

**PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA
PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2017. Buenas Prácticas para la
transformación genética de microorganismos de riesgo 2 por métodos
convencionales.**

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma Oficial Mexicana participaron:
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Chihuahua
- Erwinions

ÍNDICE

0	INTRODUCCIÓN
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN
2	FUNDAMENTO
3	REFERENCIAS
4	DEFINICIONES
5	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
6	REACTIVOS Y MATERIALES
7	APARATOS E INSTRUMENTOS
8	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (CÉLULAS QUÍMICAMENTE COMPETENTES)
9	TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO
10	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES)
11	TRANSFORMACIÓN POR ELEC
13	REPORTE DE RESULTADOS
14	EVALUACIÓN DE RIESGOS
15	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
16	BIBLIOGRAFÍA
17	OBSERVANCIA DE LA NORMA
18	VIGENCIA

0. Introducción

Actualmente, el amplio y rápido desarrollo de la biotecnología moderna ha brindado importantes posibles soluciones a problemas de interés público contribuyendo directamente al bienestar humano. No obstante, estas posibilidades con frecuencia se ven frenadas por la preocupación pública referente a la bioseguridad o los posibles efectos adversos que la manipulación de microorganismos pueda presentar frente a la salud humana y medio ambiente.

Teniendo en cuenta la poca y ambigua legislación en el país en cuanto al proceso técnico de transformación genética en un microorganismo y reconociendo el gran impacto positivo que resultaría el tener acceso a estas posibilidades, se considera de gran importancia el establecer un protocolo regulado que garantice dicha manipulación genética eficaz y biosegura.

La transformación genética es una técnica de biología molecular compleja que puede llegar a realizarse por distintos métodos. No obstante, existen protocolos ya estandarizados que promueven este proceso de una manera segura y relativamente más sencilla; los métodos convencionales.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método general para la transformación genética por métodos convencionales de microorganismos de Riesgo 2 cuyo destino sea la comercialización del mismo o productos derivados.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que busquen efectuar este método para ya sea en beneficio personal o general.

2. Fundamento

El método se basa en la inserción de material exógeno a un microorganismo de interés por métodos convencionales. El primer protocolo descrito utiliza principalmente el choque térmico como desestabilizador transmembranal permitiendo la entrada de dicho material, mientras que la electroporación utiliza electricidad para realizar el mismo efecto.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:
NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias En Placa.

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

Célula hospedera: microorganismo o célula que sufrirá una alteración en su material genético normal.

Competencia: capacidad temporal de una célula de internalizar ADN exógeno del medio ambiente. Dentro de esta norma solo se hará referencia a competencia artificial.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC): término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

Material genético: macromolécula de origen animal, vegetal o microbiana que contiene información de uno o varios genes en forma de base nitrogenadas y puede ser transmitida de generación en generación.

Material exógeno: material genético que es ajeno al microorganismo o célula en cuestión.

Transformación: proceso en el que se realiza una inserción de un ADN externo a una célula hospedera alterando genéticamente a esta.

Vector de transformación: molécula acarreadora que trae dentro de sí un inserto de material genético de interés. Por medio de técnicas de ingeniería genética esta molécula es introducida a una célula con el clonar o expresar el vector.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a las siguientes abreviaturas y símbolos se entiende por:

mM milimolar
μL microlitros
mL mililitros
mm milímetros
g gramos
pg picogramos
pH potencial de hidrógeno
% por ciento
UFC unidades formadoras de colonias
h horas
min minutos
OD₆₀₀ densidad óptica a 600 nanómetros
LB Luria Bertani
CaCl₂ Cloruro de Calcio
° C grados centígrado
rpm revoluciones por minuto
kV kilovoltios
ms microsegundos

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico.

6.1.1 Reactivos en cuanto a Choque térmico

Agua (entiéndase de ahora en adelante agua destilada con pH cercano a la neutralidad)

Cloruro de Calcio 50mM

FÓRMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Agua 1000 ml
Cloruro de Calcio 5.549 g

PREPARACIÓN

Pesar la cantidad deseada de CaCl_2 respetando la proporción establecida.

Vertir una cama de agua dentro de un matraz aforado al volumen final de la solución.

Añadir el CaCl_2 evitando la adherencia de este a las paredes.

Continuar vertiendo el volumen restante de agua hasta la línea de afore.

Invertir de tres a seis veces el matraz.

De ser necesario, rellenar el volumen hasta el afore.

Almacenar a 4°C.

Cloruro de Calcio 100mM

FÓRMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Agua 1000 ml
Cloruro de Calcio 11.098 g

PREPARACIÓN

Pesar la cantidad deseada de CaCl_2 respetando la proporción establecida.

Vertir una cama de agua dentro de un matraz aforado al volumen final de la solución.

Añadir el CaCl_2 evitando la adherencia de este a las paredes.

Continuar vertiendo el volumen restante de agua hasta la línea de afore.

Invertir de tres a seis veces el matraz.

De ser necesario, rellenar el volumen hasta el afore.

Almacenar a 4°C.

Medio de Cultivo

Lennox Broth

FÓRMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Agua 1000 ml
Tryptona 10 g
Extracto de levadura 5 g
Cloruro de Calcio 5 g

PREPARACIÓN

En caso de utilizar los componentes, suspender estos en un litro de agua y hervir hasta su total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables a manera de que no se exceda tres cuartas partes de la capacidad volumétrica del mismo.

Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe de fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

Medio de Cultivo

Agar Lennox Broth

FÓRMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Agua 1000 ml
Tryptona 10 g
Extracto de levadura 5 g

Cloruro de Calcio 5 g

Agar 20 g

PREPARACIÓN

En caso de utilizar los componentes, suspender estos en un litro de agua y hervir hasta su total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables a manera de que no se exceda tres cuartas partes de la capacidad volumétrica del mismo.

Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua.

Distribuir el volumen, aproximadamente 20 - 25 mL, en cajas petri.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

6.1.2 Reactivos en cuanto a Electroporación

Agua Ultrapura

Medio de cultivo

LB (Véase sección 6.1.1 para formulación y preparación)

Agar LB (Véase sección 6.1.1 para formulación y preparación)

6.2 Materiales

6.2.1 Materiales necesarios en cuanto a Choque térmico

Hielo triturado

Tubos cónicos estériles 50 ml

Pipetas serologicas 10 ml

Microtubos estériles 1.5 ml

Placas Petri.

Codos de vidrio para extensión en placa.

6.2.2 Materiales necesarios en cuanto a Electroporación

Hielo triturado

Microtubos estériles 1.5 ml

Celda de electroporación 2 mm

7. Aparatos e instrumentos

7.1 En cuanto a Choque Térmico

Centrífuga con refrigeración que permita revoluciones mayores a 3000 rpm.

Espectrofotómetro capaz de hacer lectura bajo una longitud de onda de 600 nanómetros.

Campana de seguridad biológica equipada con luz ultravioleta para la esterilización de la misma.

Incubadora con agitación y termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0$ °C, provista con termómetro calibrado.

Baño de agua que mantenga la temperatura hasta $45 \pm 1,0$ °C.

Micropipeta que permita la toma de un volumen que se encuentre en el rango de entre 20 - 200 μ L.

Micropipeta que permita la toma de un volumen que se encuentre en el rango de entre .2 - 20 μ L.

7.2 En cuanto a Electroporación

Electroporador que permita descargas de hasta 3.0 kV y la selección del pulso en un rango de 1.0 a 4.0 ms con una precisión de $\pm .1$ ms.

Campana de seguridad biológica equipada con luz ultravioleta para la esterilización de la misma.

Micropipeta con rango de toma de muestra de entre 20 - 200 μ L.

Micropipeta con rango de toma de muestra de entre 0.2 - 20 μ L.

8. Preparación de la muestra (Células Químicamente Competentes)

8.1 Inocular 15 mL de medio LB con un cultivo iniciador del microorganismo que se desea transformar libre de resistencia a antibiótico. Incubar durante la noche a 37°C en agitación constante a 225 rpm.

8.2 Precalentar medio LB en un baño de agua a 37°C

8.3 Inocular 40 mL del medio precalentado con 1.5 mL del cultivo iniciador obtenido en el

paso 1.

8.4 Crecer en agitador a 37°C y 225 rpm.

8.5 Medir OD₆₀₀ cada 30 minutos hasta que se alcance un valor dentro del rango de 0.4 a 0.6, inmediatamente poner las células en hielo. Permanecer en incubación durante 20 min.

8.6 Recolectar células por centrifugación a ~3,000 rpm por 15 minutos a 4°C.

8.7 Decantar el sobrenadante y con gentileza resuspender la pastilla en 20 mL de CaCl₂ 50 mM helado.

8.8 Poner las células nuevamente a incubar en hielo durante 20 minutos.

8.9 Recolectar células por centrifugación a ~3,000 rpm por 15 minutos a 4°C.

8.10 Decantar el sobrenadante y con gentileza resuspender la pastilla en 4 mL de CaCl₂ 100 mM helado.

8.11 Una vez que la pastilla esté completamente resuspendida, transferir 50 µL mezcla con células a un microtubo de 1.5 mL. Repetir este dependiendo de la cantidad de transformaciones que se desea realizar considerando que por vector, normalmente, es necesario un microtubo.

Una vez que este protocolo es completado, las células deben ser usadas inmediatamente o hasta 24 horas después.

9. Transformación por choque térmico

9.1 Añadir 1 µL (10 pg/µl) de ADN en 50 µL de células competentes en un microtubo de 1.5 mL mezclando suavemente con flicks.

9.2 Colocar la mezcla de células competentes/ADN en hielo durante 30 minutos.

9.3 Realizar choque térmico a cada tubo de transformación colocándolo en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos.

9.4 Incubar los tubos en hielo durante 5 minutos.

9.5 Añadir 950 µL de medio LB y crecer en una incubadora con agitación a 37°C (225 rpm) durante 1 hora.

10. Preparación de la muestra (Células Electrocompetentes)

10.1 Inocular 15 mL de medio LB con un cultivo iniciador del microorganismo que se desea

transformar libre de resistencia a antibiótico. Incubar durante la noche a 37°C en agitación constante a 225 rpm.

10.2 Precalear medio LB en un baño de agua a 37°C

10.3 Inocular 40 mL del medio precalentado con dos centésimas del cultivo iniciador obtenido en el paso 1.

10.4 Crecer en agitador a 37°C y 225 rpm.

10.5 Medir OD₆₀₀ cada 30 minutos hasta que se alcance un valor dentro del rango de 0.4 a 0.6, inmediatamente poner las células en hielo. Permanecer en incubación durante 20 min.

10.4 Recolectar células por centrifugación a ~12,000 rpm por 15 minutos a 4°C.

10.6 Decantar el sobrenadante y con gentileza realizar un lavado de la pastilla con agua Ultrapura. El volumen de agua debe de permanecer igual al decantado, en este caso 40 mL.

10.7 Repetir de una vez más los dos pasos anteriores.

10.8 Recolectar células por centrifugación a ~12,000 rpm por 15 minutos a 4°C

10.9 Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla con 4 mL de agua Ultrapura.

10.10 Una vez que la pastilla esté completamente resuspendida, transferir 50 µL mezcla con células a un microtubo de 1.5 mL.

11. Transformación por electroporación

11.1 Añadir 1 µL (10 pg/µl) de ADN en 50 µL de células competentes en un microtubo de 1.5 mL mezclando suavemente con flicks.

11.2 Recuperar toda la mezcla de ADN/células competentes y colocar en una celda de electroporación de 2 mm.

11.3 Colocar las células en el electroporador y correr el programa. La configuración de este equipo debe variar dependiendo del microorganismo que se desea transformar.

11.4 Añadir 1 mL de medio LB a la celda y resuspender el contenido.

11.5 Recuperar el volumen de la celda y colocar nuevamente en un microtubo de 1.5 mL. Crecer en una incubadora con agitación a 37°C (225 rpm) durante 1 hora.

12. Obtención de Resultados

Independientemente del método convencional proseguir con los siguientes pasos:

12.1 Realizar un ensayo de tamaño de gota de la mezcla de transformación a inocular en el agar LB.

12.1.1 Extender 5, 15, 25 y 50 μL de la mezcla de transformación en una placa individual de agar LB. La técnica se especifica en la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias En Placa.

12.1.2 Incubar las placas a 37°C durante 18-24 horas.

12.1.3 Esperar a que transcurra el tiempo y seleccionar aquella placa en donde se logre identificar UFC aisladas.

13. Reporte de Resultados

El reporte de resultados debe ser emitido en base a lo establecido dentro del PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2012, QUE ESTABLECE LAS CARACTERÍSTICAS Y CONTENIDO DEL REPORTE DE RESULTADOS DE LA O LAS LIBERACIONES REALIZADAS DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS, EN RELACIÓN CON LOS POSIBLES RIESGOS PARA EL MEDIO AMBIENTE Y LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y, ADICIONALMENTE, A LA SANIDAD ANIMAL, VEGETAL Y ACUÍCOLA.

14. Evaluación de Riesgos

Esta Norma Oficial Mexicana explica de manera puntual y general la transformación genética por choque térmico y electroporación buscando la regulación de la creación de Organismos Genéticamente Modificados (en adelante "OGM"). Cabe destacar que, aunque estos métodos sean considerados convencionales, es necesario que cumplan con requisitos para poder regular el proceso como bioseguro para su aplicación:

1. Debido a que se trabaja a nivel molecular es necesario que la persona que desarrolla la técnica cuente con un dominio teórico y práctico que le permita tomar decisiones en base a su conocimiento. En todo momento, este protocolo debe de realizarse en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 dentro de un ambiente estéril. Estos últimos se caracterizan por cumplir con un entrenamiento específico del personal en el manejo de agentes patógenos. En cuanto a las instalaciones, aunque no necesariamente se encuentran aisladas, su acceso es restringido sobre todo cuando se está realizando algún trabajo.
2. Considerando que se puede llegar a trabajar con patógenos u otros agentes/compuestos tóxicos, estos laboratorios deben de cumplir con ciertos equipos y áreas de trabajo; campana de bioseguridad para extracción de gases y manejo de microorganismos, centrifugas, incubadoras de microorganismos,

instrumentos punzocortantes, lavaderos, extintores, mesas y superficies de fácil descontaminación, equipo de protección personal, etc.

3. Uno de los temores más inminentes cuando se habla de modificación genética es la resistencia a antibióticos. Este temor es justificado con el razonamiento de que si un OGM es transformado por un vector plasmídico cuyo gen de selección le confiere la habilidad de crecer en un ambiente con presencia de compuestos antimicrobianos, esta habilidad puede ser transmitida de manera natural a otras bacterias o microorganismos una vez que el OGM se encuentre libre interactuando en el ambiente. Para evitar este problema, la creación de un OGM cuya intención final sea la liberación al ambiente debe ser únicamente por medio de la inserción de un vector de clonación o expresión con selección positiva. El fundamento de estos vectores es la presencia de un gen letal o suicida que puede sustituir un gen de resistencia antibiótico complementado de un gen reportero como fluorescencia (en adelante "gen RFP"). La secuencia codificante de este alterno contiene múltiples sitios de clonación, por lo que solamente si el gen es interrumpido por la ligación de un inserto deseado, la célula hospedera será capaz de crecer. De otra manera, al no suceder la inserción del gen de interés, el gen suicida inhibirá el crecimiento de la bacteria. Usualmente los genes letales utilizados son *sacB* y *ccdB* que codifican para la enzima levan y la toxina *ccdB* respectivamente.
4. Finalmente, los microorganismos que se sometan a la transformación genética deben ser únicamente aquellos que estén considerados dentro de la clasificación de riesgo 1 o riesgo 2 dada por la American Biological Safety Association (en adelante "ABSA") y cuya patogenicidad no vaya dirigida hacia el ambiente y ser vivo con el que vaya a estar en contacto directo. En el caso contrario de este último requerimiento, la bioseguridad debe de ser comprobada dentro del desarrollo experimental del OGM.

15. Concordancia con normas internacionales

La presente norma se realizó en concordancia con El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, emitida por la Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica de la Organización de las Naciones Unidas, en específico con los artículos 1, 2, 4, 15, 16, 19 y el Anexo III del mismo instrumento, en virtud de que:

I.- El objetivo general del protocolo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de prácticas seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos en la diversidad biológica, tomando en cuenta los riesgos para la salud humana. La presente NOM, se realizó en concordancia con estos principios, al listar dentro de sus objetivos el método general de transformación de microorganismo de riesgo 2.

II.- La evaluación del riesgo elaborada en la presente NOM, se ajusta a los lineamientos establecidos en el artículo 15 y el anexo III del Protocolo, dado que el mismo

establece que las evaluaciones de riesgo se llevarán a cabo con arreglo a procedimientos científicos sólidos, y en nuestro proyecto se usa el medio de la inserción de un vector de clonación o expresión con selección positiva, el cual es considerado un procedimiento científico sólido.

III.- De acuerdo al párrafo quinto del artículo 16 del Protocolo establece que las Partes deben “determinar los organismos vivos modificados o los rasgos específicos de organismos vivos modificados que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana”, mismo que se establece tanto en los párrafos introductorios de la presente NOM, como en el apartado de Evaluación de Riesgos, dado que se menciona la preocupación de que se pueda volver la manipulación genética resistente a antibióticos, y es por eso que esta NOM establece específicamente el medio a desarrollar, siendo éste el “medio de la inserción de un vector de clonación o expresión con selección positiva”. Por igual deben “adoptar las medidas adecuadas para el tratamiento de esos organismos vivos modificados o rasgos específicos”, lo cual igual es cumplido de acuerdo a lo que establece el apartado de Evaluación de riesgos puesto que el mismo establece que el lugar en el que se debe llevar a cabo esta inserción de un vector de clonación debe estar restringido, así como el contar con determinados equipos y áreas de trabajo, así como determinadas partes dentro del procedimiento de preparación y transformación de las muestras.

IV.- La presente NOM establece que para el cumplimiento del artículo 19 del Protocolo de Cartagena, las autoridades administrativas a cargo de las funciones y responsabilidades en materia genética son aquellas establecidas en el apartado de “Observancia de la norma”, lo cual es cumplido en la siguiente NOM, estableciendo la obligatoriedad de cumplir por parte de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Cada Parte designará un centro focal nacional que será responsable del enlace con la secretaría en su nombre.

V.- Para dar cumplimiento a lo establecido en el Anexo III del Protocolo de Cartagena, se han contemplado varios puntos aplicables a la presente NOM en el apartado de “Evaluación de riesgos”, siendo el primero el objetivo de la evaluación de riesgos precisamente, el “determinar y evaluar los posibles efectos adversos de los organismos vivos modificados en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica en el probable medio receptor, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana”. En la presente NOM lo establecido anteriormente es cubierto tanto desde la introducción que deja en claro la obligatoriedad de toda persona al realizar el “Método de transformación genética de microorganismos de riesgo 2 por métodos convencionales” de llevar a cabo determinado método de una forma eficaz y biosegura. Igual establece en su apartado de “Evaluación de riesgos” los problemas o miedos que presenta la manipulación del material genético, y establece los materiales y espacios necesarios para manejar los OGMs de manera cuidadosa y responsable.

Por igual cubre el primer principio general del Protocolo, que establece que la evaluación de riesgo deberá de realizarse de forma transparente y científicamente competente, así como

el tener en cuenta el asesoramiento de expertos y las directrices establecidas por las organizaciones internacionales, de acuerdo a lo establecido en el primer párrafo de la “Evaluación de Riesgos” que establece que “debido a que se trabaja a nivel molecular es necesario que la persona que desarrolla la técnica cuente con un dominio teórico y práctico que le permita tomar decisiones en base a su conocimiento.” Por igual cumple con el sexto principio general del Protocolo, dado que la evaluación de riesgo de la presente NOM habla específicamente de las prevenciones y el manejo del material genético al llevar a cabo el método convencional para la transformación genética de microorganismos de riesgo 2.

16. Bibliografía

ABSA. (2017). Riskgroups. Recuperado Septiembre 21, 2017, de <https://my.absa.org/tiki-index.php?page=Riskgroups&default%5Bcontent%5D=bacillus>

Advisory Committee on Dangerous Pathogens. 2013. “The Approved List of biological agents” 3rd Edition. Health and Safety Executive – United Kingdom. <http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf>

Australian/New Zealand Standard AS/NZS 2243.3:2010. “Safety in laboratories Part 3: Microbiological aspects and containment facilities”. <https://law.resource.org/pub/nz/ibr/as-nzs.2243.3.2010.pdf>

Biosafety and Biotechnology Unit. 2008. “Belgian classifications for micro-organisms based on their biological risks - Definitions”. <http://www.biosafety.be/RA/Class/ClassBELdef.html>

CDC. (2010). Laboratory Biosafety Level Criteria. recuperado Septiembre 21, 2017, de https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/bmb15_sect_iv.pdf

World Health Organization. (2004). “Laboratory Biosafety Manual”. 3rd Edition. WHO, Geneva. http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/index.html

World Health Organization. (n.d.). Q&A: genetically modified food. Recuperado Septiembre 21, 2017, de http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/

17. Observancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

18. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor con carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.