolongado para el objetivo 1 significa que el bombeo debería durar hasta que el agua alcance una temperatura y una conductividad constante, o al menos hasta que se garantice una renovación de tres veces el volumen del pozo. Para el objetivo 2 (conocer la calidad del agua del pozo), solo es necesario un pequeño intercambio de agua simplemente para anular el efecto de la desinfección del grifo. Para el fin 3, no es necesario efectuar ni bombeo ni desinfección del grifo.

En el caso de pozos o perforaciones que no dispongan de una instalación permanente de bombeo (tabla 3) se muestrean con una bomba sumergible para el objetivo 1. Esta bomba se emplea solo para aguas limpias y de nuevo debe garantizarse un bombeo prolongado (véase anteriormente). Para el fin 2, se debería utilizar preferentemente un dispositivo de muestreo estéril que incluya un porta botellas lastrado. Alternativamente puede también utilizarse una bomba sumergible limpia tras un bombeo mínimo previo. Para el fin 3, cuando el agua de pozos o perforaciones es empleada por los consumidores, por ejemplo, con cubos, etc., se toma el agua del cubo en un recipiente de muestreo estéril.

4.4.3 AGUA DE PISCINAS

Para el muestreo efectuado después de pasar los filtros o en las tuberías de alimentación de las piscinas, deben estar previstos grifos específicos para muestreo, que deben estar soldados muy próximos a la propia tubería, para evitar estancamientos. Los recipientes se rellenan del mismo modo que en el caso de los grifos en la red principal de distribución (4.4.1.3).

Para el muestreo del agua influyente a la piscina (tras clarificación, tratamiento e inyección de cloro) se toma la muestra a una distancia del punto de inyección donde el residuo de desinfectante sea estable.

Los estudios comunes de agua de piscinas incluyen muestreo por debajo de la superficie (de - 10 cm a - 30 cm), utilizando una pértiga de muestreo en la parte opuesta de la entrada del agua. Se emplean botellas limpias y estériles. En ausencia de flujo vertical de agua, se debería poner cuidado en seleccionar el punto de muestreo más adecuado y más representativo. El recipiente se introduce horizontalmente para evitar pérdidas de tiosulfato. Posteriormente se pone en posición vertical hasta que se haya recogido suficiente agua.

NOTA: Sobre la superficie del agua de la piscina, en condiciones de reposo, se forma una microcapa en la que se produce la acumulación de microorganismos tales como los estafilococos en el interior de masas flotantes de espuma. En algunas piscinas puede también evaluarse la contaminación superficial muestreando el canal de desagüe perimetral.

4.4.4 AGUAS SUPERFICIALES

4.4.4.1 Aguas de baño

Las aguas de baño (lagos, ríos, costeras) se clasifican usualmente tras una serie de mediciones, realizadas a lo largo de una estación. Los puntos de muestreo deben estar estrictamente definidos.

Los puntos de muestreo deberían ser representativos de la calidad del agua en el lugar utilizado por la mayoría de los bañistas, o en aquellos sitios en donde se espere que se produzca contaminación, dependiendo de los objetivos del muestreo.

En una columna de agua de 1 m a 1,5 m de profundidad, se toman muestras por debajo de la superficie (- 20 cm a - 30 cm). Se introduce el recipiente en el agua, en posición invertida, hasta la profundidad de muestreo. A continuación se llena la botella rotándola hacia un lado y, después, hacia arriba para evitar

contaminación. Si existe corriente, se coloca y se mantiene la botella a contracorriente.

En algunas playas, no se consigue una columna de agua de 1 m y es preciso tomar la muestra a una profundidad inferior. Este hecho debería quedar reflejado y debería prestarse especial atención a los efectos de re-suspensión.

NOTA Uno de las mayores fuentes de variabilidad en la calidad del agua de las playas es la re-suspensión de las bacterias adsorbidas sobre la arcilla o el limo orgánico. Las arenas gruesas presentes en zonas hidrodinámicas no adsorben muchos contaminantes. Varias causas naturales y antropogénicas de re-suspensión pueden incrementar los riesgos sanitarios y se deberían tener en consideración, por ejemplo, mareas vivas, tormentas, navegación. Pero un muestreo defectuoso puede tener el mismo efecto (por ejemplo, un rellenado demasiado próximo al fondo, agitación del sedimento, movimiento propio del barco).

4.4.4.2 Mar, lagos, ríos: desde un bote

A la hora de seleccionar las localizaciones exactas de muestreo se debería tener en cuenta las variaciones estacionales, así como la estratificación vertical del agua de los lagos y de la del mar y la mezcla de las aguas de río.

Existen muchos dispositivos para la toma de muestras por debajo de la superficie o en aguas profundas en alta mar, pero las botellas oceanográficas usadas para estudios químicos (Go-Flow, Nansen o Van Doorn^[12]) no son esterilizables y no resultan adecuadas.

El sistema J-Z^[12] consta de una botella de vidrio estéril a vacío. Esta provisto de un tapón de caucho y un tubo de vidrio hermético que va doblado para situarse próximo a la cuerda. Cuando la botella esta a la profundidad deseada, se envía un mensajero a través de la cuerda que rompe el tubo y se rellena la botella. También es posible llevarla arrastrada sobre una botella de Nansen. Se han utilizado técnicas de jeringa y algunas otras, las más complejas consisten en mantener la muestra de agua a la presión de origen, para el estudio de bacterias barófilas.

Cuando se emplean estos dispositivos o una pértiga en aguas poco profundas, se reduce al mínimo la alteración de los sedimentos por el operador, el barco, el ancla, etc.

Desde un barco a la deriva, se toman muestras colocándose a sotavento y no en contra del viento. Desde un barco anclado, o en marcha se toman muestras desde la popa.

Se debería minimizar toda contaminación potencial de las cuerdas a las que van atados los instrumentos estériles usando, por ejemplo, un alambre de acero inoxidable o una cadena en el extremo de la cuerda.

4.4.5 AGUAS RESIDUALES

Se utilizan guantes desechables, si se requieren pinzas deben ser estériles, para el muestreo por debajo de la superficie para minimizar así el riesgo de infección por parte del personal a cargo de la toma de muestra. Se elimina la suciedad de las superficies externas de los recipientes y/o se introducen dentro de bolsas limpias, transportándolos de forma separada a las muestras de agua potable. Son de aplicación los procedimientos (dispositivos de muestreo) indicados en el apartado 4.4.4.2 (lagos, mar, ríos).

4.4.6 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA SUPERFICIE

Se toman muestras de la película biológica rascando mecánicamente la superficie con una espátula, una cuchilla o un escobillón estériles. Se suspende la muestra de la película en un recipiente de muestra estéril y se analiza tras su homogenización.

NOTA La disposición espacial de los microorganismos quedará destruida por este procedimiento de muestreo cualitativo.

Las bacterias de corrosión se investigan en el sedimento obtenido a partir de muestras líquidas por filtración, decantación o centrifugación. Las partículas de metal corroído pueden obtenerse mediante raspado o induciendo un "golpe de ariete" (cambio repentino de presión en una tubería de agua).

Las bacterias sulfato-reductoras pueden algunas veces encontrarse en el agua, pero su papel en la corrosión de los metales se demuestra mejor empapando con un algodón o un hisopo el interior de tubérculos aún húmedos, mejor que muestrear únicamente el agua.

4.5 HOJA DE MUESTREO

Se identifica y etiqueta el recipiente de manera unívoca y se rellena la hoja de muestreo (registro del personal de toma de muestra), antes o inmediatamente después, del muestreo.

La hoja de muestreo debe indicar como mínimo el nombre y la dirección del cliente, la lista de parámetros a analizar, la fecha, hora y localización del muestreo, así como el nombre de la persona que está tomando la muestra. También es necesario indicar la naturaleza (origen) de la muestra y el propósito del análisis, ya que esto puede ayudar en la selección de métodos. Otros detalles pueden resultar necesarios para la correcta interpretación de los resultados (por ejemplo, temperatura, biocidad, punto exacto de muestreo, cualquier observación sobre fenómenos que podrían afectar a la calidad microbiológica del agua).

5 TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

5.1 TRANSPORTE

Procurar que el tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis de laboratorio sea lo más corto posible. Para aguas potables el análisis debería iniciarse idealmente el mismo día del muestreo.

Salvo indicación en contra especificada en la norma correspondiente, las muestras se refrigeran - idealmente $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ - durante su transporte (por ejemplo mediante el empleo de bloques refrigerantes o hielo fundido). Se toman precauciones para evitar su congelación (excepto en el caso de los virus). Las muestras se protegen de la luz solar.

Para las muestras cuyo transporte se prolongue durante más de 8 h, es necesario realizar un seguimiento y registrar la temperatura. Las condiciones de transporte deben quedar documentadas. En todo caso debe tenerse cuidado en:

- No colocar los bloques refrigerantes en contacto directo con la muestra, ya que esto puede provocar su congelación^[10];
- ajustar el número, volumen y posición de los bloques refrigerantes al número de muestras, su masa y su temperatura inicial^[9].

Se documenta el procedimiento requerido para tiempos de transporte más largos (>8h).

Se debe transportar de forma separada las muestras frías y calientes.

Véase la Norma ISO 5667-3 para información sobre directrices generales sobre el transporte de muestras de agua para análisis físico-químico, químico, radioquímico y biológico.

En el intervalo comprendido entre 0 °C y 45 °C, las reacciones bacterianas son proporcionales a la temperatura. Si una microflora está en fase de multiplicación, cuanto mayor sea la temperatura, más rápida es la multiplicación. Por otra parte, si está en fase de mortalidad, la reacción también se acelera al aumentar la temperatura. En bacteriología generalmente se asume un valor de 2 para Q_{10} . Esto quiere decir que un aumento de temperatura de 10 °C incrementa la velocidad de reacción en un factor de dos, tanto para la multiplicación como para la mortalidad. Por eso es importante que las muestras se transporten refrigeradas, sin llegar a congelarse, ya que la formación de hielo puede causar la muerte de la mayoría de las células (> 99%). Únicamente las muestras para análisis de virus pueden mantenerse a una temperatura de – 70 °C, si se añade un crioprotector adecuado a la muestra.

NOTA 1: En condiciones óptimas una división de una célula de *E. Coli* lleva 20 min y da lugar a 1×10^9 células 10 h más tarde. Sin embargo, el agua contiene otros microorganismos y le faltan los nutrientes adecuados, de modo que dicha multiplicación no puede tener lugar. Por otro lado, la microflora puede quedar dividida a la mitad en menos de 20 min; la acción desinfectante del cloro sin inactivación es cuestión de segundos.

NOTA 2: La mayoría de las experiencias realizadas sobre conservación de muestras de agua para examen bacteriológico indican que resulta beneficioso refrigerar las muestras por debajo de 10 °C. El rango ideal de temperatura es (5 ± 3) °C, lo que se consigue introduciendo la muestra en una nevera con hielo (preferiblemente bloques refrigerantes artificiales). En cualquier caso, es obvio que la temperatura del agua no será de (5 ± 3) °C nada más introducir la muestra en la nevera. Hay un periodo de tiempo necesario para equilibrar la temperatura, durante el cual esta será variable debido a:

- la nevera (volumen, características de aislamiento);

- la temperatura exterior;
- la masa de las muestras de agua y su temperatura inicial;
- la masa de hielo.

NOTA 3: Los bloques de "hielo artificial" producen un efecto refrigerante mayor que el hielo y no se funden, limitando así el riesgo de desprendimiento de las etiquetas o que se borren las marcas de tinta o bien que las muestras resulten contaminadas. Por estas razones es preferible utilizar estos bloques en lugar de verdadero hielo.

5.2 TIEMPO ENTRE MUESTREO Y ANÁLISIS

El tiempo entre el muestreo y el análisis incluye el transporte, registro y procesado en el laboratorio.

El periodo de tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis puede reducir la fiabilidad de los resultados obtenidos. En consecuencia, el personal responsable del muestreo debe trabajar conjuntándose con los analistas con objeto de reducir al mínimo el número de muestras analizadas al día siguiente del muestreo. El tiempo transcurrido debería ser lo más corto posible y debe reflejarse en los informes de laboratorio.

NOTA 1: En aguas desinfectadas, así como en aguas de mar o de río, las células de bacterias indicadoras de contaminación fecal parecen estar en fase de mortalidad, indicativo un estado fisiológico de debilidad. En la referencia [8], el autor recomienda un retraso máximo de 8 h, conforme a lo determinado en anteriores estudios realizados sobre este tipo de aguas.

NOTA 2: Para aguas potables no tratadas o para algunas aguas eutróficas, algunos autores han propuesto periodos de tiempo superiores. Sin embargo, todos los libros y especialistas en microbiología recomiendan analizar las muestras lo antes posible, ya que una clara mayoría de los estudios concluyen que se producen cambios incluso con refrigeración ^{[5],[6],[7]}.

En la tabla B.1 (Apéndice Normativo) se resumen las recomendaciones en lo que se refiere a tiempos máximos tomadas de la bibliografía. Dichos tiempos

son indicativos: dependen del tipo de agua, del estado fisiológico de los microorganismos (por ejemplo, de si ha habido o no desinfección), e incluso del método analítico. No obstante deben respetarse los valores de tiempos máximos, incluido el tiempo de transporte, y de temperatura indicados en las normas específicas.

Los resultados obtenidos empleando tiempos de conservación superiores al tiempo recomendado deberían ir acompañados de una nota que exprese que los resultados han sido obtenidos una vez transcurridas n horas.

6 VIGENCIA

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

7 BIBLIOGRAFÍA

- 7.1 LIGHTFOOT, N.F. and MAIER, E.A. Eds. *Microbiological analysis of food and water. Guidelines for quality assurance*. Elsevier, 1998.
- 7.2 DELATTRE, JM. And OGER, C. *Le prélèvement d'eau pour analyse microbiologique*. Monography, Institut Pasteur Lille (F), 1985.
- 7.3 GARRET, W.D. Collection of slick-forming materials from the sea surface. *Limmol. Oceanogr.*, **10**, 1965, pp.602-605.
- 7.4 STANDRIDGE, J.H. and LESAR, D.J. Comparison of four hour and twenty four hour refrigerated storage of non potable water for faecal coliform analysis. *Appl. and Env. Microbiol.*, **34** (4), 1977, pp. 398-402.
- 7.5 MCDANIELS, A.E. and BORDNER, R.H. Effects of holding time and temperature on coliform numers in drinking water. *JAWWA*, **75** (9), 1983, pp. 458-463.

- 7.6 NASH, H.D. and GELDREICH, E.E. *Sample preservation: a progress report*. EPA/600/D-84-041, 1984.
- 7.7 MCDANIELS, A.E. et al. Holding effects on coliform enumeration in drinking water samples. *Appl. and Env. Microbiol.*, **50** (4), 1985, pp. 755-762.
- 7.8 GELDREICH, E.E. *Handbook for evaluating water bacteriological laboratories*. EPA 670/9-75/006, 1975.
- 7.9 GOUDAERT, F. *Temperature of water samples in ice-boxes*. Institut Pasteur de Lille (f), 2000.
- 7.10 ELLIOT, J.M. *Some methods for the statistical análisis of simple of benthic invertebrates*. Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 25, Second Edition, Fourth Impression, 1993.
- 7.11 Unpublished data from A.G.L.A.E. (French interlaboratory proficiency testing scheme), 2001.
- 7.12 MC NEIL, SIEBURTH, J. *Sea microbes. Part II, Methodology*, Chapter 4, Sampling, 1979, pp. 71-97.
- 7.13 DEXTER, S.C., SULLIVAN, J.D. Jr, WILLIAMS, J. and WATSON, S.W. Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surface. *Appl. Microbiol.*, **30**, 1975, pp. 298-308.
- 7.14 MCCULLAGH, P. and Nelder, J.A. *Generalized Linear Models*. London, Chapman and Hall, 1983, (second edition), 1989.
- 7.15 AFNOR T90D N427/AFNOR T90E N08. Travaux AFNOR Legionella, 2002.
- 7.16 ISO 5667-4 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 4: Guía para el muestreo de lagos, naturales y artificiales*.
- 7.17 ISO 5667-5 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 5: Guía para el muestreo de agua potable de instalaciones de tratamiento y sistemas de distribución*.

- 7.18 ISO 5667-6 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 6: Guía para el muestreo de ríos y arroyos.*
- 7.19 ISO 5667-7 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 7: Guía para el muestreo de agua y vapor en calderas.*
- 7.20 ISO 5667-10 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 10: Guía para el muestreo de aguas residuales.*
- 7.21 ISO 5667-11 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 11: Guía para el muestreo de aguas subterráneas.*
- 7.22 ISO 5667-12 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 12: Guía para el muestreo de sedimentos de fondo.*
- 7.23 ISO 5667-13 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 13: Guía para el muestreo de lodos procedentes de aguas residuales y de las instalaciones de tratamiento del agua.*
- 7.24 ISO 5667-15 *Calidad del agua. Muestreo. Parte 15: Guía para la conservación y manejo de lodos y muestras de sedimentos.*

8 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana coincide totalmente con la norma internacional ISO 19458: 2006. Water quality – Sampling for microbiological analysis.

México D.F., a

DR. FRANCISCO RAMOS GÓMEZ
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

PROY-NMX-AA-121/3-SCFI-2008
27/32

9 APÉNDICE INFORMATIVO

ANEXO A. DETERMINACION A PRIORI DEL NÚMERO DE MUESTRAS A ANALIZAR PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION MEDIA DE LOS MICROBIOS PRESENTES EN EL AGUA CON UN NIVEL DADO DE CONFIANZA, EN CASO DE DETERMINACION CUANTITATIVA DERIVADA DEL CULTIVO DE MICROORGANISMOS

9.1 Generalidades

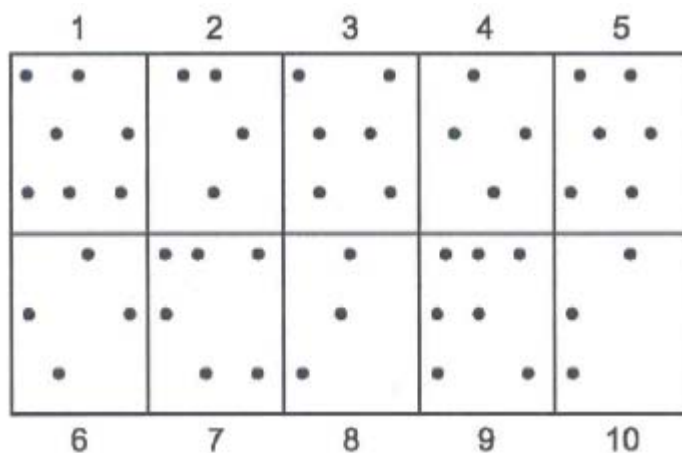


Figura A.1 – Ejemplo de distribución de 50 microgramos en un volumen bien mezclado de 1 L de agua

Ninguna de las porciones de 100 ml contiene una concentración teórica de 5 microorganismos en 100 ml.

Puede demostrarse que en condiciones ideales de homogeneización, la distribución del número de bacterias sigue aproximadamente la ley de Poisson.

Caracterizada por una varianza que es igual a la media, esta ley se observa efectivamente para bajas densidades bacterianas (<12 partículas formadoras de colonias por volumen analizado), por ejemplo para *Salmonella* y *E. Coli* en aguas potables.

Para concentraciones superiores a 12 partículas formadoras de colonias por volumen analizado), la varianza, s^2 , es con frecuencia mayor de la esperada.

$$s^2 = K \cdot m, \text{ donde } K > 1$$

La distribución presenta sobredispersión o es contagiosa; K se denomina coeficiente de sobredispersión; m es la media aritmética de los recuentos.

9.2 Cálculos

Para calcular el número de muestras que es preciso analizar, se procede del siguiente modo:

- se elige la desviación tolerable en los resultados, D : por ejemplo, $\pm 20\%$, $\pm 50\%$, expresando los valores porcentuales en forma de número decimal (por ejemplo, $20\% = 0,20$).
- teniendo, en la medida de lo posible, una idea del rango de concentración que presenta el agua a analizar, se estima el recuento medio esperado, m , por porción de ensayo.
- y teniendo, en la medida de lo posible, una hipótesis del valor de coeficiente de sobredispersión, K , a partir de la tabla A.1;
- entonces se determina el número de muestras, N , conforme a la siguiente ecuación:

$$N = \frac{K \cdot x_1^2}{m \cdot D^2}$$

donde

- N es el número de muestras;
- x_1^2 es el valor de la distribución chi cuadrado, con un grado de libertad (el valor para un 95% de grado de significación es 3,84);
- K es la relación entre la varianza y la media, coeficiente de sobredispersión [14];
- D es la desviación tolerada, expresada como fracción decimal de la media;
- m es la media aritmética del recuento.

Tabla A.1 – Estimación del coeficiente de sobredispersión, K , según el tipo de agua y el número previsto de microorganismos

Turbidez del agua	Concentración de microorganismos, m (partículas formadoras de colonias por volumen analizado)			
	<12	de 12 a 30	de 30 a 50	>50
Agua Clara	$K=1$	$K=1,5$	$K=3$	$K=8$
Turbia	$K=1$	$K=2$	$K=4$	$K=12$
Muy turbia	$K=1$	$K=2$	$K=5$	$K=16$

9.3 Ejemplos

9.3.1 Ejemplo 8.3.1

Por ejemplo, si el objetivo de precisión es del 20% en torno a una media estimada de 5 partículas formadoras de colonias por volumen analizado, el coeficiente de sobredispersión es $K = 1$ (véase la tabla A.1). En tal caso, el número de muestras requerido, N , para un nivel de confianza del 95% es:

$$N = \frac{3,84}{(0,2)^2 \times 5} = 19,2$$

Por lo tanto, se necesita un número de muestras, $N = 19$ para determinar la concentración microbiana de una muestra de agua que contenga en torno a 5 partículas formadoras de colonias por volumen analizado, con una desviación tolerable de $\pm 20\%$.

Si solo se toman 5 muestras, la recisión relativa no será mejor del 40%.

Si únicamente se analiza una muestra, el riesgo de obtener un falso negativo es del 70%.

9.3.2 Ejemplo 8.3.2

Para una concentración de aproximadamente 30 partículas formadoras de colonias por volumen analizado, la tabla A.1 da un coeficiente de sobredispersión $K = 4$ (varianza cuatro veces mayor que la media) para aguas turbias.

Para un nivel de confianza del 95% y para una desviación tolerable del 20%, el cálculo del número de muestras a analizar es

$$N = \frac{4 \cdot 3,84}{(0,2)^2 \cdot 30} = 12,8$$

Por lo tanto, se tendrán que analizar 13 muestras para estimar la concentración microbiana, con un 20% de desviación tolerable y un 95% de confianza, en aguas turbias que contengan aproximadamente 30 partículas formadoras de colonias por volumen analizado.

9.3.3 Ejemplo 8.3.3

Agua superficial turbia con una concentración microbiana esperada aproximada de 15 partículas formadoras de colonias por volumen analizado, $K = 2$ (véase la tabla A.1).

Para una desviación tolerable de $\pm 20\%$, el número de muestras a analizar es:

$$N = \frac{2 \cdot 3,84}{(0,2)^2 \cdot 15} = 13$$

Para una desviación tolerable $\pm 50\%$, el número de muestras a analizar es.

$$N = \frac{2 \cdot 3,84}{(0,5)^2 \cdot 15} = 2$$

9.3.4 Ejemplo 8.3.4

Desviación tolerable adoptada:	$\pm 20\%$
Turbidez del agua analizada:	agua clara
Concentración microbiana esperada:	20 partículas formadoras de colonias por volumen analizado

$K = 1,5$ (a partir de la tabla A.1)

Número de muestras a analizar:

$$N = \frac{1,5 \cdot 3,84}{(0,2)^2 \cdot 20} = 7$$

Por tanto se toman y analizan 7 muestras.

Los resultados obtenidos son: 13, 15, 7, 8, 19, 8, 13.

Entonces

$$m = \frac{13+15+7+8+19+8+13}{7} = 11,9$$

(Considerablemente menor de lo esperado)

Y

$$s^2 = \frac{(13-11,9)^2 + (15-11,9)^2 + (7-11,9)^2 + (8-11,9)^2 + (19-11,9)^2 + (8-11,9)^2 + (13-11,9)^2}{7-1} = 19,5$$

$$K = \frac{19,5}{11,9} = 1,6$$

de modo que, el número de muestras era apropiado y puede emplearse en futuros estudios.

ANEXO B. VALORES RECOMENDADOS (R) Y ACEPTABLES (A) DE TIEMPOS MÁXIMOS DE CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA, INCLUIDO EL TIEMPO REQUERIDO PARA EL TRANSPORTE, Y DE TEMPERATURAS, SALVO ESPECIFICACIONES EN CONTRA EN NORMAS ESPECÍFICAS.

Tabla B.1 Valores de tiempos máximos de conservación de la muestra y de temperaturas.

	Tiempo máximo de conservación (h), incluido el transporte		Temperatura de conservación del agua °C		Observación ^a
	R	A	R	A	
Generalidades Microorganismos cultivables (22°C, 30°C ó 36°C)	8	12	5 ± 3		
Indicadores fecales, bacterias vegetativas <i>E. coli</i> (y bacterias coliformes) Enterococos <i>Clostridium perfringens</i> (células vegetativas)	12 12 12	18 18 18	5 ± 3 5 ± 3 5 ± 3		
Esporas Esporas de bacterias reductoras de sulfitos (<i>Clostridium</i> spp.)	24	72	5 ± 3		Mortalidad observada en aguas brutas tras 24h
Virus Bacteriófagos	48	72	5 ± 3		
Patógenos fecales <i>Salmonella</i> spp. y otras <i>Enterobacteriaceae</i> Enterovirus Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> cistos de <i>Giardia</i>	12 48 1 mes 24 24	18 72 96 96	5 ± 3 5 ± 3 -70 5 ± 3 5 ± 3	-20 ambiente	
Otros microorganismos Amebas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Legionella</i> ssp. Cianobacterias <i>Campilobacter</i> (<i>thermophilic</i> spp.) Bacterias totales por epifluorescencia Huevos de helmintos	24 8 24 48 24 1 año 48	96 12 48 72 72 1 semana	5 ± 3 ambiente 5 ± 3 5 ± 3 5 ± 3 ambiente 5 ± 3 5 ± 3	5 ± 3 ambiente	Algunas veces aparece lisis a las pocas horas Sensible al oxígeno Muestra estabilizada en un vial exento de polvo + formaldehído (concentración final 3%), en la oscuridad Muestra estabilizada a pH=2
^a Véanse las referencias [1], [2], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [11] y [15] en la bibliografía.					