

AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT
PPC/CDIE/DI REPORT PROCESSING FORM

PN A136-618

ENTER INFORMATION ONLY IF NOT INCLUDED ON COVER OR TITLE PAGE OF DOCUMENT

1. Project/Subproject Number 522-0168	2. Contract/Grant Number 522-0168-C-00-3040-00	3. Publication Date 1986
--	---	-----------------------------

4. Document Title/Translated Title

5. Author(s)

1.
2.
3.

6. Contributing Organization(s)

7. Pagination	8. Report Number	9. Sponsoring A.I.D. Office
---------------	------------------	-----------------------------

10. Abstract (optional - 250 word limit)

11. Subject Keywords (optional)

1.	4.
2.	5.
3.	6.

12. Supplementary Notes

13. Submitting Official	14. Telephone Number	15. Today's Date
-------------------------	----------------------	------------------

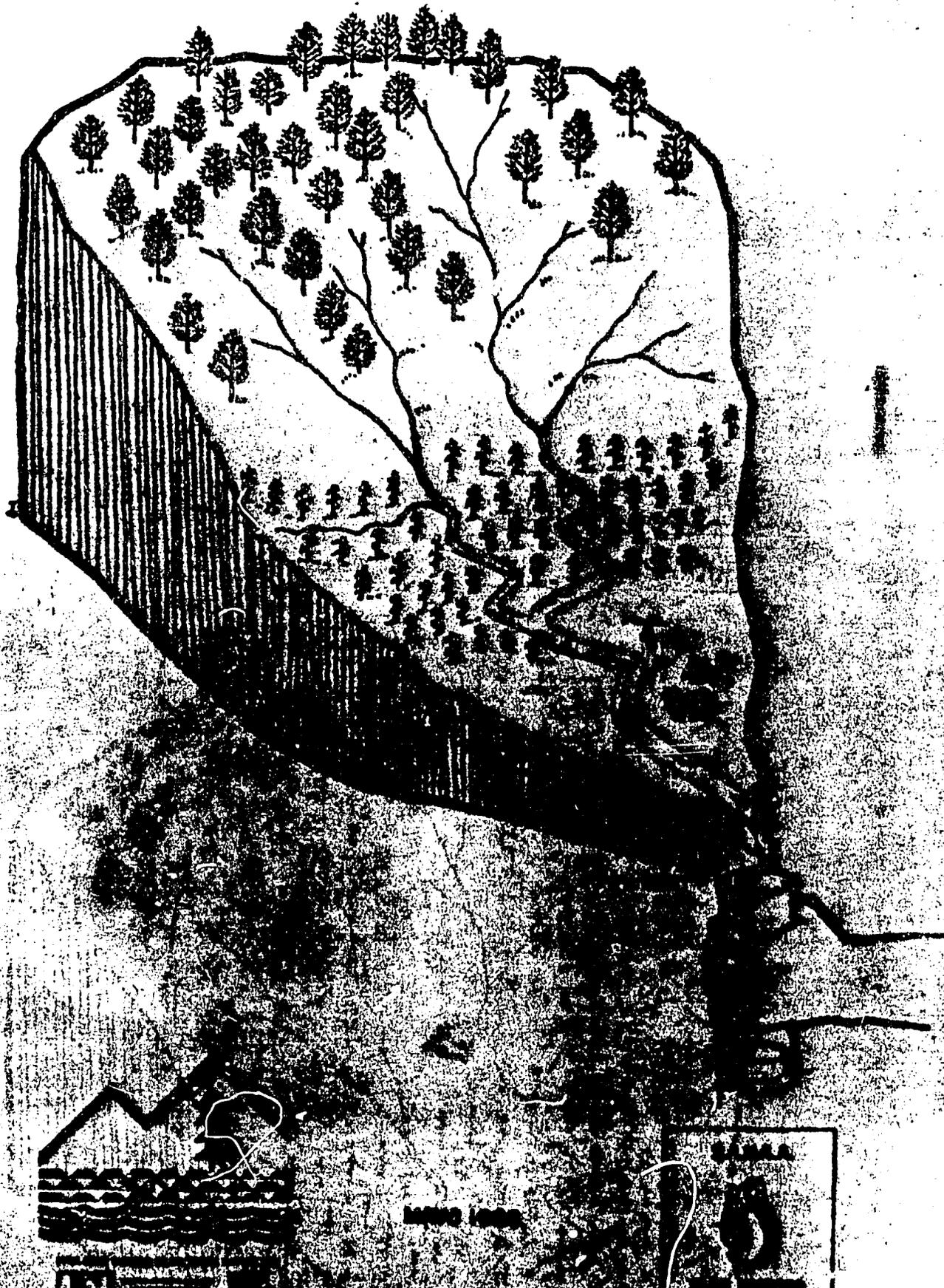
..... DO NOT write below this line

16. DOCID	17. Document Disposition DOCRD [] INV [] DUPLICATE []
-----------	---

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA

EN LA CUENCA DEL RIO GUACERQUE

GUIA TECNICA Y MANUAL DE LABORATORIO



Honduras NRM

355-766

PMABG618

**EL PROGRAMA
MONITOREO
DE LA CALIDAD DEL AGUA
EN LA CUENCA DEL RIO GUACERIQUE**

José Luis Segovia - Limnólogo
Plan Maestro/SANAA
Peter Hearne - Hidrólogo/PMRN
Anne Lewandowski - Especialista
En Monitoreo Ambiental
PMRN/Chemonics Int.

PLAN MAESTRO

Servicio Autónomo Nacional de Acueductos y Alcantarillados

PROYECTO MANEJO DE RECURSOS NATURALES

Secretaría de Recursos Naturales / USAID, Proyecto No. 522-0168

Región de monitoreo de calidad
Monitoreo de la Cuenca del Río Guacerique
Río Guacerique

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen muy especialmente a sus supervisores: Ingeniero Carlos Rivas P., Director Ejecutivo del Proyecto Manejo de Recursos Naturales (PMRN); Ingeniero Eddy Nelson Larios, Director del Plan Maestro, SANAA; Ingeniero Marco Antonio Blair, Jefe Técnico, Plan Maestro, SANAA; y al Ingeniero Paul A. Dulin, Coordinador de Asistencia Técnica, Chemonics International; por todo el apoyo brindado en la formulación del programa de monitoreo. Asimismo, se agradece la colaboración prestada por personas e instituciones como la Licenciada Mirna Marín y la Ingeniero Catherine de Castañeda, Catedráticas de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras; y la Doctora Julia Bustillo, Encargada del Laboratorio Los Laureles, SANAA; quienes revisaron los borradores del programa de monitoreo y el manual de laboratorio. Se agradece también al Proyecto de Agua y Saneamiento Rural (PRASAR), SANAA/USAID (Proyecto No.522-4-036) por su asistencia financiera en la compra del equipo limnológico que se utilizará en el monitoreo y análisis del agua. Finalmente se agradece a todo el personal que apoyó en la producción física del documento, como José Renaldo Rosa Mejía, quien tradujo del inglés al español casi todo el material para la Guía Técnica y Manual de Laboratorio; Héctor Montes, Cartógrafo, PMRN; J. Rodolfo Deras, Productor de Audiovisuales, PMRN; Rafael Antonio Valladares, PMRN; Daysi de Estrada, PMRN; y Zoila E. Jacome, Chemonics Internacional.

I N D I C E

<u>Sección</u>		<u>Páginas</u>
	AGRADECIMIENTO	i
	INDICE	ii
	LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	vi
	INTRODUCCION GENERAL	1
1	Aparatos de Laboratorio, Reactivos y Técnicas	1
1.1	Recipientes	1
1.1.1	Reactivos	1
1.1.2	Soluciones Acidas y Alcalinas Comunes	2
1.1.3	Cristalería Volumétrica	5
1.1.4	Tubos Nessler	5
1.1.5	Resinas de Intercambio de Iones	6
1.1.6	Equipo Colorimétrico y Técnica	6
1.1.7	Otros Métodos de Análisis	10
1.1.8	Interferencias	12
1.1.9	Expresión de Resultados	15
1.2	Unidades	15
1.2.1	Valores Significativos	15
1.2.2	Precisión y Exactitud de Análisis	18
1.3	Enfoque Estadístico	18
1.3.1	Representación Gráfica de Datos	20
1.3.2	Autoevaluación	24
1.3.3	Colección y Preservación de las Muestras	25
1.4	Precauciones Generales	25
1.4.1	Tipos de Muestras	27
1.4.2	Métodos de Muestreo	29
1.4.3	Cantidad	29
1.4.4	Preservación	31
1.4.5	Mediciones Hidrometeorológicas	33
1.5	Caudal	33
1.5.1	Precipitación	38
1.5.2		
2	EXAMENES DE CALIDAD FISICA	41
2.1	Color	41

<u>Sección</u>	<u>Página</u>
2.1.1	Método de Análisis y Cálculo 41
2.2	Conductividad 42
2.2.1	Método de Análisis y Cálculo 47
2.3	Ionización 48
2.4	Ph 49
2.4.1	Método de Análisis y Cálculo 50
2.5	Sólidos 51
2.5.1	Definiciones 51
2.5.2	Fuentes de Error y Variabilidad 51
2.5.3	Manejo y Preservación de la Muestra 52
2.5.4	Sólidos Totales (Secados a 103-105°C) 52
2.5.5	Sólidos Totales Disueltos (Secados a 180°C) 54
2.5.6	Sólidos Totales Suspendidos (Secados a 103-105°C) 55
2.6	Temperatura 59
2.6.1	Método de Análisis y Cálculo 60
2.7	Turbidez 61
2.7.1	Selección de Método 62
2.7.2	Almacenamiento de Muestras 62
2.7.3	Método Nefelométrico 62
3	EXAMENES DE CALIDAD QUIMICA 66
3.1	Alcalinidad 66
3.1.1	Discusión General 66
3.1.2	Aparatos 68
3.1.3	Reactivos 68
3.1.4	Procedimiento 69
3.1.5	Cálculo 70
3.2	Demanda Bioquímica de Oxígeno 74
3.2.1	Muestreo y Almacenamiento 75
3.2.2	Aparatos 75
3.2.3	Reactivos 75
3.2.4	Procedimiento 76
3.2.5	Cálculo 81
3.3	Dureza 83

<u>Sección</u>		<u>Página</u>
3.3.1	Método de Análisis y Cálculo	85
3.4	Fosfato	86
3.4.1	Método de Análisis y Cálculo	86
3.5	Hierro	87
3.5.1	Método de Análisis y Cálculo	87
3.6	Nitrógeno	88
3.7	Nitrógeno (Amoníaco)	92
3.7.1	Selección de Método	92
3.7.2	Interferencias	92
3.7.3	Almacenamiento de Muestras	93
3.7.4	Paso de Destilación Preliminar	93
3.7.5	Método de Nesslerización (Destilación Directa y Siguiete)	95
3.7.6	Método por Titulación	101
3.8	Nitrógeno (Nitrato)	104
3.8.1	Selección de Método	104
3.8.2	Almacenamiento de Muestras	104
3.8.3	Método de Acido Cromotrópico	104
3.8.4	Método de Reducción de la Aleación de Devarda	106
3.9	Oxígeno Disuelto	110
3.9.1	Método de Análisis y Cálculo	112
3.10	Sulfato	113
3.10.1	Selección de Método	113
3.10.2	Muestreo y Almacenamiento	113
3.10.3	Método Gravimétrico de Encender el Residuo	113
3.10.4	Método Gravimétrico de Secar el Residuo	117
3.10.5	Método Turbidimétrico	118
4	EXAMENES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA	122
4.1	Introducción	122
4.2	Pautas de Control de Calidad en el Laboratorio	124
4.2.1	Facilidades y Personal	124
4.2.2	Equipo de Laboratorio e Instrumentación	125
4.2.3	Provisiones del Laboratorio	128
4.2.4	Procedimientos de Control de Calidad Analítico	142

<u>Sección</u>	<u>Página</u>	
4.2.5	Registros y Datos	147
4.2.6	Manejo de Datos	147
4.3	Aparatos de Laboratorio	151
4.3.1	Incubadoras	151
4.3.2	Hornos Esterilizadores de Aire Caliente	151
4.3.3	Autoclaves	151
4.3.4	Contadores de Colonias	152
4.3.5	Equipo de pH	152
4.3.6	Balanzas	152
4.3.7	Utensilios de Preparación del Medio	152
4.3.8	Pipetas y Cilindros Graduados	152
4.3.9	Recipientes de Pipetas	152
4.3.10	Botellas o Tubos de Dilución	153
4.3.11	Cápsulas de Petri	153
4.3.12	Botellas de Muestreo	153
4.4	Lavado y Esterilización	154
4.5	Preparación del Medio de Cultivo	155
4.5.1	Procedimientos Generales	155
4.5.2	Agua	156
4.5.3	Especificaciones del Medio	156
4.6	Muestreo	158
4.6.1	Colección	158
4.6.2	Preservación y Almacenamiento	161
4.7	Técnica de Filtro de Membrana para los Miembros del Grupo Coliforme	162
4.7.1	Procedimiento de Filtro de Membrana de Coliforme Total Estándar	163
4.7.2	Procedimiento de Filtro de Membrana de Coliforme Fecal	174
	REFERENCIAS	
	HOJAS DE MUESTREO Y RESUMEN	

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<u>Cuadro No.</u>		<u>Página</u>
1.1	Preparación de Soluciones de Acido Uniformes	3
1.2	Preparación de Soluciones de Hidróxido de Sodio Uniformes	4
1.3	Resumen de los Requisitos Especiales de Muestreo y Manejo	30
1.4	Fórmulas para Aplicar en el Cálculo de un Aforo	36
1.5	Estaciones Pluviométricas del Programa	38
2.1	Conductancias Iónicas en Dilución Infinita a 25°C en mho-cm ² /equivalente	46
2.2	Iones Comunes Presentes en Aguas Naturales	48
3.1	Relaciones de Alcalinidad	72
3.2	Cationes Principales que Producen Dureza y los Aniones Asociados	83
3.3	Preparación de Estándares de Color Permanentes para la Determinación Visual de Nitrógeno Amoníaco	100
4.1	Calidad del Agua Purificada Usada en Pruebas de Microbiología	130
4.2	Adiciones de Reactivo para la Prueba de Calidad de Agua	132
4.3	Hora y Temperatura para la Esterilización por Autoclave	140
4.4	Tiempo de Retención y Almacenamiento para los Medios Preparados	142
4.5	Cuñtivos de Control para Exámenes Microbiológicos	143
4.6	Cálculo de Criterios de Precisión	144
4.7	Comprobaciones Diarias en la Precisión de Conteos Duplicados	145
4.8	Conteos de Coliformes y sus Logaritmos	148
4.9	Comparación de la Frecuencia de Datos de Conteo	149
4.10	Comparación de la Frecuencia de Datos de Log Conteo	149
4.11	Preparación del Caldo Lauril Triptosa	168
4.12	Volúmenes de Muestras para el Examen de Coliformes Totales - Método de Filtro de Membrana	170

<u>cuadro No.</u>		<u>Página</u>
4.13	Volúmenes de Muestras para el Examen de Coliformes Fecales - Método de Filtro de Membrana	177

<u>Figura No.</u>		<u>Página</u>
1.1	Curva Normal o Guassian de Frecuencias	18
1.2	Ejemplo del Método de Mínimas Cuadrículas	23
1.3	Aforo Calculado	37
1.4	Hoja de Campo de Precipitación	39
1.5	Hoja de Registro Anual de Precipitación	40
2.1	Aparato para Medir Conductividad	43
2.2	Célula Electroquímica	43
2.3	Hoja de Laboratorio para Análisis de Sólidos	58
3.1	Hoja de Laboratorio para Análisis de Alcalinidad	73
3.2	Hoja de Laboratorio para Análisis de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	82
3.3	Fuentes de Anhídrido Carbónico y la Solución de Materia Básica que Causa Dureza	84
3.4	El Ciclo de Nitrógeno	89
3.5	Cambios en la Forma de Nitrógeno Presente en Aguas Contaminadas Bajo Condiciones Aeróbicas	90
3.6	Hoja de Laboratorio para Análisis de Nitrógeno (Amoníaco)	103
3.7	Hoja de Laboratorio para Análisis de Nitrógeno (Nitrato)	109
3.8	Solubilidad del Oxígeno y Nitrógeno en Agua Destilada Saturada con Aire a 760 mm Hg	110
3.9	El Ciclo de Azufre	114
3.10	Hoja de Laboratorio para Análisis de Sulfato	121
4.1	Curva de Frecuencia (Distribución Desviada Posi- tivamente)	148
4.2	Hoja de Laboratorio para Análisis de Bacterias del Grupo Coliforme	179

1 INTRODUCCION GENERAL

1.1 Aparatos de Laboratorio, Reactivos y Técnicas

1.1.1 Recipientes

Para uso general del laboratorio, el material más adecuado para los recipientes es vidrio borosilicato resistente doble. Hay cristalería especial disponible con características tales como resistencia alta al ataque alcalino, contenido bajo de "boro" o exclusión de luz. Escoger tapones, tapas y tacos que resisten el ataque del material contenido en el recipiente. Tapones de corcho envueltos con hojas de metal relativamente inertes son adecuados para muchas muestras. Tapones de rosca metálicos son una mala elección para las muestras que causarán que se corroan rápidamente. Tapones de vidrio no son satisfactorios para líquidos altamente alcalinos por su tendencia a pegarse rápidamente. Los tapones de hule son excelentes para los líquidos alcalinos pero no son aceptables para solventes orgánicos en los cuales ellos se inflan o se desintegran. Usar tapas de "politetrafluoro etileno" (TFEOPTE) o de plata para las buretas que contienen líquidos altamente alcalinos. Cuando sea apropiado, usar otros materiales tales como: porcelana, níquel, hierro, platino, acero inoxidable y vidrio de alto sílice. Colectar y almacenar las muestras en botellas hechas de vidrio borosilicato, hule duro, plástico u otro material inerte que sea apropiado para análisis específico.

Para períodos de almacenamiento relativamente cortos o para los constituyentes que no son afectados al ser almacenados en vidrio suave, tales como calcio, magnesio, sulfato, fluoruro y talvéz otros, la botella ácida de 2.5 L "Bell closure" es satisfactoria. Este encierre tiene un sello de vidrio o polietileno contra la superficie en el área de la boca de la botella y asegura protección adecuada. Si se analizara parte de la muestra para ver si hay sílice, sodio u otra sustancia que podría ser afectada por almacenamiento prolongado en vidrio suave, transferirlo a una botella de plástico pequeña mientras se deja el resto de la muestra en la botella de vidrio suave.

Cuidadosamente limpiar las botellas de las muestras antes de cada uso.

Enjuagar las botellas de vidrio, excepto las que se usarán para los análisis de cromo o manganesio, con una mezcla de limpieza hecha agregando un litro de H_2SO_4 concentrado lentamente, mezclando a 35 mL solución de dicromato de sodio saturada ó con $KMnO_4$ al 2% en una solución KOH al 5% seguido de una solución ácida oxálica. También hay alternativas comerciales. Enjuagar con otros ácidos concentrados para remover la materia inorgánica. Los detergentes son depuradores excelentes para muchos propósitos; usar detergentes o HCl concentrado para limpiar las botellas de hule duro y las plásticas. Después de que las botellas han sido limpiadas, enjuagarlas bien con agua reactivo.

1.1.2 Reactivos

Usar solo reactivos químicos de mejor calidad, aunque esta instruc-

ción no se repite en la descripción de un método en particular.

1.1.3 Soluciones Acidas y Alcalinas Comunes

1.1.3.1 Unidades de concentración usadas: Las concentraciones de reactivos son expresadas en este manual en términos de normalidad, molaridad y volúmenes aditivos.

Una solución normal (N) contiene un gramo de peso equivalente de soluto por gramo de solución.

Una solución molar (M) contiene un gramo de peso molecular de soluto por litro de solución.

En volúmenes aditivos (a+b) el primer número a, se refiere al volumen de reactivos concentrados; el segundo número b, se refiere al volumen de agua destilada requerida para la dilución. Pues "1+9 HCl" denota que un volumen de HCl concentrado se diluirán en nueve volúmenes de agua destilada.

Para hacer una solución de normalidad exacta de un químico que no pueda ser medido como un estándar primario, se debe preparar una solución existente relativamente concentrada y después hacer una dilución exacta a la concentración deseada.

Alternativamente, preparar una solución de una concentración un poco mayor que la que se desea, estandarizar y hacer ajustes adecuados en la concentración por dilución, ó usar la solución como fue estandarizada inicialmente y modificar el factor de cálculo. Este último procedimiento es útil especialmente para las soluciones que cambian de concentración lentamente y que deben ser reestandarizados frecuentemente. Por ejemplo, solución de sodio y tiosulfato. Es deseable ajustar a la normalidad exacta especificada cuando un laboratorio hace un número de determinaciones grandes con una solución estándar. Las determinaciones están de acuerdo con las instrucciones en este manual con tal que la normalidad de una solución estándar no resulte en un volumen de titulación tan pequeño que evite la medida exacta, o tan grande que cause una dilución anormal de la mezcla de reacción, y con tal que la solución sea estandarizada apropiadamente y los cálculos sean hechos apropiadamente.

1.1.3.2 Preparación y dilución de soluciones: Si se preparara una solución de normalidad exacta disolviendo una cantidad pesada de un estándar primario o diluyendo una solución más concentrada, llevarla al volumen exacto en un frasco volumétrico.

Preparar exactamente soluciones existentes y estándares, preservarlas para la determinación colorimétrica en frascos volumétricos. Donde la concentración no tiene que ser exacta, mezclar la solución o sólido concentrado, con cantidades medidas de agua, usando cilindros graduados para estas medidas. Usualmente hay un cambio significativo de volumen cuando se mezclan soluciones fuertes, resultando en un volumen total menor que la suma de los volúmenes usados. Para diluciones apropiadas, los cambios de volumen son imperceptibles cuando las con

centraciones de 6N ó menos son diluidas.

Mezclar completamente cuando se hagan las diluciones. Una de las fuentes más comunes de error en los análisis usando soluciones estándares diluidas en frascos volumétricos es fallar en alcanzar un mezclado completo.

Preparar soluciones de ácidos, agregando cuidadosamente la cantidad requerida de ácido concentrado (ver cuadro 1.1), mezclando al volumen designado de agua destilada. Diluir a 1000 mL y mezclar completamente.

Cuadro 1.1 Preparación de Soluciones de Acido Uniformes

Componen <u>te</u> Deseado	Acido Clorhídrico (HCl)	Acido Sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Acido Nítr <u>ic</u> o (HNO ₃)
Porcentaje del ingredien <u>te</u> activo en reactivo concentrado	36-37	96-98	69-70
Normalidad de reactivo concentrado	11-12	36	15-16
Volumen (mL) de reacti <u>v</u> o concentrado para pre <u>pa</u> rar 1 L de:			
18 N solución	--	500 (1+1)	---
6 N solución	500 (1+1)	167 (1+5)	380
1 N solución	83 (1+11)	28	64
0.1 N solución	8.3	2.8	6.4
Volumen (mL) de 6N reactivo para preparar 1 L de 0.1 N solución	17	17	17
Volumen (mL) de 1 N reactivo para preparar 1 L de 0.02N solución	20	20	20

Preparar soluciones de hidróxido de sodio, NaOH, disolviendo cuidadosamente 625 g NaOH sólido en 800 mL de agua destilada para formar un L de solución. Remover el precipitado de carbonato de sodio manteniendo la solución al punto de ebullición durante algunas horas en un baño María ó dejando asentar las partículas por lo menos 48 horas en un recipiente que sea resistente a alcalinas (forrado de cera o de polietileno) y protegido del CO₂ de la atmósfera con un tubo de cal sodada. Usar el sobrenadante para preparar diluciones alistado en el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.2 Preparación de Soluciones de Hidróxido de Sodio Uniformes

Normalidad de NaOH solución	Peso Requerido de NaOH para preparar 1000 mL de solución, g	Volumen Requerido de 15N NaOH para preparar 1000 mL de solución, mL
6	240	400
1	40	67
0.1	4	6.7

Comprobar las soluciones periódicamente. Protegerlas conectando un tubo de material granular que absorba CO₂, tal como cal sodada o un agente adquirido en el comercio que remueva CO₂. Usar por lo menos 70 cm de tubería de hule para minimizar la difusión de vapor de la botella. Reemplazar el tubo de absorción antes que deje de funcionar. Retirar la solución con un sifón para evitar abrir la botella.

1.1.3.3 Almacenamiento de las soluciones: Algunas soluciones estandarizadas se alteran lentamente por cambios químicos o biológicos. La vida útil, la frecuencia requerida de estandarizaciones y las precauciones de almacenamiento deben de seguirse como están indicadas para tales estándares. Otros tales como HCl diluido no son reactivos. Pero aún su concentración también puede cambiar por evaporación que no ha sido prevenida con un tapón de vidrio. Los cambios de temperatura causan que la botella transpire y permita alguna evaporación.

No se debe considerar un estándar válido por más de un año a menos que sea reestandarizado. Es válido por ese período de tiempo solo si las condiciones minimizan la evaporación y ha sido demostrado previamente que las técnicas de preservación son adecuadas. Si la botella se abre muy seguido y está menos llena de la mitad, ocurre evaporación significativa en unos cuantos meses.

Usar botellas de vidrio químicamente resistentes, excepto donde el vidrio sea incompatible (soluciones de sílice). Para soluciones estándar que no reaccionan con hule o con neopreno, usar tapones de estos materiales, porque ellos pueden, si son bien puestos, prevenir la evaporación mientras la botella esté cerrada. Botellas de tapa de rosca también son efectivas. Si la tapa tiene un sello de hule o de material razonablemente resistente, el uso permisible será más o menos el mismo que el de los tapones de hule.

1.1.3.4 Acido clorhídrico y sulfúrico como alternativas: En varios procedimientos se necesita H₂SO₄ y HCl estandarizados diluidos. A veces estas soluciones son intercambiables. Donde se menciona una, la otra se puede usar si se sabe que no hace diferencia.

1.1.3.5 Preparación: Aunque las instrucciones usualmente describen la preparación de un litro de solución, preparar volúmenes más pequeños o grandes de la manera que se necesiten. Las instrucciones que piden el uso de 100 mL usualmente involucran reactivos de vida corta o éstos

que se usan en pequeñas cantidades.

Una regla general segura es agregar más ácido o alcali concentrado al agua, mezclándose con revolvimiento, en un recipiente que pueda aguantar cambios bruscos de temperatura, y después diluir el volumen final después de enfriar a la temperatura ambiental.

- 1.1.3.6 Concentraciones de reactivo uniformes: Se ha intentado establecer un número de concentraciones uniformes de ácido y base comunes que servirán para el ajuste del pH de las muestras antes del desarrollo de color y de la titulación final. Las siguientes concentraciones ácidas se recomiendan para el uso general de laboratorio: el reactivo concentrado de comercio, 6N, 1N, 0.1N y 0.02N.

1.1.4 Cristalería Volumétrica

Calibrar la cristalería volumétrica u obtener su precisión con un laboratorio competente.

Cuidadosamente medir los pesos y volúmenes al preparar soluciones estándar y curvas de calibración. Usar precauciones similares al medir volúmenes de muestra. Usar pipetas o buretas volumétricas donde el volumen es designado a dos lugares decimales (4.00 mL) en el texto. Usar frascos volumétricos donde sea especificado y cuando el volumen sea dado como 1000 mL en vez de 1 L.

1.1.5 Tubos Nessler

A menos de que se indique de otra manera, usar tubos nessler altos hechos de vidrio resistente. El vidrio debe ser claro e incoloro y los fondos de los tubos deben ser paralelos al plano. Cuando los tubos están llenos con líquido y son vistos desde arriba con una fuente de luz abajo, no deben haber puntos oscuros y no debe haber distorción como de tipo de lente de la luz transmitida.

El tubo de mejor calidad es fabricado por medio del sellado de fusión de un círculo pulido de vidrio molido o preparado separadamente, al tubo para formar un fondo. Tubos menos caros son fabricados con fondos integrables que no pueden ser hechos perfectamente planos pero que pueden parecer satisfactorios. Las bocas de los tubos deben ser planas, preferiblemente pulidas con fuego y suficientemente lisas para permitir que se peguen los cubre objetos para ser sellados. Los tubos nessler con tapones de vidrio claro son disponibles comercialmente. Las marcas de graduación deben circular completamente a los tubos.

Los tubos de 100 mL deben tener un largo total de aproximadamente 375 mm. El diámetro interno debe aproximarse a 20 mm y el diámetro exterior a 24 mm. La marca de graduación debe estar lo más cerca posible a 300 mm arriba del bando interno. Los juegos de tubos deben ser de tal uniformidad que esta distancia no varíe más de 6 mm (hay juegos disponibles comercialmente a los cuales la diferencia máxima entre los tubos no es más de 2mm). Una marca de graduación a los 50 mL es permisible.

Los tubos de 50 mL deberán tener una longitud total de 300 mm. Su diámetro interno se deberá aproximar a 17 mm y el diámetro externo a 21 mm. La marca de graduación en el tubo debe estar lo más cerca posible a 225 mm arriba del bando interno. Los juegos de tubos deberán ser de una uniformidad tal que esta distancia no varíe más de 6 mm (hay juegos obtenibles comercialmente en los cuales la diferencia máxima entre los tubos no es más de 1.5 mm). Una marca de graduación a 25 mL es permisible.

1.1.6 Resinas de Intercambio de Iones

Las resinas de intercambio son herramientas útiles y flexibles usadas en columnas atmosféricas o de alta presión para efectuar separaciones analíticas de ambos iones, inorgánicos y orgánicos. Comúnmente están en la forma de iones contrarios de sodio o hidrógeno (adheridos a la matriz) para los cambiadores de cationes y en la forma de cloruro, formol, acetato y iones contrarios de hidróxido para los cambiadores de aniones. El usuario puede substituir otros iones-contrarios, pasando soluciones regeneradoras a través de una columna de resina de la manera recomendada por el fabricante. La forma que usará en un caso específico dependerá no solo de la afinidad relativa de la resina para iones contrarios y iones de muestra, pero también de los iones que pueden ser tolerados si los iones de muestra concentrados serán ignorados para el análisis. La elución consecutiva de orgánicos usualmente se hace con soluciones amortiguadoras seleccionadas cuidadosamente.

En el análisis de agua, cambiadores de iones pueden ser aplicados para: 1) remover iones interferentes, 2) determinar el contenido total de iones, 3) indicar el volumen aproximado de muestra para ciertas determinaciones gravimétricas, 4) concentrar cantidades trazas de cationes y 5) separar los aniones de los cationes. Este manual recomienda el uso de resinas de cambio de iones para la eliminación de interferencia en la determinación de sulfato y para la determinación del contenido de iones totales ya que el proceso de cambio de ion puede ser aplicado en otras determinaciones. Una descripción corta de operaciones típicas será dada aquí para el uso conveniente donde las aplicaciones suplementarias están garantizadas.

1.1.7 Equipo Colorimétrico y Técnica

Muchos procedimientos dependen del aparear los colores, por ojo o con un instrumento fotométrico. Para obtener los mejores resultados posibles hay que comprender los principios y limitaciones de estos métodos, especialmente porque la escogencia de instrumento y técnica es a discreción. Ambos métodos, visual y fotométrico, están incluidos.

Tubos nessler altos producen un paso de luz de 30 cm. Esto es altamente deseable cuando se van a comparar colores muy pálidos. Los tubos nessler no son caros, su uso no requiere mucho entrenamiento, no están sujetos a fallas mecánicas o eléctricas y, en general, son enteramente satisfactorios para la mayoría de trabajo de rutina.

Porque son portátiles, no requieren una fuente de luz eléctrica y pueden ser usados en el campo.

Los instrumentos fotométricos son más exactos que los tubos nessler. Los resultados obtenidos son instrumentos fotométricos están menos sujetos a prejuicios personales que los métodos visuales y son más reproducibles. Su uso a veces permite que se hagan correcciones para color o turbidez interferentes. No es necesario preparar un juego completo de estándares para cada determinación si se usa un instrumento fotométrico, pero sí es necesario preparar dicho juego, o mantener estándares permanentes, si se usan los tubos nessler para la comparación visual.

Los métodos fotométricos no están libres de limitaciones específicas. Mientras que un analista reconocerá que algo ha ido mal al ver un color o turbidez no común al hacer la comparación visual, tal discrepancia fácilmente puede escapar la detección durante una lectura fotométrica, porque el instrumento siempre producirá una lectura, significativa o no.

Probar la sensibilidad y exactitud frecuentemente probando las soluciones estandar para detectar problemas mecánicos, eléctricos u ópticos en el instrumento y sus accesorios. Para examinar, mantener y reparar dichos instrumentos se necesitan habilidades especiales.

Un fotómetro no es igualmente exacto sobre todo su escala. En transmisiones muy bajas, la escala está llena en términos de concentración, de manera que un cambio considerable en la concentración relativa causará solo un pequeño cambio en la posición del cuadrante indicador o la aguja. En transmisiones muy altas, diferencias pequeñas entre las células ópticas, la presencia de humedad condensada, palmo, burbujas, marcas de los dedos, o una pequeña falta de reproducibilidad al colocar las células puede causar un cambio tan grande en las lecturas como lo haría un cambio considerable en concentración. Un sistema de lectura digital vuelve dichas variaciones muy obvias. Las dificultades se minimizan si se hace que las lecturas caigan entre 0.1 y 1.0 de absorbancia, diluyendo o concentrando la muestra o variando el paso de la luz seleccionado células de tamaño apropiado.

Algunas sugerencias para rangos adecuados son ofrecidas bajo métodos individuales en este manual, pero se debe poner necesariamente mucha confianza en el conocimiento y juicio del analista. La mayoría de los fotómetros son capaces de su mejor ejecución cuando las lecturas caen en el rango de aproximadamente 1.0 a 0.1 de absorbancia con respecto a un blanco ajustado para leer o absorbancia. Entre más se acercan las lecturas a 0 ó 3.0 de absorbancia, se vuelven menos exactos.

Si es impráctico usar una célula óptica con un paso de luz suficientemente largo, como en algunos instrumentos comerciales o concentrar la muestra o seleccionar una prueba más sensitiva de color, en

tonces puede ser más exacto comparar colores muy pálidos en los tubos nessler que intentar lecturas fotométricas cerca de 100% de transmisión.

En general, la mejor longitud de onda o filtro a seleccionar es aquel que produce la mayor amplitud de lecturas entre un estándar y un blanco. Esto normalmente corresponde a un color visual para el rayo de luz que es complementario a el de la solución - por ejemplo, un filtro verde para una solución roja, un filtro violado para una solución amarilla.

Las absorbancias son útiles al comparar sensibilidades de método y al estimar la concentración de soluciones absorbentes tales como "ditizono". La absortividad puede ser computada de:

$$a = \frac{A}{b c}$$

donde

a = absortividad, L/ (g.cm)

A = Absorción de una solución, sin dimensiones

b = Concentración, g/L

c = Longitud del camino de la célula, cm

La absorbancia molar, E, es la absorbancia multiplicada por el peso molecular de una sustancia, L/ (mol. cm).

El uso de un instrumento fotoeléctrico vuelve innecesaria la preparación de un juego completo de estándares para cada juego de muestras que se van a analizar. Sin embargo se debe preparar un blanco y por lo menos uno estándar en el rango final superior de concentración óptima, con cada grupo de muestras para verificar la constancia de la curva de calibración. Esta precaución revelará cualquier cambio no sospechado en los reactivos, el instrumento, o la técnica. A intervalos regulares, o si en cualquier momento, se sospecha de los resultados, preparar un juego completo de estándares por lo menos cinco o seis espaciados para cubrir el rango de concentración óptima, para revisar la curva de calibración. También valioso en este respecto es la información de absorbancia dada en este manual para un número de métodos fotométricos.

Tener cuidado con las curvas de calibración suplidas por el fabricante del instrumento o en el uso de estándares comerciales permanentes o líquidos coloreados o vidrios. Verificar frecuentemente la exactitud de las curvas o los estándares permanentes comparándolos con estándares preparados en el laboratorio, usando el mismo juego de reactivos, el mismo instrumento y los mismos procedimientos que los usados para analizar las muestras. Aún si las curvas de calibración permanentes o los estándares artificiales han sido preparados con exactitud por el fabricante, puede que no sean válidos bajo las condiciones de uso. Los estándares permanentes pueden estar sujetos a desteñirse o a alteración del color. Su validez también puede depender en ciertas condiciones de luz arbitrarias. Los estándares y

curvas de calibración pueden ser incorrectos por pequeñas diferencias en los reactivos, instrumentos o técnicas entre los laboratorios del fabricante y el analista. Si un fotómetro provee lecturas en términos de absorbancia, trazar las curvas de calibración en coordenadas aritméticas; si las lecturas están en términos de porcentaje de transmisión, convertir los valores a absorbancia antes de trazarlos en papel semilogarítmico. Usualmente dichas gráficas darán líneas rectas o casi rectas.

Las determinaciones fotométricas miden la concentración. El volumen de solución usado para la medida fotométrica real varía y contiene solo una fracción del peso total del constituyente presente en el volumen final de la solución. Si los volúmenes finales de los estándares y las muestras son las mismas, entonces la concentración expresada con microgramos por volumen final, es numérica, pero no dimensionalmente igual al número de microgramos en el volumen final. Por eso es posible pero no una buena práctica graficar la absorbancia, A, contra el peso del constituyente, tanto como la gráfica más apropiada de A contra la concentración. Si la gráfica es A contra el peso, los resultados necesitan correcciones cuando el volumen final de la muestra y el estándar no son los mismos.

Usar compensación fotométrica para corregir la interferencia causada por color o turbidez y también para impurezas en los químicos y agua destilada usados en el reactivo blanco. No usarlo para compensar para las sustancias interferentes que reaccionan con los reactivos desarrolladores de color para producir un color (i.e. interferencias positivas). El principio involucrado es la aditividad de absorbancias.

Si hay un blanco significativo pero no hay color o turbidez en la muestra, hacer la corrección necesaria agregando los reactivos desarrolladores de color o agua destilada y ajustando el fotómetro al punto nulo con la solución resultante.

Si hay color o turbidez o ambos en la muestra, pero un blanco insignificante, corregirlo llevando una porción de muestra adicional a través del procedimiento, pero omitir uno de los reactivos desarrolladores de color esenciales o, preferiblemente, eliminar el color después de que se ha producido, pero de una manera tal que el color interferente o la turbidez no sean eliminadas. Usar este blanco especial para anular al fotómetro. Tomar en cuenta cualquier cambio significativo en el volumen producido por la adición u omisión de reactivos.

Si hay color o turbidez o ambos presentes en la muestra o si, además, el blanco es significativo, un procedimiento un poco más complicado se necesita para corregir ambas interferencias. Preparar la curva de calibración poniendo el fotómetro en absorbancia cero con agua destilada sencilla y leer todos los estándares, incluyendo un estándar cero o blanco contra el agua destilada. Si la gráfica es posteada de la manera recomendada, y se sostiene la ley de Beer, se obtendrá una línea recta; pero si hay un blanco medible, esta línea no pasará por el punto de origen.

Para cada muestra, preparar un blanco especial omitiendo un reactivo o eliminando el color como se describió arriba. Poner cada blanco en el fotómetro uno a uno, ajustar el instrumento cada vez para que sea absorbancia cero y leer cada muestra desarrollada regularmente contra su blanco correspondiente. Interpretar las absorbancias observadas de la gráfica de calibración. Como siempre, hay que considerar cualquier incremento o decremento significativo en el volumen causado por la adición u omisión de reactivos en los cálculos.

En la comparación de color visual con algunos instrumentos, compensar para el color y turbidez por medio de la técnica "Walpole". Ver la muestra tratada, después de desarrollo de color a través de agua destilada, pero ver el estándar de color a través de una muestra no tratada. Es inconveniente usar la técnica Walpole cuando se estén observando tubos nessler altos en posición axilar por la incomodidad que se deriva de su longitud.

Algunas veces, no se puede aplicar ninguno de los procedimientos citados. En tal caso, hay varias maneras disponibles para separar la turbidez de una muestra. La naturaleza de la muestra, el tamaño de las partículas y los motivos por los cuales se conduce el análisis se combinarán para dictar el método para remover la turbidez. La turbidez se puede coagular agregando sulfato de zinc y un alcali, como se hace en el método de nesslerización directo para nitrógeno amoníaco. Para las muestras de turbidez relativamente gruesa, centrifugando puede ser suficiente. En algunas instancias, filtros de fibra de vidrio de porosidad fina servirán para tal propósito. Para tamaños de partículas muy pequeñas, los filtros de membrana pueden proveer la retentividad requerida. Usados con discreción, cada uno de estos métodos producirá resultados satisfactorios en una situación conveniente. Sin embargo, se debe hacer énfasis que no hay ningún método universal ideal de eliminación de turbidez disponible. Además, hay que estar perfectamente alerta a las pérdidas de absorción posibles con cualquier procedimiento de floculación o filtración.

1.1.8 Otros Métodos de Análisis

El uso de un método instrumental de análisis que no ha sido descrito específicamente en los procedimientos en este manual, es permisible con tal de que los resultados así obtenidos sean examinados periódicamente o contra un método estándar descrito aquí o contra una muestra estándar de composición sin disputa. Identificar cualquier método instrumental de este tipo usado en el reporte del laboratorio con los resultados analíticos.

- 1.1.8.1 Espectrometría de absorción atómica: La espectrometría de absorción atómica ha sido aplicada a la determinación de metales en el agua sin la necesidad de concentración anterior o pretratamiento de la muestra extensivo. El uso de solventes orgánicos apareados con oxiacetileno, oxyhidrógeno o llamas de acetileno óxido nitroso habilita la determinación de metales que forman óxidos refractorios.

Estos estándares incluyen métodos de absorción atómica-incluyendo ciertas técnicas sin llamas y electrotermales (grafito calentado)-para muchos metales.

- 1.1.8.2 Fotometría de llama: La fotometría de llama se usa para la determinación de sodio, potasio, litio y estroncio.
- 1.1.8.3 Espectroscopia de emisión: Espectroscopía de emisión de chispa de arco es un instrumento analítico importante y está resultando de mucho valor para los análisis de trazas y para ciertas determinaciones que no son fáciles de hacer por cualquier otro método. Se requieren entrenamiento especializado considerable y experiencia con esta técnica para obtener resultados satisfactorios y frecuentemente es práctico para obtener solo resultados semicuantitativos de dichos métodos. Un espectrógrafo de emisión de chispa de arco es relativamente caro cuando es usado exclusivamente para pruebas de agua de rutina pero su compra puede ser justificada si es usado como un instrumento analítico de laboratorio general.
- 1.1.8.4 Electrodo de iones selectivos: Los electrodos de iones selectivos están disponibles para la estimación rápida de ciertos constituyentes en el agua. Estos electrodos funcionan mejor en conjunción con un medidor de pH de escala expandida o un medidor de milivoltios adecuado. En su mayoría los electrodos operan en el principio de intercambio de iones. Los electrodos de ion selectivo ahora están diseñados para medir amoníaco, cadmio, calcio, cobre divalente, dureza, hierro, potasio, plata, sodio, cationes morovalentes totales y divalantes totales, bromuro, cloro, cianuro, fluoruro, yodo, nitrato, perclorato y aniones de sulfuro, entre otros.

Estos artefactos están sujetos a grados variantes de interferencia de otros iones en la muestra y muchos todavía deben recibir estudio completo para justificar su adopción como métodos tentativos y estándares. Sin embargo, su valor para el monitoreo de actividades es aparente. Para eliminar todas las dudas de variaciones en confiabilidad, examinar cada electrodo en la presencia de interferencias y también el ion para el cual es destinado.

Los probos de oxígeno disuelto adquiridos en el comercio varían considerablemente en sus requisitos de confiabilidad y mantenimiento. Aún con estos contratiempos, han sido aplicados para el monitoreo de OD en una variedad de aguas y aguas negras. La mayoría de los probos contienen un electrolito que es mantenido en su lugar por una membrana permeable de oxígeno. El OD en solución se difunde a través de la membrana y la capa de electrolito para reaccionar en el electrodo, induciendo una corriente proporcional a la actividad y por lo tanto, en una solución de concentración baja o constante, esencialmente proporcional a la concentración de OD. Electrodo OD satisfactorios también se pueden obtener sin membrana. En cualquiera de los casos, mantener la superficie del sensor OD en movimiento y proveer compensación de temperatura para asegurar resultados aceptables.

1.1.9 Interferencias

Muchos procedimientos analíticos están sujetos a interferencias de sustancias presentes en la muestra. Las interferencias más comunes y obvias son conocidas y se presenta información acerca de ellas en los detalles de procedimientos individuales. Es inevitable que interferencias desconocidas e inesperadas puedan ser encontradas. Tales ocurrencias son imposibles de evitar por la naturaleza diversa de las aguas y particularmente de las aguas negras.

Algunas pocas sustancias - tales como cloro, dióxido de cloro, alumbre, sales de hierro, silicatos, sulfato de cobre, sulfato de amoníaco y polifosfatos son tan ampliamente usados que ellos merecen una mención especial como causas posibles de interferencia. De estos, el cloro es probablemente el peor ofensor, en el sentido de que elimina o altera los colores de muchos reactivos orgánicos sensitivos que sirven como indicadores de titulación y como desarrolladores de color para los métodos fotométricos. Entre los métodos que han sido efectivos para remover los residuos de cloro están la adición de cantidades mínimas de sulfito, tiosulfato o arsenito, exposición a la luz solar o una fuente ultravioleta artificial y almacenamiento prolongado.

Cuando se encuentre o se sospeche interferencia y no se han dado recomendaciones específicas para superarla, es necesario determinar la técnica apropiada para eliminar esta interferencia sin afectar adversamente el análisis en sí. Si se ofrecen dos o más opciones, el procedimiento más usado tiende a ser menos afectado por la presencia de la sustancia interferente. Si distintos procedimientos producen resultados considerablemente diferentes, es muy probable que haya interferencia presente. Algunas interferencias se vuelven menos severas al diluirlas o al usar muestras más pequeñas; cualquier tendencia de los resultados para incrementar o decrementar de una manera consistente con la dilución indica la probabilidad de efectos de interferencia.

- 1.1.9.1 Tipos de interferencia: La interferencia puede causar que los resultados analíticos sean muy altos o muy bajos, como consecuencia de una de las siguientes reacciones:
- 1) Una sustancia interferente puede reaccionar como si fuera la sustancia que se busca y así producir un resultado alto; por ejemplo el bromuro responde a la titulación como si fuera cloruro.
 - 2) Una sustancia interferente puede reaccionar con la sustancia que se busca y así producir un resultado bajo.
 - 3) Una sustancia interferente se puede combinar con el reactivo analítico y así prevenir que él reaccione con la sustancia que se busca; por ejemplo, el cloro destruye a muchos indicadores y reactivos desarrolladores de color.

Casi cualquier interferencia será de una de estas clases. Por ejemplo, en un método fotométrico la turbidez puede ser considerada como una sustancia que actúa como la que se está determinando, eso es, que reduce la transmisión de la luz.

Ocasionalmente dos o más sustancias interferentes, si están presentes simultáneamente, pueden obrar recíprocamente en una manera no aditiva, cancelándose ó engrandeciendo los efectos la una de la otra.

1.1.9.2 Interferencia contrarrestante: La mejor manera de minimizar la interferencia es removiendo la sustancia interferente o hacerlo ino-
cua por uno de los métodos siguientes:

- 1) Remover físicamente la sustancia interferente o la sustancia que se busca. Por ejemplo, extraer por destilación fluoruro y amoníaco, dejando las interferencias atrás. Las interferencias también pueden ser absorbidas en una resina de intercambio de iones.
- 2) Ajustar el pH para que solo reaccione la sustancia que se busca, por ejemplo, ajustar el pH a 2 para que los ácidos volátiles se eliminen de una solución.
- 3) Oxidar o reducir la muestra para convertir la sustancia interferente a una forma no dañina. Por ejemplo, reducir el cloro o cloruro agregando tiosulfato; digerir las muestras para el análisis por espectrometría de absorción atómica con uno de una variedad de reactivos de digestión para destruir la materia orgánica.
- 4) Agregar un agente adecuado para que se forme un complejo de la sustancia interferente para que sea inocuo aunque siga presente. Por ejemplo, formar un complejo de hierro con pirofosfato para prevenir que interfiera con la determinación de cobre; formar un complejo de cobre con cianuro o sulfato para prevenir la interferencia con la determinación titrimétrica de dureza.
- 5) Se puede usar una combinación de las cuatro primeras técnicas. Por ejemplo, destilar fenoles de una solución ácida para prevenir que los aminos destilen; usar tiosulfato en el método "ditizona" para zinc para prevenir que la mayoría de metales interferentes pasen a la capa de CCl_4 .
- 6) El color y la turbidez a veces se pueden destruir con cenizas húmedas o mojadas o pueden ser removidos usando un agente floculante. Algunos tipos de turbidez pueden ser removidos por filtración. Estos procedimientos sin embargo, introducen el peligro que el constituyente que es el sujeto de análisis, también pueda ser removido.

1.1.9.3 Compensación para la interferencia: si ninguna de las técnicas anteriormente descritas es práctica, se pueden usar varios métodos de compensación:

- 1) Si el color o la turbidez inicialmente presente interfiere en una determinación fotométrica, puede ser posible usar compensación fotométrica.
- 2) Determinar la concentración de sustancias interferentes y agregar cantidades idénticas a los estándares de calibración. Esto implica mucho trabajo.

- 3) Si la interferencia no continúa incrementándose mientras la concentración de sustancias interferentes se incrementa, pero tiende a nivelarse, agregar un exceso grande de sustancia interferente a todas las muestras y a todos los estándares.
- 4) La presencia en los reactivos químicos de la sustancia que se busca puede ser determinada llevando a cabo una determinación del blanco.

1.2

Expresión de Resultados

1.2.1 Unidades

Este manual recomienda el uso de Sistema Internacional de Unidades (SI) y los resultados químicos y físicos se expresan en miligramos por litro (mg/L). Anotar solo los valores significativos. Si las concentraciones generalmente son menores de 1 mg/L puede ser más conveniente expresar los resultados en microgramos por litro (ug/L). Siempre usar ug/L cuando las concentraciones sean menores de 0.1 mg/L.

Los equivalentes de unidad por millón y el término idéntico pero menos ambiguo, equivalentes de miligramo por litro ó miliequivalentes por litro (me/L), pueden ser valiosos para hacer cálculos de tratamiento de agua y análisis de examen por balance de anión-cación.

1.2.2 Valores Significativos

Para evitar la ambigüedad al reportar los resultados ó al presentar las instrucciones para un procedimiento, es la costumbre usar "valores significativos". Todos los dígitos en un resultado reportado se espera que sean conocidos definitivamente, exceptuando el último dígito, el cual puede estar en duda. Se dice que tal número contiene solo valores significativos. Si se tiene más de un dígito dudoso, el dígito ó dígitos extras no son significativos. Si se reporta un resultado analítico como "75.6 mg/L" el analista debe estar bien seguro del "75" pero puede estar inseguro si el "6" debería ser .5 ó .7 ó aún .4 ó .8, debido a la inseguridad inevitable en el procedimiento analítico. Si la desviación estándar se conoce a partir de un trabajo anterior de ser + 2 mg/L, el analista debería haber redondeado el resultado a "76 mg/L" antes de reportarlo. Por otra parte, si el método fuera tan bueno que un resultado de "75.61 mg/L" pudiera haber sido reportado concienzudamente, entonces el analista no lo debería haber redondeado a 75.6. Reportar solo los dígitos que son justificadas por la exactitud del trabajo. No seguir la práctica muy común de requerir que las cantidades listadas en una columna tengan el mismo número de dígitos a la derecha del punto decimal.

1.2.2.1 **Rondear:** Redondear eliminando los dígitos que no sean significativos. Si se elimina al dígito 6, 7, 8 ó 9, incrementar el dígito anterior por una unidad; si el dígito 0, 1, 2, 3, ó 4 se elimina, no alterar el dígito anterior. Si se elimina el dígito 5, redondear el dígito anterior al número par más cercano así 2.25 se vuelve 2.2 y 2.35 se vuelve 2.4.

1.2.2.2 **Ceros ambiguos:** El dígito cero puede indicar una medida de cero ó puede simplemente servir como un espaciador para localizar el punto decimal. Si el resultado de una determinación de sulfato se reporta como 420 mg/L, el lector puede estar en duda sobre si el cero es significativo o no porque el cero no puede ser suprimido. Si un analista calcula un residuo total de 1146 mg/L, pero se da cuenta que el 4 está un poco dudoso y que por esa razón el 6 no tiene significación, el resultado debe ser redondeada a 1150 mg/L y reportada así

pero aquí, también, el lector del reporte no sabrá si el cero es significativo, aunque el número puede ser expresado como una potencia de 10 (e.g. 11.5×10^2 ó 1.15×10^3). Esta forma no es usada generalmente porque no es consistente con la expresión normal de resultados y puede causar confusión. En la mayoría de los otros casos no habrá duda del sentido en el cual se usa el dígito cero. Es obvio que los ceros son significativos en números tales como 104 y 40.08. En un número escrito como 5.000, se comprende que todos los ceros son significativos ó de otra manera el número se puede haber redondeado a 5.00, 5.0 ó 5, el que fuera apropiado. Cuando el cero es ambiguo, es recomendable acompañar el resultado con un estimado de su incertidumbre.

A veces se eliminan ceros sin una buena causa. Si se lee en una bureta "23.60 mL", se debe anotar así y no como "23.6 mL". El primer número indica que el analista se esforzó en estimar el segundo lugar decimal; "23.6 mL" indica más bien una lectura sin cuidado en la bureta.

1.2.2.3 La anotación de "más ó menos" (+): Si un cálculo produce como resultado "1476 mg/l" con una desviación estándar de ± 40 mg/L se debe reportar como 1480 ± 40 mg/L. Sin embargo, si la desviación estándar es estimada como ± 100 mg/L, es necesario redondear la respuesta aún más y reportarla como 1500 ± 100 mg/L. Por medio de este mecanismo se evita la ambigüedad y el lector del reporte puede notar que los ceros solo son espaciadores. Aunque el problema de ceros ambiguos no esté presente, mostrando la desviación estándar es una ayuda ya que provee un estimado de confiabilidad.

1.2.2.4 Cálculos: Como una regla de operaciones prácticas se redondea el resultado de un cálculo en el cual varios números son multiplicados ó divididos a tan pocos valores significativos como las que están presentes en el factor que tiene menos valores significativos. Por ejemplo, suponiendo que se necesitan hacer los cálculos siguientes para obtener el resultado de un análisis:

$$\frac{56 \times 0.003462 \times 43.22}{1.684}$$

Una calculadora de diez lugares produce un resultado de "4.975740998". Es necesario redondear este número a "5.0" porque una de las medidas que entra en el cálculo, 56, solo tiene dos valores significativos. No será necesario medir los otros tres factores a cuatro valores significativos porque "56" es "la unión más débil en la cadena" y limita la exactitud del resultado. Si los otros factores fueran medidos a solo tres, en vez de cuatro valores significativos, el resultado no sufriría y el trabajo podría ser menor.

Cuando se suman ó restan números, el número que tenga menos lugares decimales y no necesariamente menos valores significativos, representa el límite del número de lugares que justificadamente pueden ser acarreados en la suma ó diferencia. Por ejemplo, en la suma:

$$\begin{array}{r} 0.0072 \\ 12.02 \\ 4.0078 \\ 25.9 \\ \hline 4886 \\ 4927.9350 \end{array}$$

el resultado debe ser redondeada a "4928", sin decimales, porque uno de los sumandos, 4886, no tiene lugares decimales. Se puede no tar que otro sumando, 25.9, solamente tiene tres valores signific tivos y aún así no se le pone un límite al número de valores signi ficativos en el resultado.

1.3

Precisión y Exactitud de Análisis

Se debe hacer una distinción clara entre los términos "precisión" y "exactitud" cuando son aplicados a métodos de análisis. Precisión se refiere a la reproducción de un método cuando es repetido en una muestra homogénea bajo condiciones controladas, sin considerar si los valores observados están desplazados ampliamente del valor verdadero debido a errores sistemáticos o constantes presentes a través de las mediciones. La precisión puede ser expresada por medio de la desviación estándar. La exactitud por otra parte se refiere a la concordancia entre la cantidad de un componente medido por el método de prueba y la cantidad realmente presente. El error relativo expresa la diferencia entre la cantidad medida y la cantidad real, como un porcentaje de la cantidad real. Un método puede tener una precisión muy alta pero recobra solo una parte del constituyente que está siendo determinado; o un análisis aunque preciso, puede estar equivocado porque las soluciones han sido estandarizadas pobremente, técnica de dilución es inadecuada, pesos de balanza son inadecuados o el equipo ha sido calibrado inapropiadamente. Por otro lado, un método puede ser exacto pero le puede faltar precisión debido a la baja sensibilidad del instrumento, la tasa variable de actividad biológica, u otros factores fuera del control del analista.

1.3.1 Enfoque Estadístico

1.3.1.1 Desviación estándar (σ): La experiencia ha enseñado que si una determinación es repetida un gran número de veces bajo esencialmente las mismas condiciones, los valores observados, X , serán distribuidos al azar como un promedio como un resultado de errores incontrolables o experimentales. Si hay un número infinito de observaciones de universo común de causas, un plano de frecuencia relativa contra la magnitud producirá una curva simétrica con forma de campana conocida como la curva Gaussian o normal (Figura 1.1).

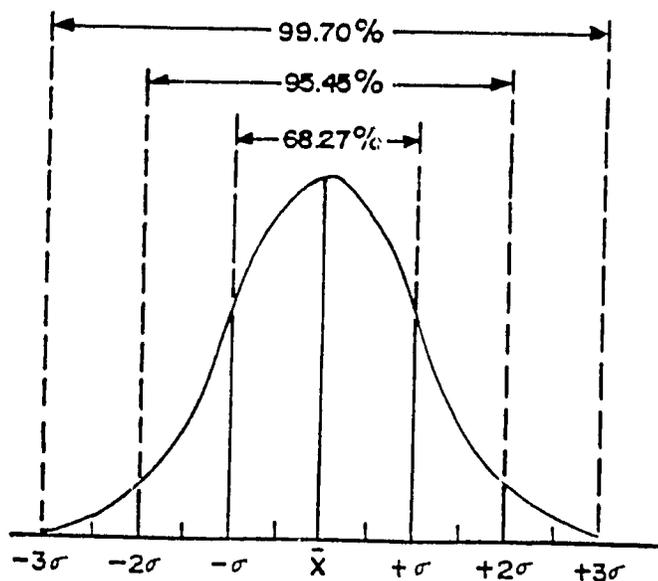


Figura 1.1 Curva Normal ó Gaussian de Frecuencias

La forma de esta curva está definida por dos parámetros estadísticos: (1) La media ó promedio, \bar{x} , de n observaciones; y (2) la desviación estándar, σ , la cual fija el ancho ó extensión de la curva en cada lado de la media. La fórmula es:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

La proporción de las observaciones totales incluidas dentro de cualquier rango determinado alrededor del promedio está relacionada a la desviación estándar. Por ejemplo 68.27% de las observaciones caen entre $\bar{x} \pm 1\sigma$; 95.45% entre $\bar{x} \pm 2\sigma$; 99.70% entre $\bar{x} \pm 3\sigma$.

Estos límites no se aplican exactamente para cualquier ejemplo finito de una población normal; el acuerdo con ellos puede esperarse que sea mejor conforme el número de observaciones, n, aumenta.

1.3.1.2

Aplicación de desviación estándar: Si la desviación estándar para un procedimiento analítico en particular ha sido determinado de un número grande de muestras, y un juego de réplicas n en una muestra da un resultado promedio, \bar{x} , hay una probabilidad del 95% de que el valor verdadero del promedio para esta muestra esté entre los valores $\bar{x} \pm 1.96 \sigma / \sqrt{n}$. Este rango se conoce como el intervalo de confianza del 95%. Este intervalo provee un estimado de confiabilidad del promedio y puede ser usado para predecir el número de réplicas que se necesitan para asegurar precisión adecuada.

Si la desviación estándar es desconocida y es estimada a partir de una sola muestra pequeña, o unas pocas muestras pequeñas, el intervalo de confianza de 95% del promedio de "n" observaciones está dado por:

$$\bar{x} \pm t \sigma / \sqrt{n}$$

Donde t tiene los siguientes valores

n	t
2	12.71
3	4.30
4	3.18
5	2.78
10	2.26
∞	1.96

El uso de t compensa la tendencia de las muestras pequeñas de menospreciar la variabilidad.

Una "muestra pequeña" en discusiones estadísticas significa un número pequeño de determinaciones réplicas, n , y no se refiere a la cantidad usada para una determinación.

1.3.1.3

Rango (R): La diferencia entre la más pequeña y la más grande de las observaciones n también está claramente relacionada a la desviación estándar. Cuando la distribución de errores es normal en su forma, el rango, R , de n observaciones excede la desviación estándar multiplicada por un factor d_n solamente en el 5% de los casos. Los valores para el factor d_n son:

n	d_n
2	2.77
3	3.32
4	3.63
5	3.86
6	4.03

Porque es más bien una práctica general hacer análisis de réplicas, el uso de estos límites es muy conveniente para detectar técnicas con fallas, errores de muestreo grandes, u otras causas asignables de variación.

1.3.1.4

Rechazo de datos experimentales: Con mucha frecuencia, en una serie de observaciones uno ó más de los resultados se desvían bastante del promedio, donde los otros valores están muy de acuerdo con él. En este punto se debe decidir si se rechazan los valores que no están de acuerdo con la mayoría. Teóricamente, ningún resultado debe ser rechazado porque la presencia de resultados dudosos pueden indicar técnicas desapropiadas y por lo tanto, poner en duda todos los resultados. Se debe rechazar el resultado de cualquier prueba en la cual ha ocurrido un error conocido. Para los métodos de rechazo de otros datos experimentales, consultar textos básicos de química analítica ó medidas estadísticas.

1.3.2

Representación Gráfica de Datos

La representación gráfica de datos es uno de los métodos más simples para enseñar la influencia de una variable sobre la otra. Las gráficas frecuentemente son deseables y ventajosas en los análisis colorimétricos porque ellas muestran cualquier variación de una variable con respecto a la otra dentro de límites específicos.

1.3.2.1

General: Papel milimetrado es satisfactorio para la mayoría de los propósitos: Para algunas gráficas se prefiere papel semilogarítmico.

Worthing y Geffner han dado cinco reglas para escoger escalas y coordenadas. Aunque estas reglas no son inflexibles, son satisfactorias. Cuando aparece una duda hay que usar el sentido común. Las reglas son:

- 1) Postear las variables independientes y dependientes en la abscisa y la ordenada en una manera que pueda ser comprendida fácilmente.
- 2) Escoger las escalas para que el valor de cualquiera de las coordenadas pueda ser encontrado fácil y rápidamente.
- 3) Postear la curva para que cubra lo más del papel gráfico que se pueda.
- 4) Escoger las escalas para que la pendiente se acerque a la unidad lo más posible.
- 5) Otros casos siendo iguales, escoger las variables para dar un resultado que será una línea lo más recta posible.

Titular la gráfica para descubrir adecuadamente lo que el posteo intenta enseñar. Presentar leyendas en la gráfica para clarificar las posibles ambigüedades. Incluir en la leyenda una información completa acerca de las condiciones bajo las cuales se obtuvieron los datos.

1.3.2.2

Método de Mínimas Cuadrículas: Si hay suficientes puntos disponibles y la relación funcional entre las dos variables está bien definida, se puede dibujar una curva suave a través de los puntos. Si la función no está bien definida, como es muy frecuente en el caso cuando se usan datos experimentales, usar el método de mínimas cuadrículas para encajar una línea recta al patrón.

Cualquier línea recta puede ser representada por la ecuación $X = mY + b$. La pendiente de la línea está representado por la constante "m" y la intersección de la pendiente en el eje X está representado por la constante "b". El método de mínimas cuadrículas tiene la ventaja de proporcionar un juego de valores para estas constantes que no dependen del juicio del investigador. Dos ecuaciones además de la de la línea recta están involucradas en estos cálculos:

$$m = \frac{n \sum XY - \sum Y \sum X}{n \sum Y^2 - (\sum Y)^2}$$

$$b = \frac{\sum Y^2 \sum X - \sum Y \sum XY}{n \sum Y^2 - (\sum Y)^2}$$

Siendo "n" el número de observaciones (juegos de los valores de X y Y) que serán sumados. Para computar las constantes por medio de este método, primero calcular $\sum X$, $\sum Y$, $\sum Y^2$ y $\sum XY$. Llevar a cabo estas operaciones a más lugares que el número de valores significativos en los datos experimentales porque se asume que los valores experimentales son exactos para los propósitos de los cálculos.

Ejemplo: Dados los siguientes datos para ser graficados, encontrar la mejor línea para encajar los puntos:

Absorbancia	Concentración de soluto, mg/L
0.10	29.8
0.20	32.6
0.30	38.1
0.40	39.2
0.50	41.3
0.60	44.1
0.70	48.7

Dejar que Y sea los valores de absorbancia que están sujetos a errores y X la exactamente conocida concentración de soluto. Primero encontrar la sumatoria (\sum) de X, Y, Y^2 y XY:

X	Y	Y^2	XY
29.8	0.10	0.01	2.98
32.6	0.20	0.04	6.52
38.1	0.30	0.09	11.43
39.2	0.40	0.16	15.68
41.3	0.50	0.25	20.65
44.1	0.60	0.36	26.46
48.7	0.70	0.49	34.09
\sum 273.8	2.80	1.40	117.81

Después substituir las sumatorias en las ecuaciones para m y b; n = 7 porque hay siete juegos de los valores de X y Y:

$$m = \frac{7 (117.81) - 2.80 (273.8)}{7 (1.40) - (2.80)^2} = 29.6$$

$$b = \frac{1.4 (273.8) - 2.80 (117.81)}{7 (1.40) - (2.80)^2} = 27.27$$

Para postear la línea seleccionar tres valores calculados de Y, por ejemplo: 0, 0.20, 0.60 y calcular los valores correspondientes de X:

$$X_0 = 29.6 (0) + 27.27 = 27.27$$

$$X_1 = 29.6 (0.20) + 27.27 = 33.19$$

$$X_2 = 29.6 (0.60) + 27.27 = 45.04$$

Cuando los puntos que representan estos valores están posteados en la gráfica quedarán en una línea recta (a menos que se halla hecho un error en el cálculo); esa es la línea que queda mejor para los datos experimentales. Estos puntos de datos están posteados en la Figura 1.2.

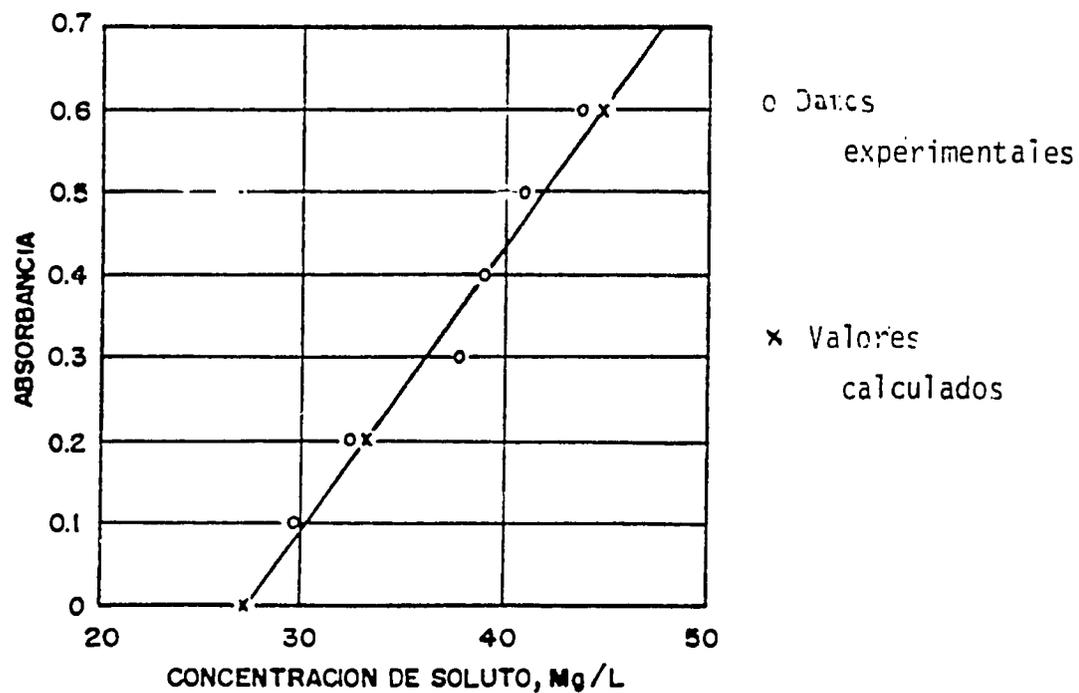


Figura 1.2 Ejemplo del Método de Mínimas Cuadrículas

1.3.3

Autoevaluación (Filosofía Deseable del Analista)

Un buen analista mezcla la confianza con la duda. Estas dudas estimulan la búsqueda de métodos nuevos y diferentes de confirmación. Evaluaciones frecuentes asimismo deben abarcar cada paso, desde la colección de las muestras hasta reportar los resultados.

El primer exscrutinio crítico del analista deberá estar dirigido al proceso entero de la colección de muestras para garantizar una muestra representativa para el análisis y para evitar cualquier pérdida ó contaminación posibles durante la colección. También se debe dar importancia al tipo de recipiente y a la manera de transporte y almacenamiento.

Se deben hacer estimaciones periódicas nuevas de métodos analíticos disponibles, con miras a la aplicabilidad para el propósito y la situación. Además cada método seleccionado deberá ser evaluado por el analista por su sensibilidad, precisión y exactitud porque solo de esta manera se puede determinar si la técnica del analista es satisfactoria y si las direcciones han sido interpretadas apropiadamente. La autoevaluación en estos puntos le puede dar al analista confianza en el valor y significación de los resultados reportados.

1.4

Colección y Preservación de las Muestras

Es un viejo axioma que los resultados de cualquier prueba no pueden ser mejores que la muestra en la cual se lleva a cabo.

No es posible especificar procedimientos detallados para la colección de todas las muestras por la variedad de propósitos y procedimientos analíticos. Información más detallada aparece en conexión con los métodos específicos. Esta sección presenta consideraciones generales.

El objetivo del muestreo es coleccionar una porción de material suficientemente pequeña en volumen para ser transportada convenientemente y manejada en el laboratorio mientras todavía representa exactamente el material que se está examinando.

Esto implica que las proporciones o concentraciones relativas de todos los componentes pertinentes será la misma en las muestras como en el material que se está examinando y que la muestra será manejada de tal manera que no ocurran cambios significativos en la composición antes de que se hagan las pruebas.

Una muestra puede ser presentada al laboratorio para análisis específicos por el colector tomando la responsabilidad por su validez. Muy seguido en trabajos de agua y aguas negras, el laboratorio conduce o diseña el programa de muestras el cual es determinado en consulta con el usuario de los resultados de las pruebas. Dicha consulta es esencial para asegurar seleccionar muestras y métodos analíticos que proveen una base verdadera para contestar las preguntas que inspira el muestreo.

El programa de muestreo define la porción del todo al cual se aplican los resultados de la prueba. Se debe tomar en cuenta de la variabilidad del todo con respecto a la hora, la profundidad de la muestra y en algunos casos el caudal de la corriente de agua.

1.4.1

Precauciones Generales

Obtener una muestra que llene los requisitos del programa de muestreo manejado de tal manera que no se deteriore o contamine antes de llegar al laboratorio. Antes de llenar, enjuagar la botella de muestreo dos o tres veces con el agua que se coleccionará, a menos que la botella contenga un preservativo o un agente decolorante. Dependiendo de los análisis que se realizarán, llenar el recipiente completamente, (para la mayoría de los análisis orgánicos) o dejar espacios para la aireación, mezclados, etc. (para los análisis microbiológicos). Para las muestras que tienen que ser transportadas preferiblemente dejar un espacio de aire de aproximadamente uno por ciento de la capacidad del recipiente para permitir la expansión termal.

Muestras representativas de algunas fuentes pueden ser obtenidas sólo haciendo compuestos de las muestras coleccionadas en un período de tiempo o en muchos puntos de muestreo diferentes. Los detalles

de colección varían tanto con las condiciones locales que ninguna recomendación específica sería universalmente aplicable. A veces es más informativo analizar numerosas muestras separadas en vez de un compuesto.

Examinar cuidadosamente para asegurar que los resultados analíticos representan la composición real de la muestra. Factores importantes que afectan los resultados son: la presencia de materia suspendida o turbidez, el método escogido para su eliminación, y los cambios físicos y químicos que ocurren con la aireación o el almacenaje. Se requiere poner cuidado particular cuando se esté procesando (moliendo, combinando ó pasando a través de un colador) las muestras para ser analizadas para ver si hay constituyentes trazos, especialmente metales. Algunas determinaciones particularmente de plomo, pueden ser invalidadas por contaminación a partir de dicho procesamiento. Tratar a cada muestra individualmente con respecto a las sustancias que se determinarán, la cantidad y naturaleza de la turbidez que hay presente, y otras condiciones que pueden influenciar los resultados. Es imposible dar instrucciones que cubran todas las condiciones, y la selección de la técnica se debe dejar a juicio del analista. En general, preparar cualquier cantidad significativa de materia suspendida por decantación, centrifugación, o un procedimiento de filtración apropiado. A veces una turbidez escasa puede ser tolerada si la experiencia demuestra que no causará interferencia en pruebas gravimétricas y volumétricas y que puede ser corregida en las pruebas colorimétricas, donde tiene potencialmente el efecto de interferencia mayor. Cuando sea relevante, explicar si la muestra ha sido filtrada o no. Hacer un registro de cada muestra colectada e identificar cada botella, preferiblemente, pegando una placa o etiqueta apropiadamente inscrita. Registrar suficiente información para proveer una identificación positiva de la muestra en una fecha próxima, como también el nombre del colector de la muestra, la fecha, hora y localización exacta, la temperatura del agua, y cualquier otro dato que se pueda necesitar para la correlación, tales como las condiciones del tiempo, nivel del agua, caudal de la corriente, etc. Proveer espacio en la etiqueta para los que asumen la custodia de la muestra y para la hora y fecha de transferencia. Arreglar los puntos de muestreo por medio de descripción detallada, por mapas o con la ayuda de estacas, boyas o mojones en una manera que permitirá su identificación por otras personas, sin tener que depender de la memoria o de la guía personal.

Enfriar las muestras calientes que fueran colectadas bajo presión mientras todavía están bajo presión. Antes de colectar muestras de los sistemas de distribución, lavar con la misma agua a presión suficientemente para asegurar que la muestra es representativa del suministro tomando en cuenta el diámetro y largo del tubo que será lavado con el agua a presión y la velocidad del flujo.

Colectar las muestras de los pozos solo después que el pozo ha sido bombeado suficientemente para asegurar que la muestra representa la fuente de agua subterránea. A veces será necesario bombear a un ritmo especificado para lograr una disminución del nivel de

agua característico, si esto determina las zonas de donde se abastece el pozo. Registrar el ritmo de bombeo y disminución del nivel del agua.

Cuando las muestras son colectadas de un río o corriente, los valores analíticos pueden variar con la profundidad, caudal de la corriente y la distancia de la orilla y de una orilla a la otra. Si hay equipo disponible, tomar una muestra "integrada" de la superficie al fondo en el medio de la corriente de una manera tal que la muestra está compuesta de acuerdo al flujo.

Si sólo se puede coleccionar una muestra individual (de una sola toma), es necesario tomarla en medio de la corriente y a media profundidad.

Los lagos y presas están sujetos a variaciones considerables de causas normales tales como estratificación, lluvia, escorrentía y viento. Escoger la localización, la profundidad y la frecuencia de muestreo dependiendo de las condiciones locales y el propósito de la investigación. Evitar escoria o espuma de superficie.

Estas instrucciones generales no proveen suficiente información para coleccionar muestras en el cual se determinarán gases disueltos. Para instrucciones específicas ver las secciones que describen estas determinaciones.

Usar solo muestras representativas (o éstas que conformen un programa de muestreo) para los exámenes. La gran variedad de condiciones bajo las cuales se hacen la colección vuelve imposible prescribir un procedimiento fijo. En general, tomar en cuenta tanto las pruebas como los análisis que se harán y el propósito para el cual se necesitan los resultados.

1.4.2 Tipos de Muestras

- 1.4.2.1 Muestras de una sola toma: Estrictamente hablando, una muestra colectada a una hora y lugar particulares, solo puede representar la composición de la fuente a esa hora y en ese lugar. Sin embargo, cuando se sabe que una fuente es bastante constante en su composición en un período de tiempo considerable o en distancias substanciales en todas las direcciones, entonces puede decirse que la muestra representa un tiempo más grande o un volumen más grande o ambos, que el punto específico en el cual fue colectado. En tales circunstancias, algunas fuentes pueden ser representadas bastante bien con la toma de una sola muestra. Ejemplos son algunos abastecimientos de agua, algunas aguas de superficie, y raramente, algunas corrientes de aguas negras.

Cuando se sabe que una fuente varía con el tiempo, muestras de una sola toma colectados a intervalos adecuados y analizados separadamente, pueden documentar la extensión, frecuencia y duración de estas variaciones. Escoger los intervalos de muestreo en base a la frecuencia con la cual los cambios puedan ser esperados, los cuales pueden variar de tan poco como cinco minutos, o tanto como una hora.

Cuando la composición de la fuente varía en espacio en vez de tiempo coleccionar muestras de localizaciones adecuadas.

Tener mucho cuidado al tomar muestras de aguas negras, bancos de sedimento fangoso y lodos. No se puede dar un procedimiento definitivo pero tomar todas las precauciones posibles para obtener una muestra representativa, o una que conforme un programa de muestreo.

- 1.4.2.2 Muestras compuestas: En la mayoría de los casos el término "muestras compuestas" se refiere a una mezcla de muestras coleccionadas en el mismo lugar o puntos de muestreo a diferentes horas. A veces el término "compuesto de tiempo" se usa para distinguir este tipo de muestra de otra. Las muestras de compuesto de tiempo son muy útiles para observar concentraciones promedias que serán usadas, por ejemplo, para calcular la carga o la eficiencia de una planta de tratamiento de aguas negras. Como una alternativa para el análisis separado de un gran número de análisis, seguidos de la computación de los resultados promedios y totales, las muestras compuestas representan un ahorro substancial en el esfuerzo y costo de laboratorio. Para estos propósitos, una muestra compuesta que representa un período de 24 horas, es considerada estándar para la mayoría de las determinaciones. Bajo ciertas circunstancias, sin embargo, una muestra compuesta que represente una tanda, o un período de tiempo más corto, o un ciclo compuesto de una operación periódica, puede ser preferible. Para evaluar los efectos de descarga y operaciones especiales, variables ó irregulares, coleccionar muestras compuestas que representen el período durante el cual ocurren tales descargas.

Para determinar componentes o características sujetas a cambios significativos e inevitables durante el almacenamiento, no usar muestras compuestas. Hacer dichas determinaciones en muestras individuales en cuanto sea posible después de la colección y preferiblemente en el punto de muestreo. Los análisis para los gases disueltos, cloro residual, azufre soluble, temperatura y pH, son ejemplos de este tipo de determinaciones. Cambios en componentes tales como oxígeno disuelto o dióxido de carbono, pH o temperatura, pueden producir cambios secundarios en ciertos constituyentes inorgánicos, como hierro, manganeso, alcalinidad o dureza. Usar muestras de compuesto de tiempo solamente para determinar componentes de los que se puede demostrar que permanecen incambiables bajo las condiciones de colección y preservación de la muestra.

Tomar porciones individuales en una botella de tipo amplio que tenga un diámetro de por lo menos 35 mm en la boca y una capacidad de por lo menos 120 mL. Coleccionar estas porciones cada hora, en algunos casos cada media hora y hasta cada cinco minutos y mezclar al final del período de muestreo o combinar en una sola botella al ir la coleccionando. Si se usan preservativos, agregarlos inicialmente a la botella de muestreo para que todas las porciones del compuesto sean preservadas al solo coleccionarlas. A veces puede ser necesario el análisis de muestras individuales.

Es deseable, y a veces esencial, combinar muestras individuales en volúmenes proporcionales al flujo. Un volumen de muestra final de 2 a 3 litros es suficiente para aguas negras, efluentes y desperdicios.

Aparatos de muestreo automático son disponibles; sin embargo, no usar los a menos que la muestra sea preservada de la manera descrita abajo. Limpiar los aparatos de muestreo, incluyendo las botellas, diariamente para eliminar crecimiento biológicos y otros depósitos.

- 1.4.2.3 Muestras integradas: Para ciertos propósitos la información que se necesita se provee mejor analizando mezclas de muestras de una sola toma colectadas de diferentes puntos simultáneamente o lo más cercano posible. Un ejemplo de la necesidad de estos muestreos, ocurre en un río o corriente que varía en su composición a lo largo de su ancho y profundidad. Para evaluar la composición promedio o la carga total, usar una mezcla de muestras que representen varios puntos en la sección transversal, proporcional a sus caudales relativos. La necesidad de muestras integradas también puede existir si se propone tratamiento combinado para varias corrientes separadas de aguas negras, la interacción de las cuales puede tener un efecto significativo en el tratamiento o aún en la composición. La predicción matemática de las interacciones puede ser inexacta o imposible y analizar una muestra integrada adecuada puede proveer información más útil.

Lagos naturales y artificiales a veces demuestran variaciones de composición con profundidad y localización horizontal. Sin embargo, bajo la mayoría de condiciones, ni los valores totales ni promedios son especialmente significativos y las variaciones locales son importantes. En estos casos, examinar las muestras por separado en vez de integrar las.

La preparación de las muestras integradas usualmente requiere equipo especial para colectar una muestra de una profundidad conocida sin contaminarla con el agua superior. Normalmente se requiere el conocimiento del volumen, movimiento y composición de las varias partes del agua que está siendo examinada. Por eso, colectar muestras integradas es un proceso complicado y especializado que no puede ser escrito en detalle.

1.4.3 Métodos de Muestreo

- 1.4.3.1 Muestreo manual: El muestreo manual no involucra equipo pero puede ser indebidamente costoso y consumidor de tiempo para los programas de muestreo de rutina y de gran escala.
- 1.4.3.2 Muestreo automático: Muestreadores automáticos se están usando con mayor frecuencia. Son efectivos y confiables y pueden incrementar significativamente la frecuencia del muestreo. Varios aparatos son disponibles, pero ningún muestreador es universalmente ideal. Consultar las especificaciones del fabricante para seleccionar el muestreador que sea más adecuado a la necesidad.

1.4.4 Cantidad

Colectar una muestra de dos litros para la mayoría de los análisis físicos y químicos. Para ciertas determinaciones se puede necesitar muestras más grandes. El Cuadro 1.3 muestra los volúmenes que normalmente se requieren para el análisis.

Cuadro 1.3. Resumen de los Requisitos Especiales de Muestreo y Manejo

Determinación	Recipiente	Tamaño Mínimo de Muestra, mL	Preservación	Almacenamiento Máximo Recomendado
Alcalinidad	P,V	200	Refrigerar	24 horas
DBO	P,V	1000	Refrigerar	6 horas
Color	P,V	200	Refrigerar	6 horas
Conductividad	P,V	500	Refrigerar	28 días
Dureza	P,V	100	Agregar HNO ₃ al pH <2	6 meses
Fosfatos	V(A)	100	Para fosfato disuelto, filtrar de inmediato; refrigerar; congelar a -10C	48 horas
Metales en general	P(A), V(A)	--	Para metales disueltos, filtrar inmediatamente, agregar HNO ₃ al pH <2	6 meses
Nitrógeno (Amónico)	P,V	500	Analizar en cuanto sea posible o agregar H ₂ SO ₄ al pH <2, refrigerar	7 días
Nitrógeno (Nitrato)	P,V	100	Agregar H ₂ SO ₄ al pH <2, refrigerar	48 horas
Nitrógeno (Nitrato + Nitrito)	P,V	200	Analizar en cuanto sea posible o refrigerar; o congelar a -20C	---
Oxígeno disuelto:	V, Recipiente de DBO	300		
Electrodo			Analizar de inmediato	0.5 horas
Winkler				

*Ret. equiv.

No usar la misma muestra para exámenes químicos, bacteriológicos y microscópicos, porque los métodos de colección y manejo son diferentes.

1.4.5 Preservación

La preservación completa e inequívoca de las muestras, ya sean aguas negras domésticas, desperdicios industriales o aguas naturales, es prácticamente imposible. Sin importar la naturaleza de la muestra, la estabilidad completa para cada constituyente nunca se logrará. Lo mejor que pueden hacer las técnicas de preservación es sólo retrasar los cambios químicos y biológicos que inevitablemente continúan después de la colección de la muestra. Los cambios que se llevan a cabo en una muestra pueden ser químicos o biológicos.

Algunas determinaciones serán más afectadas que otras al almacenarlas antes del análisis. Ciertos cationes están sujetos a pérdidas por adsorción en, o intercambio de los iones, con, las paredes del recipiente de vidrio. Estos incluyen al aluminio, cadmio, cromo, cobre, hierro, plomo, manganeso, plata y zinc, los cuales es mejor colectarlos con una botella separada limpia y acidificarlos con ácido nítrico a un pH por debajo de 2.0 para minimizar la precipitación y absorción en las paredes del recipiente.

La temperatura cambia rápidamente; el pH puede cambiar significativamente en cuestión de minutos; los gases disueltos se pueden perder (oxígeno, dióxido de carbono). Determinar la temperatura, el pH y los gases disueltos en el campo. Con cambios en el balance de pH-alcalinidad-bióxido de carbono, el carbonato de calcio puede precipitarse y causar una disminución en los valores para el calcio y para la dureza total. El hierro y el manganeso son fácilmente solubles en sus estados de oxidación más bajos pero relativamente insolubles en sus estados de oxidación más altos; por esto, estos cationes se pueden precipitar o se pueden disolver de un sedimento, dependiendo del potencial "redox" de la muestra. La actividad microbiológica puede ser responsable de los cambios en el contenido de nitrato-nitrito amoníaco, del decremento en la concentración de fenol y de DBO, o de reducir sulfato a sulfuro. Cloro residual es reducido a cloruro. El sulfuro, sulfito, hierro ferroso, yoduro, cianuro, pueden ser perdidos a través de la oxidación. El color, el olor y la turbidez pueden incrementarse, decrementarse, o cambiar en su calidad. El sodio, silicatos y el boro, pueden escapar del recipiente de vidrio. Cromohexavalente puede ser reducido al ion crómico.

Los cambios biológicos que se llevan a cabo en una muestra pueden cambiar el estado de oxidación. Los constituyentes solubles pueden ser convertidos a materiales orgánicos mediante enlaces en las estructuras de células, o la lisis celular puede resultar en la liberación de material celular en la solución. Los bien conocidos ciclos de nitrógeno y fósforo, son ejemplos de las influencias biológicas en la composición de la muestra.

La discusión anterior no es por ningún medio inclusiva. Claramente es imposible prescribir reglas absolutas para prevenir todos los cambios posibles. Consejo adicional se encontrará en las discusiones de las determinaciones individuales pero en un grado mayor la dependibilidad

de los análisis de agua recae en la experiencia y buen juicio del analista.

1.4.5.1 Intervalo de tiempo entre la colección y el análisis: En general, entre más corto el tiempo que pasa entre la colección de la muestra y el análisis, los resultados analíticos se volverán más confiables. Para ciertos constituyentes y valores físicos, se requiere un análisis inmediato en el campo. Es imposible decir exactamente cuanto tiempo se debe dejar pasar entre la colección y su análisis: esto depende del carácter de la muestra, los análisis que se harán, y las condiciones de almacenamiento. Los cambios ocasionados por el crecimiento de microorganismos, son grandemente retardados manteniendo a la muestra en la oscuridad y a una baja temperatura. Cuando el intervalo entre la colección de la muestra y el análisis es lo suficientemente grande para producir cambios en la concentración o en el estado físico del constituyente que se medirá, seguir las prácticas de preservación indicadas en el Cuadro 1.1. Anotar el tiempo que pasó entre el muestreo y el análisis, y cuál preservativo se usó, si es que se agregó alguno.

1.4.5.2 Métodos de preservación: La preservación de las muestras es difícil porque casi todos los preservativos interfieren con algunos de las pruebas. El análisis inmediato es ideal. El almacenamiento a temperatura baja (4°C) tal vez sea la mejor manera de preservar la mayoría de las muestras hasta el día siguiente. Usar preservativos químicos solo cuando se sabe que no interfieren con el análisis que se está haciendo. Cuando sean usados, agregarlos inicialmente a la botella de muestreo para que todas las porciones de la muestra sean preservadas al sólo ser colectadas. Ningún método individual de preservación es enteramente satisfactorio; escoger el preservativo de acuerdo a las determinaciones que se harán. Todos los métodos de preservación pueden ser inadecuados al ser aplicados a materias suspendidas. No hay que usar el formaldehído porque éste afecta a muchos análisis.

Los métodos de preservación están relativamente limitados y generalmente tienen el objetivo de retrasar la acción biológica, retrasar la hidrólisis de los compuestos y complejos químicos y disminuir la volatilidad de los constituyentes. Los métodos de preservación están limitados al control del pH, a la adición química, a la refrigeración y al congelamiento.

1.5

Mediciones Hidrometeorológicas

1.5.1 Caudal

El caudal de un río es el volumen de agua que pasa por una sección transversal del río en un tiempo determinado, normalmente expresado en metros cúbicos por segundo (m^3/s). El caudal se determina por medio de un aforo. El caudal aumenta debido a escorrentía superficial producida por precipitación. La escorrentía superficial arrastra cantidades de suelo y otros materiales que se encuentran sobre o intermezclado con el suelo, tales como fertilizantes, desechos animales y vegetales, etc., y los lleva al río. Asimismo, con el aumento de caudal de la misma escorrentía, el río tiene mayor capacidad de cargar materiales en suspensión. Por tanto el caudal del río está directamente relacionado con la concentración de varios parámetros de calidad del agua.

El aforo de caudal debe practicarse en ciertos sitios cada vez que se recolectan muestras de calidad de agua. Los sitios que deben aforarse son No.2 (Mateo) y No.4 (Hacienda) (Ver Sección 2.4 del Programa de Monitoreo), además de utilizar los datos de caudal proporcionados por la oficina de Plan Maestro de su estación hidrométrica Guacerique en Guacerique II, ubicada cerca de Nueva Aldea (No.6); de esta manera se conocerá el régimen hidrológico del día de muestreo en el río principal y en sus dos tributarios principales.

Luego se correlacionará el caudal calculado con los distintos parámetros analizados para determinar el grado en que cada uno es afectado por el caudal.

- 1.5.1.1 La medición: La medición del aforo se efectúa mediante un molinete que mide mecánicamente las velocidades del río. Para un aforo estimado, se puede medir las velocidades con un objeto flotador, pero ese procedimiento incurre un error de 25-50%.

La medición y cálculo del caudal se basa en la fórmula:

$$Q = A \times V$$

Donde: Q: Caudal, m^3/s

A: área transversal m^2

V: velocidad media, m/s

El área transversal consiste en la anchura de la sección del río multiplicado por la profundidad media.

Para iniciar el aforo, se busca un tramo del río que llene los siguientes requerimientos:

- 1) Un tramo recto
- 2) El río está convergiendo

- 3) La dirección de la corriente es paralela a la del río
- 4) No hay mucha vegetación u otros obstáculos
- 5) No hay turbulencias, remolinos ni aguas estancadas

En forma perpendicular a la dirección de la corriente, se extiende un ropo ó cuerda graduada sobre la sección, de una orilla a la otra.

Se llama la orilla izquierda a la orilla que está a la mano izquierda cuando se mira hacia aguas abajo.

El aforo consiste en hacer mediciones en una serie de verticales a través de la sección transversal. Para ríos pequeños (anchura 4-5m, caudal 0.200 m³/s), es suficiente tener entre 6 y 10 verticales, según la precisión deseada. La ubicación de cada vertical se determina con las medidas en la cuerda extendida sobre la sección transversal.

Entonces en cada vertical se anota la distancia de la "Orilla A Margen Izquierdo" (OAMI) y se mide la profundidad con las varas de vadeo del molinete. Luego se coloca el molinete a 6/10 de la profundidad (medida de la superficie del río hacia abajo), y se activan el molinete y el cronómetro para determinar las revoluciones y los segundos. El molinete consiste en una rueda de cazoletas montadas sobre un eje vertical que gira cuando se sumerge en agua en movimiento, y el eje acciona un contacto cada revolución, que se escucha con un audífono. Para consistencia, es preferible contar las revoluciones durante por lo menos 25 segundos.

Se ha determinado que la velocidad a 6/10 de la profundidad aproxima a la velocidad media de toda la vertical bajo condiciones normales. En el caso de que la profundidad sea menor de 0.15 m, es necesario colocar el molinete en la superficie (con las cazoletas apenas sumergidas).

Finalmente se anota la distancia de la "Orilla A Margen Derecho" (OAMD). Si existe una pared casi vertical en una de las orillas entonces se dice que esa orilla tiene profundidad y se mide y anota esa profundidad. Caso contrario se anota 0.0 en la casilla de profundidad para la orilla.

1.5.1.2 El cálculo: El cálculo del aforo consiste en determinar el caudal parcial de cada vertical, o sub-sección, y sumar todos los caudales parciales para obtener el caudal total.

El área transversal de la vertical se calcula asumiendo un rectángulo que se forma multiplicando la profundidad por la anchura representativa de la vertical. En el caso de la orilla sin profundidad, se asume un triángulo, y para la orilla con profundidad, se asume un trapecio.

La velocidad de la vertical se calcula con la siguiente ecuación:

$$V, \text{m/s} = \left(\frac{\text{Núm. de revoluciones}}{\text{Tiempo, s}} \right) (0.675) + 0.009$$

Si no se puede medir la velocidad en una vertical "n", debido a obstáculos o poca profundidad, pero se observa que hay velocidad, se anota V.D.G. (velocidad determinada gráficamente) y se calcula según la siguiente proporción.

$$V_n = \frac{\left(\frac{V_{n-1} \times P_n}{P_{n-1}} \right) + \left(\frac{V_{n+1} \times P_n}{P_{n+1}} \right)}{2}$$

También, si la velocidad fue medida en la superficie, es necesario aplicar un coeficiente de 0.85 para determinar la velocidad media.

Para mayor claridad se presentan todas las fórmulas para aplicar en los diferentes casos (ver Cuadro 1.4), y un ejemplo de un aforo calculado (ver Figura 1.3).

CALCULO PARA UNA VERTICAL "n"

Caso	Anchura, d_n (m)	Profundidad, P_n (m)	Area, A_n (m^2)	Caudal, Q_n (m^3/s)
Vertical en medio	$d_n = \frac{d_{n+1} + d_{n-1}}{2}$	P_n	$A_n = d_n(P_n)$	$Q_n = A_n(V_n)$
Orilla Izq. Cuando Profundidad=0	$d_n = \frac{d_{n+1} - d_n}{2}$	$P_n = \frac{P_{n+1}}{4}$	$A_n = d_n(P_n)$	$Q_n = A_n\left(\frac{V_{n+1}}{4}\right)$
Orilla Der. Cuando Profundidad=0	$d_n = \frac{d_n - d_{n-1}}{2}$	$P_n = \frac{P_{n-1}}{4}$	$A_n = d_n(P_n)$	$Q_n = A_n\left(\frac{V_{n-1}}{4}\right)$
Orilla Izq. cuando hay profundidad	$d_n = \frac{d_{n+1} - d_n}{2}$	$P_n = \frac{P_n + P_{n+1}}{2} + P_n$	$A_n = d_n(P_n)$	$Q_n = A_n\left(\frac{3}{4} V_{n+1}\right)$
Orilla Der. Cuando hay profundidad	$d_n = \frac{d_n - d_{n-1}}{2}$	$P_n = \frac{P_n + P_{n-1}}{2} + P_n$	$A_n = d_n(P_n)$	$Q_n = A_n\left(\frac{3}{4} V_{n-1}\right)$

*n-1 = La vertical anterior
n+1 = La vertical siguiente

Cuadro 1.4. Las Fórmulas para Aplicar en el Cálculo de un Aforo

REGISTRO DE AFORO CON MOLINETE

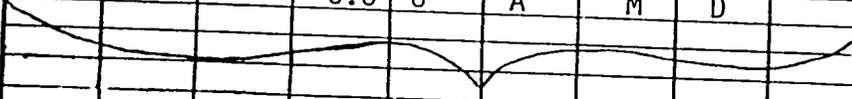
Aforo N° 19

Fecha 8 de junio

De 1985

Al principio: --- Hora 11:05

Al final: --- Hora 11:20

Distancia del punto (Ficha) m	Angulo vertical (de arrastre) en Grados	Distancia a la Sup del Agua (L) m	Prof Total (H) m	Método de Observación	Prof. de la Observ. (H) m	Nº de Revoluciones	Tiempo en Seg.	Revoluciones por Seg.	CORRECCIONES				VELOCIDAD			SECCION			Caudal Parcial m ³ /Seg	
									Δ ₁ m	Δ ₂ m	ΣΔ m	H-ΣΔ y corr. m	En el Punto m/Seg	Coefficiente	Medida del Tramo m/Seg	Anchura m	Profundidad Media m	Area m ²		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
.25			.09	0	A	M	1													
.50			.16	6/10	.09	5	28	.179							.098	.125	.108	.013	.001	
.75			.23	6/10	.14	6	25	.240							.130	.250	.160	.040	.005	
1.25			.27	6/10	.16	10	29	.345							.171	.375	.230	.086	.015	
1.75			.26	6/10	.16	8	25	.320							.242	.500	.270	.135	.033	
2.25			.18	6/10	.11	5	27	.185							.225	.500	.260	.130	.029	
2.75			.09	SUP	-	3	25	.120							.134	.500	.180	.040	.012	
2.90			0.0	0	A	M	D						.090	.85	.077	.325	.090	.029	.002	
															.019	.075	.023	.002	0.0	
																			Q =	.098 m ³ /s
DATOS ANOTADOS EN EL CAMPO																				

Aforo hecho por Calculado por Revisado por

Figura 1.3 Un Aforo Calculado

1.5.2 Precipitación

Es importante tener un registro de la precipitación dentro del área de monitoreo de calidad de agua a fin de conocer el régimen pluviométrico en general para relacionar la precipitación diaria y mensual con los valores de los distintos parámetros y para registrar cualquier evento meteorológico extraordinario.

La precipitación se mide mediante un pluviómetro ó un pluviógrafo, aparatos que recolectan la lluvia mientras cae. El pluviómetro es manejable manualmente por un observador, quien mide la cantidad total de precipitación con una probeta, normalmente cada mañana a las 6-7 a.m. El pluviógrafo, por otro lado, registra automáticamente en una gráfica la cantidad de lluvia que cae en un momento determinado.

La precipitación medida diariamente es anotada en un formulario (ver Figura 1.4) y al final de cada mes es enviado a la oficina para ser revisado y reportado en el Registro Anual (ver Figura 1.5). Para reportar los datos de un pluviómetro, es necesario ajustarlos un día hacia atrás, para compensar el hecho que el dato es anotado en el campo al día siguiente de haber caído la precipitación. Por ejemplo si en el día 6 de junio llueve en horas de la tarde y noche, el Observador mide la cantidad de esa lluvia el día 7 de junio a las 7:00 a.m., y la anota en la casilla del día 7. Por tanto, el ajuste mencionado es necesario para que el dato aparezca en la casilla del día 6 de junio en el Registro Anual como corresponde.

Para el programa de monitoreo, se han instalado 3 pluviómetros dentro ó cerca de la Cuenca Guacerique para complementar otras estaciones anteriormente ubicadas. El Cuadro 1.5 resume la red pluviométrica que se utilizarán para este programa (ver Mapa 2.1 del Programa de Monitoreo).

Cuadro 1.5 Estaciones Pluviométricas del Programa

Nombre	Coordenadas	Elevación (m.s.n.m.)	Institución	Tipo de Estación
1. Tierra Colorada	87°24.8' 14°05.0'	1790	PMRN	Pluviométrica
2. La Brea	87°23.5' 14°03.4'	1620	PMRN	Pluviométrica
3. Quiscamote	87°22.7' 14°06.9"	1470	PMRN	Pluviométrica
4. El Batallón	87°15.4 14°04.1'	1060	SANAA	Meteorológica Secundaria
5. Toncontín	87°13.0' 14°03.5'	1007	SMN	Meteorológica Principal

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DE LA CUENCA
DEL RIO GUACERIQUE

DEPTO. DE LIMNOLOGIA - PLAN MAESTRO - SANAA

REGISTRO DIARIO DE LLUVIA Y ESTADO DEL TIEMPO

ESTACION:		MES:		AÑO:
Día	Lectura (mm)	ESTADO DEL TIEMPO		N O T A S
		A la hora de la Observación	En las 24 horas anteriores	
1		○	○	
2		○	○	
3		○	○	
4		○	○	
5		○	○	
6		○	○	
7		○	○	
8		○	○	
9		○	○	
10		○	○	
11		○	○	
12		○	○	
13		○	○	
14		○	○	
15		○	○	
16		○	○	
17		○	○	
18		○	○	
19		○	○	
20		○	○	
21		○	○	
22		○	○	
23		○	○	
24		○	○	
25		○	○	
26		○	○	
27		○	○	
28		○	○	
29		○	○	
30		○	○	
31		○	○	
1		○	○	

Figura 1.4 Hoja de Campo de Precipitación

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
 DE LA CUENCA DEL RIO GUACERIQUE
 DEPTO. DE LIMNOLOGIA - PLAN MAESTRO - SANAA

ESTACION _____ DEPARTAMENTO _____

LATITUD _____ LONGITUD _____ ELEVACION _____

Día	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sepbre.	Octubre	Novbre.	Dicbre.
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
Suma												
\bar{x}												

OBSERVACIONES:

Figura 1.5 Hoja de Registro Anual de Precipitación

Color

Muchas aguas superficiales frecuentemente están coloreadas hasta el punto que no son aceptables para usos domésticos o industriales sin tratamiento para remover el color. La coloración resulta cuando el agua está en contacto con desechos orgánicos como hojas de árboles, acículas de pino, madera, etc., en varias formas de descomposición. Esto consiste de extractos vegetales variables. Taninos, ácido húmico y humatos de la descomposición de lignina, son los principiantes cuerpos de color. A veces, hierro está presente como férrico humato y produce un color muy fuerte.

Color natural existe en aguas como partículas coloidales de carga negativa. Por lo tanto, se puede remover con facilidad este tipo de color por coagulación con la ayuda de una sal que tiene iones metálicos trivalentes (como alumínico o hierro).

Las aguas superficiales, también pueden aparecer muy coloreadas, debido a sólidos suspendidos coloreados, pero en realidad no son coloreadas. En cuencas con suelos coloreados (como arcilla roja), la tierra puede lavarse durante lluvias fuertes. Este tipo de color en el agua se llama color aparente y se distingue del color debido a extractos vegetales u orgánicos porque es coloidal por lo que se llama color verdadero. Es muy importante distinguir estas dos clases de colores en el análisis de agua. La intensidad de color, generalmente, sube con un aumento de pH. Por lo tanto, se debe tomar el valor de pH cuando se analiza el color.

Las aguas superficiales pueden estar coloreadas debido a la contaminación con aguas negras muy coloreadas, (por ejemplo: desechos de la industria de tintura de textiles o plantas de pulpa). Desechos de tintura puede dar una gran variedad de colores que se pueden identificar rápido.

Los desechos de pulpa contienen lignina y muchos licores de desechos disueltos. Las ligninas son muy coloreadas y son difíciles de remover del agua natural.

2.1.1 Método de Análisis de Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa de monitoreo llegue y se pruebe en el campo.

Una corriente eléctrica puede fluir a través de una solución de un electrólito así como fluye a través de conductores metálicos. Se han observado los siguientes fenómenos en el flujo de corriente a través de una solución:

- 1) Cambios químicos ocurren en la solución
- 2) La corriente es llevada por iones
- 3) Se reduce la resistencia con un aumento de temperatura
- 4) La resistencia es normalmente, más alta en soluciones que en metales.

La conductividad eléctrica mide la capacidad de una solución de transportar una corriente eléctrica, y varía con el número y tipo de iones que contiene la solución. Los iones presentes en la muestra de agua contribuyen para aumentar la conductividad. De esta manera la conductividad resulta ser una medida indirecta de las sales en solución, según la siguiente relación:

Conductividad (mho/m) = k (sólidos totales disueltos) mg/L;

k es diferente para cada clase de agua pero en general k = 0.63 a 0.64.

Se puede medir la conductividad en una célula de conductividad conectada a un circuito de Wheatstone (ver Figura 2.1).

Este arreglo permite la medida de la resistencia eléctrica, suplida por la célula. La medida consiste en modificar la resistencia variable hasta que no hay corriente fluyendo a través del circuito desbalanceado que contiene un contador (A). Cuando este estado de balance se alcance, el potencial en punto (D) debe ser igual a la del punto (E) y la resistencia dada por la solución es determinada por la siguiente relación:

$$X = R_3 \frac{R_1}{R_2}$$

Generalmente todas las conductancias (equivalentes) iónicas son del mismo orden de magnitud, con la excepción de los iones hidrógeno e hidróxilo. Estos dos iones son más móviles que los otros en las soluciones electrolíticas y por tanto pueden transportar una parte más grande de la corriente.

Se tiene que tomar en cuenta este hecho cuando se estima la concentración de sólidos, a partir de medidas de conductividad de soluciones con altos o bajos pH.

Es importante hacer mención que solo los iones transportan una co

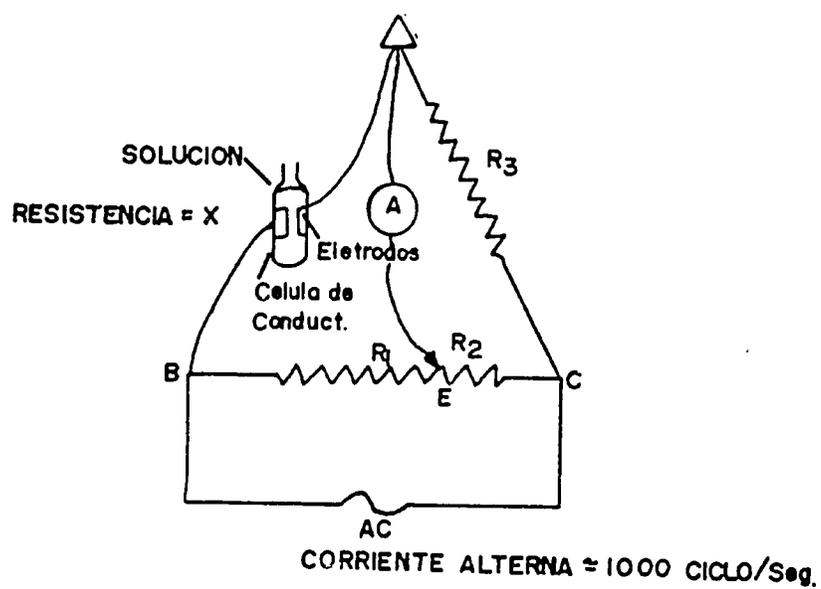


Figura 2.1. Aparato para Medir Conductividad

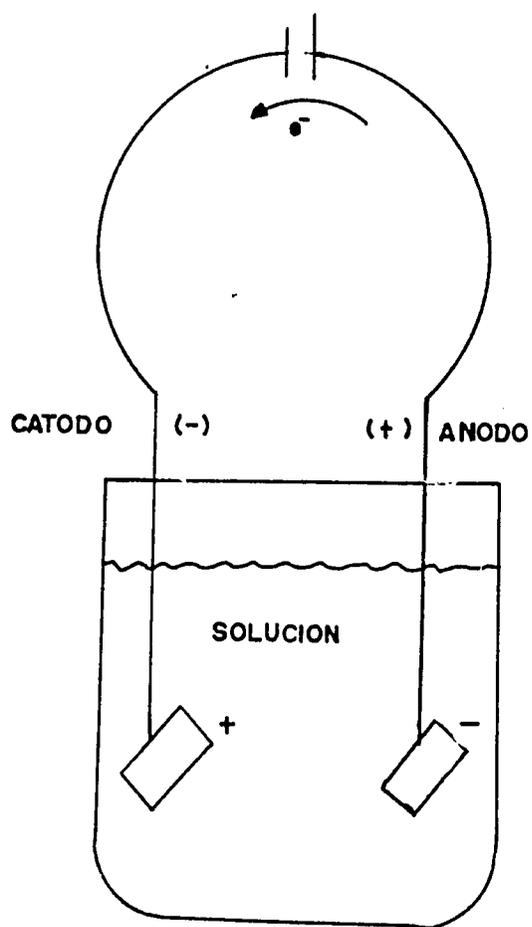


Figura 2.2. Célula Electroquímica

corriente. Por lo tanto, especies no-ionizados de ácidos y bases débiles no transportarán una corriente, aunque ellos representan una porción de sólidos disueltos de la muestra. También, materiales orgánicos solubles, como alcohol etílico y glucosa no transportan una corriente y no son detectados por análisis de conductancia.

Cuando los electrodos están metidos en una solución de agua de manera que permite el paso del flujo de corriente directa a través de la solución sucede un cambio químico. El carácter de este cambio depende de la composición de la solución, el tipo de electrodo usado y la magnitud de la fuerza electromotiva impuesta. El movimiento de la corriente fluye así: electrones fluyen a través de un conductor externo metálico, en la dirección indicada en la Figura 2.2.

Esto ocurre debido a la potencia de la bacteria. Este flujo mantiene una carga negativa al cátodo y una carga positiva al ánodo. El flujo está mantenido por el movimiento de los cationes al cátodo de carga negativa y los aniones al ánodo de carga positiva.

Cuando un ión de carga positiva alcanza el cátodo, ese agrega un electron y está reducido. También, cuando un ion de carga negativa alcanza el ánodo, ese pierde un electron y está oxidado.

Los electrones descargados por los iones de carga negativa son "Bombeados" a través del circuito externo y son recuperados por los iones de carga positiva al cátodo; la batería sirve como la fuerza que mantiene el flujo y la reacción. Entonces, la reducción ocurre en el cátodo y la oxidación ocurre en el ánodo. El flujo de electrones en el circuito externo es necesario para llevar a cabo un cambio químico.

Como ya se mencionó, el carácter de la reacción depende en parte del tipo de electrodos usados: Un electrodo solo metido en una solución constituye una "media-célula", y la combinación de dos "media-células" es una célula electroquímica, como se puede ver en la Figura 2.2.

Hay varios tipos de electrodos, como electrodos de gas, electrodos metálicos, electrodos de oxidación-reducción, electrodos metálicos para sales, etc. El tipo que se utilizará en este programa de monitoreo es el electrodo de oxidación - reducción.

El electrodo de oxidación - reducción consiste en un electrodo no reactivo sumergido en una solución de iones de las dos formas.

Para obtener una medida verdadera se debe tomar algunas precauciones. Si se usa corriente directa, la resistencia aparente cambia con el tiempo, debido a un efecto de polarización en los electrodos. Eso se puede evitar si se cambia rápidamente la dirección del flujo de la corriente, utilizando una corriente alterna de varios de miles de ciclos por segundo.

Se puede ver que la célula de conductividad llena de solución elec-

trónica sigue la ley de "ohm":

$$E = IR$$

donde, E = fuerza electromotiva (voltios);

I = Corriente (amperios);

R = Resistencia del contenido de células (ohmio)

La resistencia depende de las dimensiones del conductor:

$$R = \rho \frac{l}{A}$$

donde l = longitud (cm)

A = área transversal del conductor (cm²)

ρ = la resistencia específica del conductor (ohmio-cm)

Normalmente se mide la conductividad específica en vez de la resistencia específica. Estas dos cantidades tiene una relación recíproca:

$$K = \frac{1}{\rho}$$

donde K = conductividad específica con unidades de 1/ohmio-cm, lo que normalmente se refiere como mho/cm.

La conductividad específica se puede entender como la conductancia que genera 1 cc de una solución electrolítica.

En práctica, una célula de conductividad está calibrada para la determinación de la resistencia, R_s , de una solución estándar, y de esto, se determina la constante de la célula, C:

$$C = K_s R_s$$

Normalmente se usa 0.01 N KCl para la solución estándar para calibrar la célula de conductividad. La solución estándar tiene una conductividad específica (K_s) de 0.0014118 mho/cm a 25°C ó 1411.8 micromhos/cm. Se puede determinar la conductancia específica de una muestra desconocida al medir su resistencia, R, en la célula usando la siguiente relación:

$$\text{Conductancia Específica} = \frac{C}{R}$$

La conductividad específica depende de la temperatura, y es necesario tomar precauciones para medir la resistencia de la solución estándar y la de la muestra desconocida a la misma temperatura.

La conductividad específica se usa frecuentemente en el análisis de agua para obtener una estimación rápida de la concentración de sólidos disueltos en la muestra. Si se usa una célula de flujo y el agua del río (o aguas negras) ésta, bombeada a través de la célula, se puede obtener un registro continuo de la conductividad específica.

El contenido de sólidos disueltos se puede estimar por multiplicación de la conductividad específica por un factor empírico que varía desde 0.55 hasta 0.9. El factor apropiado depende de la composición iónica de la solución y se indica por el parámetro de conductividad equivalente, Λ , definido como:

$$\Lambda = \frac{1,000}{N} K$$

donde: N = es la normalidad de la solución de sal.

Bajo circunstancias ideales de una solución iónica, K debe variar directamente con N, y por lo tanto Λ debe quedarse constante con una variación normal de soluciones. Sin embargo, debido a que hay desviaciones de condiciones ideales, Λ se disminuye un poco con el aumento de concentración de sal.

La corriente está cargada por aniones y cationes de una sal, pero a un grado diferente. La conductancia equivalente de una sal es la suma de las conductancias iónicas equivalentes del cation λ_o^+ y del anion λ_o^- :

$$\lambda_o = \lambda_o^+ + \lambda_o^-$$

El zero (0) significa la conductancia equivalente a una dilución infinita, situación en la cual se encuentran las condiciones más ideales que sean posibles.

En el Cuadro 2.1, se presentan valores para varias conductancias iónicas equivalentes.

Cuadro 2.1 Conductancias Iónicas de Dilución Infinita a 25°C en mho - cm²/equivalente

Cation	λ_o^+	Anion	λ_o^-
H+	349.8	OH ⁻	198.0
Na+	50.1	HCO ₃ ⁻	44.5
K+	73.5	Cl ⁻	76.3
NH ₄ ⁺	73.4	NO ₃ ⁻	71.4
1/2 Ca ²⁺	59.5	CH ₃ COO ⁻	40.9
1/2 Mg ²⁺	53.1	1/2 SO ₄ ²⁻	79.9

2.2.1 Método de Análisis y Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa de monitoreo llegue y se pruebe en el campo.

2.3

Ionización

Muchas sales, bases y ácidos no permanecen como moléculas diferencia das cuando son disueltas en aguas. Las moléculas se disipan en iones con carga positiva (cationes) e iones con carga negativa (aniones). El grado de ionización varía grandemente y se mide en términos de una constante de ionización, K. Esta constante es la relación del producto de las concentraciones de ion (en moles/L) dividido por la concentración de la molécula (también en moles por litro).

El Cuadro 2.2 da una lista de los iones más comunes presentes en agua natural.

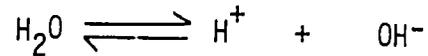
Cuadro 2.2 Iones Comunes Presentes en Aguas Naturales

CATIONES	NOMBRE	ANIONES	NOMBRE
Na^{2+}	Sodio	Cl^{-}	Cloruro
Ca^{2+}	Calcio	SO_4^{2-}	Sulfato
Mg^{2+}	Magnesio	HCO_3^{-}	Bicarbonato
K^{+}	Potasio	CO_3^{2-}	Carbonato
NH_4^{+}	Amoníaco	OH^{-}	Hidróxido
Fe^{2+}	Ferroso	SiO_2^{-}	Silicato
Fe^{3+}	Férrico	NO_3^{-}	Nitrato
H^{+}	Hidrôgeno	NO_2^{-}	Nitrito
		PO_4^{2-}	Fosfato
		F^{-}	Fluoruro
		BO_3^{2-}	Borato
		MnO_4^{-}	Permanganato
		S^{2-}	Sulfuro

2.4

pH

El agua pura se disocia ligeramente en la forma:



La concentración del ion hidrógeno, obtenida de la disociación de agua pura, es 10^{-7} moles/L. Esto debe ser también la concentración de iones de oxidrilo. La ecuación de acción de masas para el agua es:

$$\frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = K$$

Dado que la concentración del agua es grande comparada con la concentración de iones y también que varía ligeramente sólo por la disociación, ésta puede ser considerada constante. Entonces se tiene:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = (10^{-7})(10^{-7}) = 10^{-14},$$

donde $K_w = 10^{-14}$ es la constante de ionización para el agua.

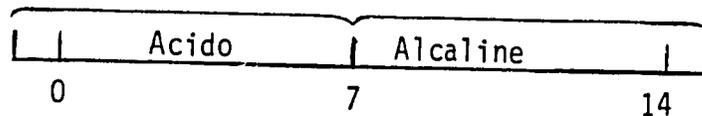
Cuando se agrega al agua un ácido, éste se ioniza en un ión de hidrógeno y un anión. El aumento en la concentración de iones de oxidrilo ocasiona una disminución en la concentración de iones oxidrilo.

Para una base, lo recíproco es verdad. La base ioniza para alcanzar un catión y un ión oxidrilo. El aumento en concentración del ión oxidrilo ocasiona una disminución en concentración de ión hidrógeno.

La expresión de concentración del ión de hidrógeno en términos de concentración molar es bastante engorrosa, y entonces se introdujo el concepto de pH. Este término es representado por:

$$\text{pH} = \text{Log} \frac{1}{[\text{H}^+]} = -\log [\text{H}^+]$$

La escala pH es generalmente representada como fluctuando de 0 a 14 con pH = 7 representando neutralidad.



Valores bajos de pH son indicativos de aguas ácidas y altos valores de pH son indicativos de aguas alcalinas. La mayoría de las aguas naturales tienen el pH en un rango relativamente neutral que va de 6 a 8.5. El pH es una medida importante de calidad de agua, en vista que éste afecta la naturaleza química del agua y la vida biológica que ésta pueda mantener.

2.4.1 Método de Análisis y Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa de monitoreo llegue y se pruebe en el campo.

2.5

Sólidos

Los términos "sólidos", "suspendidos" y "disueltos" de la marca aquí usadas, reemplazan a los términos "residuo", "no filtrable" y "filtrable". Los sólidos se refieren a materia suspendida ó disuelta en agua ó aguas negras. Los sólidos pueden afectar la calidad del agua ó el efluente adversamente de muchas maneras. Las aguas altas en sólidos disueltos generalmente son de palatabilidad (sabor) inferior y pueden inducir una reacción fisiológica no favorable en el consumidor transitorio. Por estas razones un límite de 500 mg de sólidos disueltos/L es deseable para el agua potable. Aguas altamente mineralizadas tampoco son adecuadas para muchas aplicaciones industriales. Las aguas altas en sólidos suspendidos pueden ser insatisfactorias enfáticamente para propósitos tales como bañarse. Los análisis de sólidos son importantes en el control de los procesos de tratamiento biológico y físico de aguas negras y para fijar la complacencia con las limitaciones regulatorias de efluentes de aguas negras de la agencia.

2.5.1

Definiciones

"Sólidos totales" es el término que se aplica al residuo material que queda en la vasija después de la evaporación de la muestra y su secado subsecuente en un horno de temperatura definida. Sólidos totales incluye "sólidos totales suspendidos", la porción de sólidos totales retenidas por un filtro y "sólidos totales disueltos", la porción que pasa a través del filtro.

El tipo de soporte del filtro, el tamaño del poro, porosidad, profundidad y grosor del filtro y la naturaleza física, tamaño de las partículas y cantidad de material depositado en el filtro son los factores principales que afectan la separación de los sólidos suspendidos de los disueltos.

"Sólidos fijos" es el término que se aplica al residuo de sólidos totales ó suspendidos después de la incineración por un período específico a una temperatura específica. La pérdida de peso en la incineración se llama "sólidos volátiles". Las determinaciones de sólidos volátiles no distinguen con precisión entre materia orgánica e inorgánica porque la pérdida durante la incineración no está confinada a la materia orgánica sino que incluye pérdidas debidas a la descomposición ó volatilización de algunas sales minerales.

"Sólidos sedimentables" es el término aplicado al material que se asienta de la suspensión dentro de un período definido. Puede incluir material flotante, dependiendo de la técnica.

2.5.2

Fuentes de Error y Variabilidad

La temperatura a la cual se seca el residuo tiene una relación importante en los resultados, porque pérdidas de peso debidas a la volatilización de materia orgánica, agua ocluida (obscurecida) mecánicamente, agua de cristalización y gases de descomposición química induci-

da por calor, al igual que las ganancias de peso debidas a la oxidación, dependen de la temperatura y tiempo de calentado.

Los residuos secados de 103 a 105°C pueden retener no solo agua de cristalización pero también alguna agua ocluida mecánicamente. Pérdida de CO₂ resultará en la conversión de bicarbonato a carbonato. Pérdida de materia orgánica por volatilización normalmente será poca. Porque la eliminación de aguas ocluidas es marginal a esta temperatura, el logro de un peso constante puede ser muy lento.

Los residuos secados a 180 + 2°C perderán casi toda el agua ocluida mecánicamente. Alguna agua de cristalización puede permanecer, especialmente si hay sulfatos presentes. La materia orgánica se puede perder por volatilización, pero no es completamente destruida. La pérdida de CO₂ resulta de la conversión de bicarbonatos a carbonatos y los carbonatos pueden ser descompuestos parcialmente a óxidos o sales básicas. Algunas sales de cloruro y nitrato se pueden perder. En general, al evaporar y secar muestras de agua a 180°C, se producen valores para sólidos disueltos más cercanos a los obtenidos a través de la suma de las especies minerales determinadas individualmente.

Los resultados de los residuos altos en aceite ó grasa pueden ser cuestionados por la dificultad de secar a un peso constante en un tiempo razonable.

Los análisis realizados para algunos propósitos especiales pueden demandar desviación de los procedimientos descritos para incluir un constituyente no usual con los sólidos medidos. Cuando se introducen dichas variaciones de técnica deberán ser anotadas y presentadas con los resultados.

2.5.3 Manejo y Preservación de la Muestra

Usar botellas de vidrio resistente ó de plástico, cuidando que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente. Empezar los análisis lo más pronto posible por lo impracticable de preservar la muestra. Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento de análisis para minimizar la descomposición microbiológica de los sólidos.

2.5.4 Sólidos Totales Secados a 103-105°C

2.5.4.1 Discusión General

2.5.4.1.1 Principio: Una muestra bien mezclada es evaporada en un plato que ha sido pesado y secado a un peso constante en un horno a 103 - 105°C. El incremento de peso sobre eje del plato vacío representa los sólidos totales. Puede ser que los resultados no representen el peso real de los sólidos disueltos y suspendidos en la muestra de aguas negras.

2.5.4.1.2 Interferencias: Agua altamente mineralizada con una concentración significativa de calcio, magnesio, cloruro y/o sulfato puede ser higroscópica y requiere secado prolongado, desecado apropiado y pesado rápido. Excluir partículas grandes flotantes ó aglomeradas sumergidas de materiales que no sean homogéneos de la muestra si se ha determina

do que su inclusión no es deseada en el resultado final.

Porque el residuo excesivo en el plato puede formar una corteza atrapadora de agua, es necesario limitar la muestra no más de 200 mg de residuo.

2.5.4.2 Aparatos

2.5.4.2.1 Platos de evaporación, de 100 mL de capacidad hechos de uno de los materiales siguientes:

- 1) Porcelana, 90 mm de diámetro.
- 2) Platino, generalmente satisfactorio para todos los propósitos.
- 3) Vidrio de alto contenido de sílice.

2.5.4.2.2 Horno de mufla, que opere a $550 \pm 50^\circ\text{C}$.

2.5.4.2.3 Baño de vapor.

2.5.4.2.4 Desecador, con un desecante que contenga un indicador de calor y de humedad.

2.5.4.2.5 Horno de secado, que opere de 103 a 105°C .

2.5.4.2.6 Balanza analítica, capaz de pesar 0.1 mg.

2.5.4.3 Procedimiento

2.5.4.3.1 Preparación del plato de evaporación: Si se medirán sólidos volátiles, mantener el plato de evaporación limpio a $550 \pm 50^\circ\text{C}$ por una hora en un horno de mufla. Si solo se miden los sólidos totales, calentar el plato limpio a $103 - 105^\circ\text{C}$ por una hora. Almacenar el plato en el desecador hasta que se necesite. Pesarlo inmediatamente antes de usarlo.

2.5.4.3.2 Análisis de la muestra: Escoger un volumen de muestra que produzca un residuo entre 2.5 a 200 mg. Transferir el volumen medido de la muestra bien mezclada al plato que ya ha sido pesado y evaporarlo hasta la sequedad en un baño de vapor ó en un horno de secado. Si es necesario, agregar porciones sucesivas de muestra al mismo plato después de la evaporación. Cuando se esté evaporando en un horno de secado, bajar la temperatura a aproximadamente 2°C abajo del punto de ebullición para evitar salpicaduras. Secar la muestra evaporada por lo menos 1 hora en un horno a $103-105^\circ\text{C}$, enfriar el plato en el desecador para balancear la temperatura y el peso. Repetir el ciclo de secar, enfriar, desecar y pesar hasta que se obtenga un peso constante, ó hasta que la pérdida de peso sea menos del 4% del peso anterior ó 0.5 mg, el que sea menor.

2.5.4.4 Cálculo

$$\text{mg sólidos totales/L} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{Volumen de la muestra, mL}}$$

donde:

A = Peso del residuo seco + el plato, mg.

B = Peso del plato, mg.

2.5.5 Sólidos Totales Disueltos Secados a 180°C

2.5.5.1 Discusión general

- 2.5.5.1.1 Principio: Una muestra bien mezclada se filtrará a través de un filtro de fibra de vidrio estándar y el filtrado es evaporado a sequedad en un plato de evaporación previamente pesado y secado a peso constante a 180°C. El incremento en el peso del plato representa los sólidos disueltos totales.

Es posible que los resultados no estén de acuerdo con el valor teórico para los sólidos calculados del análisis químico de la muestra. Se dispone de métodos aproximados para hacer una correlación de los análisis químicos con los sólidos disueltos. El filtrado de la determinación de los sólidos suspendidos totales puede ser usado para la determinación de los sólidos disueltos totales.

- 2.5.5.1.2 Inteferencias: Aguas altamente mineralizadas con un contenido considerable de calcio, magnesio, cloruro y sulfato pueden ser higroscópicos y requieren secamiento prolongado, desecamiento adecuado y pesado rápido. Las muestras altas en bicarbonato requieren secado cuidadoso y posiblemente prolongado a 180°C para asegurar la conversión completa de bicarbonato a carbonato. Porque el residuo excesivo en el plato puede formar una corteza atrapadora de agua, hay que limitar el tamaño de la muestra a no más de 200 mg de residuo.

2.5.5.2 Aparatos

Se requieren todos los aparatos listados en la Sección 2.5.4.2 (Sólidos Totales) y además:

- 2.5.5.2.1 Discos de filtro de fibra de residuo: sin sujetador orgánico.
- 2.5.5.2.2 Aparato de filtración: Uno de los siguientes, que sea adecuado al filtro de disco escogido:
- 1) Embudo de filtro de membrana.
 - 2) Crisol Gooch, 25 a 40 mL de capacidad con un adaptador de crisol Gooch.
 - 3) Aparato de filtración con depósito, con disco de cerámica de porosidad de (40 - a 60 um), como soporte del filtro.
- 2.5.5.2.3 Frasco de succión, de suficiente capacidad para el tamaño de la muestra escogida.

2.5.5.2.4 Horno de secado, que opere a $180 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.5.5.3 Procedimiento

2.5.5.3.1 Preparación del disco del filtro de fibra de vidrio: Insertar el disco con el lado corrugado hacia arriba en el aparato de filtración. Aplicar la aspiradora y lavar el disco con tres volúmenes sucesivos de 20 mL de agua destilada. Continuar la succión para remover todos los residuos de agua. Descartar el agua de lavado.

2.5.5.3.2 Preparación del plato de evaporación: Si se midieran sólidos volátiles, encender el plato de evaporación limpio a $550 \pm 50^\circ\text{C}$ por 1 hora en un horno de mufla. Si solo se midieran los sólidos disueltos totalmente, calentar el plato limpio a $180 \pm 2^\circ\text{C}$ por 1 hora en un horno. Almacenar en el desecador hasta que se necesiten. Pesarlos inmediatamente antes de ser usados.

2.5.5.3.3 Selección del filtro y tamaño de las muestras: Escoger el tamaño de la muestra para que produzca entre 2.5 y 200 mg de residuo seco. Si se requieren más de 10 minutos para completar la filtración, incrementar el tamaño del filtro, o disminuir el volumen de la muestra pero no hay que producir menos de 2.5 mg de residuo.

2.5.5.3.4 Análisis de la muestra: Filtrar el volumen medido de la muestra bien mezclada a través de un filtro de fibra de vidrio, lavar con 3 volúmenes sucesivos de 10 mL de agua destilada, permitiendo drenaje completo entre los lavados y continuar la succión por cerca de 3 minutos después de que la filtración esté completa. Transferir el filtrado a un plato de evaporación que fue previamente pesado y evaporar hasta el secado en un baño de vapor. Si el volumen del filtrado excede la capacidad del plato agregar porciones sucesivas al mismo plato después de la evaporación.

Secar por lo menos por 1 hora en un horno a $180 \pm 2^\circ\text{C}$, enfriar en el desecador para balancear la temperatura y el peso. Repetir el ciclo de secar, enfriar, desecar y pesar hasta que se obtenga un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menos del 4% del peso anterior o 0.5 mg, el que sea menor.

2.5.5.4 Cálculo

$$\text{mg sólidos totales disueltos/L} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Volumen de la muestra, mL}}$$

donde:

A = Peso del residuo + el plato, mg

B = Peso del plato, mg.

2.5.6 Sólidos Totales Suspendidos Secados a $103 - 105^\circ\text{C}$

2.5.6.1 Discusión General

2.5.6.1.1 Principio: Una muestra bien mezclada se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio estándar que fue previamente pesado y el residuo que es retenido en el filtro es secado a una temperatura constante de 103 - 105°C. El incremento en peso del filtro representa los sólidos suspendidos totales. Si el material suspendido tapa al filtro y prolonga la filtración, la diferencia entre los sólidos totales y los sólidos disueltos totales puede proveer un estimado de los sólidos suspendidos totales.

2.5.6.1.2 Interferencias:

Excluir de la muestra a las grandes partículas flotantes ó los aglomerados de materiales sumergidos que no sean homogéneos, si se determina que su inclusión no es deseada en el resultado final. Porque residuo excesivo en el filtro puede formar una costra que atrapa agua, hay que limitar el tamaño de la muestra a uno que produzca no más de 200 mg de residuo. Para las muestras altas en sólidos disueltos lavar bien el filtro para asegurar la remoción del material disuelto. Los tiempos de filtrado prolongado que resultan de la oclusión del filtro pueden producir resultados altos debido a la captura excesiva de sólidos en el filtro bloqueado.

2.5.6.2 Aparatos

Se requieren los aparatos mencionados en la Sección 2.5.4.2 (Sólidos Totales) excepto los platos de evaporación, baño de vapor y horno de secado de 180°C. Además:

2.5.6.2.1 Disco concavo de aluminio o acero inoxidable de 65 mm de diámetro.

2.5.6.3 Procedimiento

2.5.6.3.1 Preparación del disco del filtro de fibra de vidrio: Insertar el disco con el lado corrugado hacia arriba en el aparato de filtración. Aspirar y lavar el disco con tres porciones sucesivas de 20 mL de agua destilada. Continuar la succión para remover todos los residuos de agua y descartar el agua del lavado. Remover el filtro del aparato de filtración y transferirlo a un disco cóncavo de aluminio ó acero inoxidable como soporte. Alternativamente remover el crisol y la combinación de filtro si se usa un crisol Gooch. Secar en un horno a 103-105°C por 1 hora. Si se medirán sólidos volátiles, encender a 550 ± 50°C por 15 minutos en un horno de mufla. Enfriar en un desecador para balancear la temperatura y el peso.

Repetir el ciclo de encender, enfriar, desecar y pesar hasta que se obtenga un peso constante ó hasta que la pérdida de peso sea menor de 0.5 mg entre pesadas sucesivas. Almacenar en un desecador hasta que se utilice. Pesarlo inmediatamente antes del uso.

2.5.6.3.2 Selección del tamaño del filtro y de las muestras: Para muestras que no sean homogéneas, tales como aguas negras crudas, usar un filtro

grande que permita filtrar una muestra representativa.

2.5.6.3.3 Análisis de la muestra: Armar el aparato de filtrar y el filtro y empezar la succión. Mojar el filtro con un volumen pequeño de agua destilada para asentarlos. Filtrar un volumen medido de una muestra que ha sido bien mezclada a través del filtro de fibra de vidrio. Lavarlo con tres volúmenes sucesivos de 10 mL de agua destilada, permitiendo drenaje completo entre los lavados y continuar la succión por cerca de 3 minutos después de que se ha completado la filtración. Cuidadosamente remover el filtro del aparato de filtración y transferirlo a un disco concavo de aluminio ó acero inoxidable como soporte. Alternativamente, remover las combinaciones del crisol y el filtro del adaptador del crisol si se usa un crisol Gooch. Secar por 1 hora a 103-105°C en un horno, enfriar en un desecador para balancear la temperatura y el peso. Repetir el ciclo de secar, enfriar, desecar y pesar hasta que se obtenga un peso constante ó hasta que la pérdida de peso es menor del 4% del peso anterior ó 0.5 mg, el que sea menor.

2.5.6.4 Cálculo

$$\text{mg sólidos totales suspendidos/L} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Volumen de la muestra, mL}}$$

donde:

A = peso del filtro + el residuo seco, mg

B = Peso del filtro, mg.

Figura 2.3.

Hoja de Laboratorio
Para Análisis
de Sólidos

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
DE LA CUENCA GUACERIQUE
PLAN MAESTRO-DEPTO DE LIMNOLOGIA-SANAA

SOLIDOS TOTALES (SECADOS A LOS 103-105°C)

SITIOS	Volumen de la muestra, mL	Peso del plato, g	Peso del plato + residuo, g	Concentración de sol. tot., mg/L
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

SOLIDOS TOTALES DISUELTOS (SECADO A LOS 180°C)

SITIOS	Volumen de la muestra, mL	Peso del plato, g	Peso del plato + residuo, g	Concentración de sol. dis., mg/L
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

SOLIDOS TOTALES SUSPENDIDOS (SECADOS A LOS 103-105°C)

SITIOS	Volumen de la muestra, mL	Peso del filtro, g	Peso del filtro + residuo, g	Concentración de sol. susp., mg/L
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

NOMBRE DEL TECNICO _____
DE LABORATORIO : _____
FECHA DE MUESTREO : _____
FECHA DE ANALISIS : _____

Las lecturas de temperatura se usan en el cálculo de varias formas de alcalinidad, en estudios de saturación y estabilidad con respecto al carbonato de calcio, en el cálculo de salinidad y en operaciones de laboratorio generales. En estudios limnológicos las temperaturas del agua como una función de la profundidad, a veces son requeridas. Temperaturas altas que resultan de la descarga de agua calentada pueden tener un impacto ecológico significativo. La identificación de la fuente de abastecimiento de agua, tales como pozos profundos, a veces es posible con sólo tomar medidas de temperatura. Las plantas industriales a veces requieren datos de la temperatura del agua para usos de proceso ó cálculos de transmisión de calor.

Normalmente, las medidas de temperatura pueden hacerse con cualquier buen termómetro centígrado lleno de mercurio. Como mínimo, el termómetro debe tener una escala marcada para cada 0.1.°C, con las marcas grabadas en el vidrio capilar. El termómetro debe tener una capacidad termal mínima para permitir el equilibrio rápido. Periódicamente revisar el termómetro contra un termómetro de precisión. Para las operaciones de campo usar un termómetro que tenga un estuche de metal para evitar que se quiebre.

La temperatura de profundidad que se requiere para los estudios limnológicos se puede medir con un termómetro invertido, ó con un termistor. El termistor es más conveniente y exacto; sin embargo, los altos costos pueden imposibilitar su uso. Hacer las lecturas con el termómetro ó instrumento inmerso en el agua durante suficiente tiempo como para permitir equilibración completa. Reportar los resultados al 0.1 ó 1.0°C más cercano dependiendo de lo que se necesite.

El termómetro comunmente usado para las mediciones de profundidad es el termómetro invertido. Frecuentemente va montado en el aparato de colecta de muestra de manera que se puede obtener una muestra de agua simultáneamente. Es necesario hacer una corrección de las lecturas de los termómetros invertidos para los cambios ocasionados por las diferencias entre la temperatura a la inversión y la temperatura al momento de la lectura. Se calcula dicha corrección de la manera siguiente:

$$\Delta T = \left[\frac{(T^1 - t) (T^1 + V_0)}{k} \right] \times \left[1 + \frac{(T^1 - t) (T^1 + V_0)}{k} \right] + L$$

Donde:

ΔT = Corrección que se agregará algebraicamente a la lectura que no ha sido corregida.

T^1 = Lectura no corregida al momento de la inversión.

t = Temperatura a la cual se lee el termómetro.

V_0 = Volumen del bulbo pequeño del tubo hasta 0°C de graduación.

K = Constante que depende de la expansión relativa termal del mercurio y del vidrio (el valor normal de $K = 6100$).

L = Corrección de la calibración del termómetro dependiendo de T^1 .

Si se hacen observaciones en serie es conveniente preparar gráfica para un termómetro para obtener ΔT de cualquier valor de T^1 y t .

2.6.1 Método de Análisis y Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa de monitoreo llegue y se pruebe en el campo.

La claridad del agua es importante en la producción de productos destinados para el consumo humano y para muchos usos manufactureros. La producción de bebidas, el procesamiento de comida y las plantas de tratamiento que sacan el agua de la superficie del abastecimiento, comunmente dependen de coagulación, asentamiento y filtración para asegurar un producto aceptable. La claridad de un cuerpo natural de agua es un determinante mayor de la condición y productividad de ese sistema. La turbidez en el agua es causada por materia suspendida, tales como arcilla, sedimento, materia orgánica e inorgánica dividida en partículas muy finas, compuestos orgánicos solubles de color, plancton y otros organismos microscópicos. La turbidez es una expresión de la propiedad óptica que causa que la luz se disperse y absorba en vez de ser transmitida en línea recta a través de la muestra. La correlación de turbidez con la concentración en peso de la materia suspendida es difícil porque el tamaño, forma el índice refractivo de las partículas también afecta las propiedades de dispersión de la luz de la suspensión.

El método estándar para determinar la turbidez se basa en el turbidímetro de candela de Jackson; sin embargo el valor más bajo de turbidez que se puede medir directamente en este instrumento con 25 unidades. Porque la turbidez de agua tratada siempre anda entre 0 a 1 unidades. Métodos indirectos secundarios también son requeridos para su estimación. Desafortunadamente ningún instrumento hasta la fecha puede duplicar los resultados obtenidos en el turbidímetro de candela de Jackson para todas las muestras. Por diferencias fundamentales en sistemas ópticos, los resultados obtenidos con diferentes tipos de instrumentos secundarios frecuentemente no andan cerca el uno con el otro, aunque los instrumentos son precalibrados contra la candela del turbidímetro.

La mayoría de los turbidímetros disponibles, para medir valores bajos de turbidez, comparativamente da buenas indicaciones de la intensidad de la luz dispersada en una dirección en particular, predominantemente en ángulos perpendiculares a la luz incidente. Estos nefelómetros no son normalmente afectados por pequeños cambios en parámetros de diseño y por eso se especifican como el instrumento estándar para medir valores bajos de turbidez. Turbidímetros no estándares tales como instrumentos que dispersan la luz hacia adelante son más sensibles a la presencia de partículas más grandes que los nefelómetros, y son útiles para esa clase de monitoreo.

Otra causa más de discrepancias en el análisis de turbidez es el uso de suspensiones de diferentes tipos de materia particular para la preparación de curvas de calibración de instrumentos. Como las muestras de agua, las suspensiones preparadas tienen propiedades ópticas diferentes dependiendo de la distribución del tamaño de partículas, formas e índices refractivos. Una suspensión de referencia estándar que tenga propiedades reproducibles de esparcir la luz se especifica para la calibración del Nefelómetro.

Porque no hay relación directa entre la intensidad de la luz esparcida en un ángulo de 90° y la turbidez de la candela de Jackson, no hay una base válida para la práctica de calibrar un nefelómetro en términos de unidades de candela. Para distinguir entre valores de turbidez que se derivan de métodos nefelométricos y visuales, reportar los resultados de la primera como unidades de turbidez nefelométricas (NTU) y la segunda como unidades de turbidez Jackson (JTU).

2.7.1 Selección de Método

Su mayor precisión, sensibilidad y aplicabilidad sobre un rango amplio de turbidez hacen al método nefelométrico preferible a métodos visuales. El turbidímetro de candela, con un límite inferior de 25 unidades de turbidez, tiene su uso principal en el análisis de aguas altamente turbidas. Los estándares de botella ofrecen una manera práctica de examinar agua cruda y condicionada en varios niveles del proceso de tratamiento.

2.7.2 Almacenamiento de Muestras

Determinar la turbidez el mismo día que se toma la muestra.

Si es imposible realizar el análisis el mismo día, guardar las muestras en la oscuridad hasta por 24 horas. Las muestras no deben guardarse por períodos más largos de 24 horas porque pueden ocurrir cambios irreversibles en la turbidez. Antes de examinar las muestras moverlas vigorosamente.

2.7.3 Método Nefelométrico - Unidades de Turbidez Nefelométricas

2.7.3.1 Discusión General

2.7.3.1.1 Principio: Este método se basa en comparar la intensidad de luz esparcida por la muestra bajo condiciones definidas con la intensidad de luz esparcida por una suspensión de referencia estándar bajo las mismas condiciones. Entre más alta la intensidad de la luz esparcida, mayor es la turbidez. El polímetro de formazina se usa como la suspensión estándar de referencia de turbidez. Es fácil de preparar y es más reproducible en sus propiedades de dispersión de luz que la arcilla o agua natural turbia. La turbidez de una concentración específica de suspensión de formazina se define como 40 unidades nefelométricas. Esta suspensión tiene una turbidez aproximada de 40 unidades JACKSON cuando es medida en el turbidímetro de candela; por eso, unidades de turbidez nefelométricas basadas en la preparación de formazina se aproximan a las unidades derivadas del turbidímetro de candela pero no son idénticas a ellas.

2.7.3.1.2 Interferencias: La turbidez se puede determinar para cualquier muestra de agua que está libre de desechos y sedimentos gruesos que se asientan rápidamente. Vidrios sucios, burbujas de aire y los efectos de las vibraciones que disturban la visibilidad de la superficie de la muestra dan falsos resultados. Color verdadero, eso es, el color del agua debido a sustancias disueltas que absorben luz causan que

la turbidez medida sea baja. Este efecto normalmente no es significativo en el caso de agua tratada.

2.7.3.2 Aparatos

2.7.3.2.1 Turbidímetro que consiste en un Nefelómetro con una fuente de luz para iluminar la muestra y uno o más detectores fotoeléctricos con un mecanismo de lectura que indica la intensidad de la luz esparcida en 90° a la trayectoria de luz incidente. Usar un turbidímetro de tal diseño que poca luz que se ha dispersado le llegue al detector en la ausencia de turbidez y libre de desviaciones significativas después de un período corto de calentamiento. La sensibilidad del instrumento permitirá detectar diferencias de turbidez de 0.02 NTU (unidades de turbidez Nefelométricas) o menos en aguas con una turbidez de 1 NTU con un rango de 0 a 40 NTU. Se necesitan diferentes rangos para obtener un cubrimiento adecuado y una sensibilidad suficiente para valores bajos de turbidez.

Diferencias en el diseño del turbidímetro causan diferencias en los valores medidos de turbidez aunque se use la misma medida para calibrar. Para minimizar tales diferencias observar el criterio de diseño siguiente:

- 1) La fuente de luz - Lámpara de Filamento de Tungsteno operada a una temperatura de color entre 2,200 y 3,000°K.
- 2) La distancia atravesada por luz incidente y luz esparcida dentro del tubo de muestra. El total no debe exceder 10 cm.
- 3) Angulo de aceptación de luz por el detector. Centrado a 90° de la trayectoria de la luz incidente y sin exceder $\pm 30^\circ$ de 90° . El detector y sistema de filtro, si se usa, debe tener una máxima respuesta espectral entre 400 y 600 nm.

2.7.3.2.2 Tubos de muestra de vidrio claro incoloro: Mantener los tubos escrupulosamente limpios, por dentro y por fuera y hay que descartarlos cuando se han rayado. Nunca manejarlos donde la luz los alcanza. Usar tubos que tengan una longitud extrasuficiente, o con una cubierta protectora, para que puedan ser manejados apropiadamente. Llenar los tubos con muestras y estándares que han sido bien agitados y dejar suficiente tiempo para que puedan escapar las burbujas.

2.7.3.3 Reactivos

2.7.3.3.1 Agua libre de turbidez: Agua libre de turbidez es difícil de obtener. El método siguiente es satisfactorio para turbidez tan baja como 0.02 NTU.

Pasar agua destilada a través de un filtro de membrana que tenga poros con el tamaño preciso de 0.2 μm ; un filtro de membrana que normalmente se usa para exámenes bacteriológicos no es satisfactorio. Enjuagar el frasco de recolección por lo menor dos veces con agua filtrada y descartar los 200 mL siguientes. Algunas aguas desminera-

lizadas embotelladas comercialmente están casi libres de partículas. Estas se pueden usar cuando su turbidez es más baja de la que se ha podido obtener en el laboratorio. Diluir las muestras a una turbidez no menor de 1 con agua destilada.

- 2.7.3.3.2 Suspensión de turbidez existente:
- 1) Solución I. Disolver 1.0 g de sulfato de hidrozina, $(\text{NH}_2)_2\text{H}_2\text{SO}_4$, en agua destilada y diluir a 100 mL en un frasco volumétrico.
 - 2) Solución II. Disolver 10.00 g de hexametilenitetramina $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$, en agua destilada y diluir a 100 mL en un frasco volumétrico.
 - 3) En un frasco volumétrico de 100 mL mezclar 5.0 mL de la solución I y 5.0 mL de la solución II. Dejarlo por 24 h a $25 \pm 3^\circ\text{C}$, diluirlo a la marca y mezclarlo. La turbidez de la suspensión es 400 NTU.
 - 4) Preparar las soluciones y suspensiones mensualmente.
- 2.7.3.3.3 Suspensión de turbidez estándar: Diluir 10.00 mL de la suspensión de turbidez existente a 100 mL con agua libre de turbidez. Prepararla a diario. La turbidez de esta suspensión se define como 40 NTU.
- 2.7.3.3.4 Estándares alternos: Como una alternativa a preparar y diluir formazina, usar estándares comerciales disponibles tales como granos de estireno de divinilbenzeno si se ha demostrado que son equivalentes a formazina recién preparada.
- 2.7.3.3.5 Estándares de turbidez diluidos: Diluir porciones de suspensión de turbidez estándar con agua libre de turbidez como sea requerido. Prepararlo a diario.
- 2.7.3.4 Procedimiento
- 2.7.3.4.1 Calibración del turbidímetro: Seguir las instrucciones de operación del fabricante. Si falta una escala precalibrada preparar curvas de calibración para cada rango del instrumento. Revisar la precisión de cada escala de calibración proveída en un instrumento precalibrado usando estándares apropiados. Usar por lo menos un estándar en cada rango de instrumento que se usará. Asegurarse que el turbidímetro dé lecturas estables en todos los rangos de sensibilidad usados. Es posible que valores altos de turbidez determinadas por medidas directas difieran apreciablemente de éstas determinadas por la técnica de dilución.
- 2.7.3.4.2 Medida de turbidez menor de 40 NTU: Agitar la muestra bien. Esperar hasta que desaparezcan las burbujas de aire y verter la muestra en el tubo turbidímetro. Cuando sea posible verter la muestra agitada en un tubo turbidímetro y sumergirla en un baño ultrasónico de 1 a 2 s, lo que causa un escape de burbujas completo. Leer la turbidez directamente de la escala del instrumento o de una curva de calibración apropiada.

2.7.3.4.3 Medida de turbidez arriba de 40 NTU: Diluir la muestra con uno ó más volúmenes de agua libre de turbidez hasta que la turbidez sea entre 30 y 40 NTU. Determinar la turbidez de la muestra original con la turbidez de la muestra diluída y el factor de dilución.

Por ejemplo si cinco volúmenes de agua libre de turbidez se agregan a un volumen de muestra y la muestra diluída indica una turbidez de 30 NTU, entonces la turbidez de la muestra original era de 180 NTU.

2.7.3.4.4 Calibrar el monitor continuo de turbidez para valores bajos de turbidez determinando la turbidez del agua que le está entrando o saliendo usando un turbidímetro modelo de laboratorio. Cuando esto no es posible usar un estándar de turbidez diluído apropiado (Sección 2.7.3.3.5). Para valores de turbidez arriba de 40 NTU usar una solución existente diluída.

2.7.3.5 Cálculo

$$\text{Unidades de turbidez nefelométricas (NTU)} = \frac{A \times (B + C)}{C}$$

donde:

A = NTU encontrado en la muestra diluída

B = Volumen del agua de dilución, mL

C = Volumen de la muestra tomando para la dilución, mL.

2.7.3.6 Interpretación de resultados

Reportar la lectura de turbidez de la siguiente manera:

Rango de Turbidez NTU	Reportar el NTU más cercano
0-1.0	0.05
1-10	0.1
10-40	1
40-100	5
100-400	10
400-1000	50
> 1000	100

Para comparación de eficiencia de tratamiento de agua, estimar la turbidez más cerca de lo que se especifica arriba. Debido a incertidumbres y discrepancias en las medidas de turbidez, es improbable que dos o más laboratorios dupliquen resultados de la misma muestra más cerca de lo especificado.

3.1

Alcalinidad

La alcalinidad de un agua es su capacidad de neutralizar ácidos. Es la suma de todas las bases de titulación. El valor medido puede variar muy significativamente con el pH del punto final utilizado. La alcalinidad es una medida de una propiedad agregada de agua y puede ser interpretada en términos de sustancias específicas solo cuando se conoce la composición química de la muestra.

La alcalinidad es significativa en muchos usos y tratamientos de aguas naturales y aguas negras. Porque la alcalinidad de muchas aguas de su superficie es primordialmente una función de carbonato, bicarbonato y contenido de hidróxido, se toma como una indicación de la concentración de estos constituyentes. Los valores medidos también pueden incluir contribuciones de boratos, fosfatos, silicatos u otras bases si éstas están presentes. La alcalinidad con exceso de concentración de tierra metal alcalino, es significativa para determinar la conveniencia de un agua para irrigación. Medidas de alcalinidad son usadas en la interpretación y control de procesos de tratamiento de agua y aguas negras. Las aguas negras crudas residenciales tienen una alcalinidad menor que, ó solo un poco mayor que, el agua de abastecimiento. Digestores anaeróbicos que estén operando apropiadamente típicamente tienen alcalinidades espumosas en el rango de 2000 a 4000 mg de carbonato de calcio (CaCO_3/L).

3.1.1 Discusión General

- 3.1.1.1 Principio: Iones hidróxidos presentes en una muestra como resultado de disociación o hidrólisis de solutos reaccionan con adiciones de ácido estándar. Por eso la alcalinidad depende de pH del punto final usado.

Para muestras de alcalinidad baja (menos de 20 mg CaCO_3/L), usar una técnica de extrapolación basada en la proporcionalidad cercana de concentraciones de iones de hidrógeno a exceso de titulante más allá del punto de equivalencia.

- 3.1.1.2 Punto Final: Cuando la alcalinidad se debe completamente al contenido de carbonato y bicarbonato, el pH en el punto de equivalencia de la titulación se determina para la concentración de bióxido de carbono (CO_2) en esa etapa. La concentración de CO_2 depende a la vez de las especies de carbonato totales presentes originalmente y cualquier pérdida que se ocurre durante la titulación. Los valores siguientes de pH se sugieren como los puntos de equivalencia para las concentraciones de alcalinidad correspondientes como miligramos de CaCO_3 por litro. Alcalinidad Fenolftaleina es el término tradicionalmente usado para la cantidad medida por titulación a pH 8.3 independiente del indicador de color, si es que hay, usado en la determinación. Los cambios de color bien marcados del punto final producidos por metacresol morado (pH 8.3) y bromocresol verde (pH 4.5) hacen que estos indicadores sean apropiados para la titulación de alcalinidad.

Valores de pH del Punto Final

	Alcalinidad Total	Alcalinidad Fenolftleina
Alcalinidad, mg CaCO ₃ /L:		
30	4.9	8.3
150	4.6	8.3
500	4.3	8.3
Silicatos, Fosfatos sabidos o sospecha- dos	4.5	8.3
Análisis de rutina ó automáticos	4.5	8.3
Desperdicio Industrial ó sistema complejo	4.5	8.3

3.1.1.3 Interferencias: Jabones, materia grasosa, sólidos suspendidos, ó precipitados pueden ocluir el electrodo de vidrio y causar una respuesta lenta. Dejar pasar tiempo adicional entre adiciones de titulante (colorante) para que el electrodo llegue al equilibrio ó limpiar los electrodos ocasionalmente. No filtrar, diluir, concentrar ó alterar la muestra.

3.1.1.4 Selección de método: Determinar la alcalinidad de la muestra del volumen del ácido estándar requerido para titular una porción a un pH designado según se indica en la Sección 3.1.1.2. Titular a la temperatura ambiental con un medidor de pH calibrado apropiadamente ó un titulador operado electricamente, ó usar indicadores de color.

Reportar la alcalinidad menor de 20 mg de CaCO₃/L sólo si ha sido determinado por el método de alcalinidad baja descrita en la Sección 3.1.4.4. Construir una curva de titulación para la regulación de reactivos. Los indicadores de color pueden ser usados para titulaciones de rutina y de control en la ausencia de color de interferencia y turbidez y para titulaciones preliminares para seleccionar el tamaño de la muestra y la concentración del titulante.

3.1.1.5 Tamaño de la muestra: Usar un volumen de titulante suficientemente grande para obtener una buena precisión volumétrica y un volumen de muestra suficientemente pequeño para permitir que el punto final sea claro. Para muestras de alcalinidad con concentraciones arriba de 1000 mg CaCO₃/L, seleccionar un volumen que contenga una alcalinidad equivalente a menos de 250 mg CaCO₃/L, y titular con 0.02N ó 0.01N ácido sulfúrico ó ácido clorhídrico. Para muestras de alcalinidad con concentraciones menores de 1000 mg CaCO₃/L, seleccionar un volumen que

contenga una alcalinidad equivalente a menos de 50 mg CaCO₃/L, y titular con 0.02 N ó 0.01 N ácido sulfúrico ó ácido clorhídrico. Para el método de alcalinidad baja, titular 200 mL de muestra con 0.02 N H₂SO₄ con una bureta de 10 mL.

- 3.1.1.6 Muestreo y almacenamiento: Colectar muestras en botellas de polietileno ó vidrio borosilicato y almacenarlos a baja temperatura. Llenar totalmente las botellas y cerrarlas fuertemente. Porque las muestras de desperdicios pueden estar sujetas a la acción microbiana y a la pérdida o ganancia de CO₂ u otros gases cuando son expuestas al aire, analizar las muestras sin pérdida de tiempo, preferiblemente dentro de un día. Si se sospecha actividad biológica, analizar dentro de un período de 6 horas.

Evitar la agitación de la muestra y exposición prolongada al aire.

3.1.2 Aparatos

- 3.1.2.1 Titulador electrométrico: Usar cualquier medidor de pH comercial ó un titulador operado electricamente que use un electrodo de vidrio y que pueda ser leído hasta unidad 0.05 de pH. Estandarizar y calibrar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Poner atención especial a la compensación de temperatura y al cuidado del electrodo. Si no se provee compensación de temperatura automática, titular a 25 ± 5°C.
- 3.1.2.2 Vasija de titulación: El tamaño y forma dependerán de los electrodos y el tamaño de la muestra. Mantener el espacio libre arriba de la muestra lo más pequeño que sea práctico, pero dejar espacio para el titulante y la inmersión completa de las porciones indicadoras de los electrodos. Para los electrodos de tamaño convencional, usar un frasco Berzelius de forma alta de 200 mL que no tenga pico. Usar el frasco con un tapón que tenga tres hoyos, para acomodar los dos electrodos y la bureta. Con un electrodo miniatura de combinación vidrio-referencia usar un frasco erlenmeyer de 125 mL a 250 mL con un tapón de dos hoyos.
- 3.1.2.3 Agitador magnético
- 3.1.2.4 Pipetas volumétricas
- 3.1.2.5 Frascos, volumétricos, 1000-, 200-, 100- mL
- 3.1.2.6 Buretas, vidrio borosilicato, 50-, 25-, 10- mL
- 3.1.2.7 Botella de "Poliolefin", 1-L

3.1.3 Reactivos

- 3.1.3.1 Solución de carbonato de sodio, aproximadamente 0.05N: Secar 3 a 5 g de estándar primario de Na₂CO₃ a 250°C por 4 horas y enfriarlo en un desecador. Pesar 2.5 ± 0.2 g (al mg más cercano), transferirlo a un frasco volumétrico de 1 L, llenar el frasco hasta la marca con agua destilada y disolver y mezclar el reactivo; no mantenerlo por más de una semana.

- 3.1.3.2 Acido sulfúrico estándar ó ácido clorhídrico estándar (HCl), 0.1N: Preparar la solución ácida de normalidad aproximada. Estandarizar con 40.0 mL de una solución 0.05 N Na₂CO₃, con ± 60 mL de agua, en un frasco titulando potenciométricamente a un pH cerca de 5. Sacar los electrodos, enjuagar en el mismo frasco y hervir suavemente por 3 a 5 minutos bajo una cubierta de vidrio de reloj. Enfriarlo a la temperatura ambiental, enjuagar la cubierta de vidrio en el frasco y terminar de titular al punto de inflexión de pH. Calcular la normalidad:

$$\text{Normalidad, } N = \frac{A \times B}{53.00 \times C}$$

donde:

A = Na₂CO₃ pesado en un frasco de 1 L, g

B = mL de la solución Na₂CO₃ tomada para la titulación

C = mL de ácido usados

Usar la normalidad medida en los cálculos ó ajustar a 0.10 N, 1 mL 0.10N solución = 5.00 mg CaCO₃.

- 3.1.3.3 Acido sulfúrico estándar o ácido clorhídrico, 0.02 N: Diluir a 200 mL 0.01 N ácido estándar a 1000 mL con agua destilada ó desionizada. Estandarizar por medio de la titulación potenciométrica de 15.00 mL de 0.05N Na₂CO₃ de acuerdo con el procedimiento descrito en la Sección 3.1.3.2; 1 mL = 1.00 mg CaCO₃.
- 3.1.3.4 Solución de indicador de Bromocresol verde, indicador de pH 4.5: Diluir 100 mg de Bromocresol verde, sal sodio, en 100 mL de agua destilada.
- 3.1.3.5 Solución indicadora metacresol morado, indicador de pH 8.3: Disolver 100 mg de metacresol morado en 100 mL de agua.
- 3.1.3.6 Solución Fenolftaleína alcohólica, indicador pH 8.3.
- 3.1.3.7 Tiosulfato de sodio 0.1M: Disolver 25g, Na₂S₂O₃, 5H₂O y diluir a 1000 mL con agua destilada.

3.1.4 Procedimiento

- 3.1.4.1 Cambio de color: Seleccionar el tamaño de la muestra y la normalidad del titulante de acuerdo al criterio de la Sección 3.1.1.5. Ajustar la muestra a la temperatura ambiental, si es necesario, y con una pipeta descargar la muestra en un frasco erlenmeyer mientras se mantiene la punta de la pipeta cerca del fondo del frasco. Si hay cloro residual libre presente agregar 0.05 mL (1 gota) 0.1 M de solución de Na₂S₂O₃ ó destruirla con radiación ultravioleta. Agregar 0.2 mL (5 gotas) de solución indicadora y titular sobre una superficie blanca hasta un cambio de color persistente característico del punto de equivalencia. Soluciones indicadoras comerciales ó sólidos designados para el rango de pH apropiado (3.7 ó 8.3) pueden ser usados. Examinar el color al punto final agregando la misma concentración de indicador

usado con la muestra a una solución amortiguadora al pH designado.

3.1.4.2 Curva de titulación potenciométrica:

3.1.4.2.1 Enjuagar los electrodos y la vasija de titulación con agua destilada y drenar. Seleccionar el tamaño de las muestras y la normalidad del titulante de acuerdo al criterio de la Sección 3.1.1.5. Ajustar la muestra a la temperatura ambiental, la muestra mientras se mantiene la punta de la pipeta cerca del fondo de la vasija de titulaciones.

3.1.4.2.2 Medir el pH de la muestra. Agregar ácido estándar en incrementos de 0.5 mL ó menos, de tal forma que un cambio de menos de 0.2 unidades de pH ocurra con cada incremento. Después de cada adición mezclarlo bien pero suavemente con un agitador magnético. Evitar salpicaduras. Apuntar el pH cuando se obtenga una lectura constante. Continuar agregando titulante y medir el pH hasta que se alcance el pH 4.5 ó más abajo. Construir la curva de titulación posteando los valores de pH observados contra los mililitros acumulativos del titulante agregado. Se debe obtener una curva suave con una ó más inflecciones. Una curva áspera ó errática puede indicar que no se alcanzó equilibrio entre las adiciones sucesivas de ácido. Determinar la alcalinidad relativa a un pH en particular a partir de la curva. No filtrar, diluir, concentrar ó alterar la muestra.

3.1.4.3 Titulación potenciométrica a un pH preseleccionado: Determinar el pH apropiado del punto final de acuerdo a la Sección 3.1.1.2. Preparar la muestra y aparatos de titulación. Titular al pH del punto final, sin reportar los pH de valor intermedio y sin retraso. Conforme se acerque al punto final hacer adiciones más pequeñas de ácido y asegurar que se ha llegado al pH de equilibrio antes de agregar más titulante.

3.1.4.4 Titulación potenciométrica de alcalinidad baja: Para alcalinidades menores de 20 mg/L, titular 100 a 200 mL de acuerdo a procedimiento de la Sección 3.1.4.3, usando una microbureta de 10 mL y 0.02 N de solución ácida estándar. Parar la titulación en un pH de rango entre 4.3 a 4.7 reportar el volumen y pH exacto. Cuidadosamente agregar titulante adicional para reducir el pH exactamente 0.30 unidad pH y de nuevo reportar el volumen.

3.1.5 Cálculo

3.1.5.1 Titulación potenciométrica a pH del punto final:

$$\text{Alcalinidad, mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{A \times N \times 50,000}{\text{Volumen de muestra, mL}}$$

A = Volumen de ácido estándar usado, mL

N = Normalidad de ácido estándar

ó

$$\text{Alcalinidad, mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{A \times t \times 1000}{\text{Volumen de muestra, mL}}$$

donde:

t - Concentración de ácido estándar, mg CaCO₃/mL

Reportar el pH del punto final usado de la siguiente manera:

"La alcalinidad a pH _____ = _____ mg CaCO₃/L", e indicar claramente si este pH corresponde a un punto de inflexión de la curva de titulación.

3.1.5.2 Titulación potenciométrica de alcalinidad baja:

$$\begin{aligned} \text{Alcalinidad total, mg CaCO}_3/\text{mL} \\ = \frac{(2 B - C) \times N \times 50000}{\text{Volumen de muestra, mL}} \end{aligned}$$

donde:

B = Volumen de titulante del primer pH grabado, mL

C = Volumen total de titulante en alcanzar pH 0.3 unidad baja, mL

N = Normalidad del ácido.

3.1.5.3 Cálculo de relaciones de alcalinidad:

Los resultados obtenidos de las determinaciones de alcalinidad fenolftaleína y total ofrecen un medio de clasificación estequiométrica de las 3 formas principales de alcalinidad presente en muchas aguas. La clasificación atribuye la alcalinidad entera a bicarbonato, carbonato, e hidróxido y asume la ausencia de otros ácidos débiles orgánicos o inorgánicos tales como ácidos sílicos, fosfóricos y bóricos. Presupone más la incompatibilidad de alcalinidades de hidróxido y bicarbonato. Porque los cálculos se hacen en base de concentraciones de iones en el sentido más estricto no están representados en los resultados, los cuales pueden diferir significativamente de las concentraciones actuales especialmente en pH 10. De acuerdo con este esquema.

- 1) Alcalinidad de carbonato (CO₃²⁻) está presente cuando la alcalinidad fenolftaleína no es cero pero es menos que la alcalinidad total.
- 2) Alcalinidad de hidróxido (OH⁻) está presente si la alcalinidad fenolftaleína es más de la mitad de la alcalinidad total.
- 3) Alcalinidad de bicarbonato (HCO₃⁻) está presente si la alcalinidad fenolftaleína es menos de la mitad de la alcalinidad total. Estas relaciones pueden ser calculadas por el esquema siguiente donde "P" representa alcalinidad fenolftaleína y "T" es alcalinidad total (ver la Sección 3.1.1.2).

Seleccionar el valor más bajo de P ó (T-P). Entonces la alcalinidad de carbonato iguala 2 veces el valor más bajo. Cuando el valor

más bajo es P, el balance (T-2P) es bicarbonato. Cuando el valor más pequeño es (T-P), el balance (2P-T) es hidróxido. Todos los resultados están expresados como CaCO₃. La conversión matemática de los resultados se ve en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Relaciones de Alcalinidad*

Resultado de la Titulación	Alcalinidad Hidróxida como CaCO ₃	Alcalinidad de Carbonato como CaCO ₃	Concentración Bicarbonato como CaCO ₃
P = 0	0	0	T
P < 1/2 T	0	2 P	T - 2 P
P = 1/2 T	0	2 P	0
P > 1/2 T	2 P - T	2 (T-P)	0
P = T	T	0	0

*Clave: P - Alcalinidad Fenolftaleina; T - Alcalinidad Total

Las relaciones de alcalinidad también pueden ser computados nomográficamente. Medir con exactitud el pH, calcular la concentración de OH⁻ como miligramos de CaCO₃ por litro, y calcular la concentración de CO₃²⁻ y HCO₃⁻ por litro, y calcular la concentración de CO₃²⁻ y HCO₃⁻ como miligramos de CaCO₃ por litro de la concentración de OH⁻. Calcular las alcalinidades fenolftaleina total por medio de la siguiente ecuación:

$$CO_3^{2-} = 2 P - 2[OH^-]$$

$$HCO_3^- = T - 2 P + [OH^-]$$

Similarmente, si se experimenta dificultad con el punto final de Fenolftaleina, ó si se quiere revisar la titulación de Fenolftaleina, calcular la alcalinidad Fenolftaleina como CaCO₃ a partir de los resultados de las determinaciones nomográficas de concentraciones de iones de carbonato e hidróxido:

$$P = 1/2 [CO_3^{2-}] + [OH^-]$$

Figura 3.1.

Hoja de Laboratorio
Para Análisis
de Alcalinidad

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
DE LA CUENCA GUACERIQUE
PLAN MAESTRO - DEPTO DE LIMNOLOGIA - SANAA

ALCALINIDAD

SITIOS	Vol. de ácido estandar, mL	Normalidad de ácido estandar, N	Punto final p ^H	Alcalinidad, mg CaCO ₃ / L
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

FECHA DE MUESTREO : _____

FECHA DE ANALISIS : _____

NOMBRE DEL TECNICO DE LABORATORIO : _____

3.2

Demanda Bioquímica de Oxígeno

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) es un ensayo en donde se usan los procedimientos típicos de laboratorio a determinar los requisitos relativos de oxígeno para aguas negras y aguas contaminadas.

El ensayo mide el oxígeno requerido para la degradación bioquímica (biológica) de materiales orgánicos (demanda carbónica), y el oxígeno gastado en la oxidación de materia inorgánica como sulfuros y hierro ferroso. También este ensayo mide el oxígeno gastado para reducir nitrógeno, si no se introduce un inhibidor para evitar el consumo de oxígeno por nitrógeno.

El método consiste en poner la muestra en una botella de muestra, bien cerrada e incubarla bajo condiciones específicas, durante un tiempo fijado. Para obtener el valor de DBO, se mide el oxígeno disuelto a la iniciación y al fin de incubación.

El DBO es calculado de la diferencia entre el valor inicial y el valor final de oxígeno disuelto.

El tamaño de la botella, la temperatura de la incubación y el período de incubación son los controles específicos del ensayo. La mayoría de aguas negras ó aguas bien contaminadas contienen una abundancia de materiales que demandan oxígeno. Entonces, es necesario diluir la muestra antes de incubarla para obtener un balance propio entre la demanda y la provisión de oxígeno.

Los nutrientes de las bacterias, como nitrógeno, fosfato y otros metales en pequeñas concentraciones, son agregados al agua de dilución que es amortiguada para asegurar que el pH de la muestra queda en un rango apropiado para el crecimiento de las bacterias.

Es importante medir la demanda de oxígeno carbónica, y la de nitrógeno separados, para obtener un valor de DBO que es significativo. Para este fin se usa un inhibidor químico de oxidación de nitrógeno. La extensión de oxidación de materia nitrogenada, durante un período de cinco días de incubación, depende de la presencia de micro-organismos que tienen la capacidad de llevar a cabo este tipo de oxidación. Es recomendado inhibir la nitrificación en casos de muestras de aguas contaminadas.

El método de laboratorio para medir DBO que se describirá contiene un control para el agua de dilución y también un blanco de agua de dilución. El control de agua de dilución se usa para determinar la aceptabilidad de un juego específico de agua de dilución antes de usarlo para el análisis de DBO. Aguas de dilución sembradas son examinadas para su calidad, usando una mezcla orgánica conocida (normalmente glucosa y ácido de glutámico) para medir el consumo de oxígeno.

Se hace el blanco de agua de dilución al mismo tiempo que se analizan las muestras. Este procesamiento provee un seguro de control de calidad al agua de dilución, y también para la limpieza de las botellas de DBO.

3.2.1 Muestreo y Almacenamiento

Muestras de DBO para análisis se deterioran bastante rápido durante el almacenamiento entre el tiempo de colección y de análisis, resultando en valores de DBO muy bajos. Disminuir la reducción de DBO haciendo el análisis inmediatamente o enfriando la muestra hasta el punto de congelación durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, aún si se mantiene la muestra en punto de congelación debe hacerse el análisis lo más pronto posible. Antes de empezar el análisis, la muestra debe estar a una temperatura de 20°C.

3.2.1.1 Muestras individuales: Si se analiza la muestra dentro de dos horas después de tomarla, no es necesario enfriar la muestra. Si no se empieza a analizar la muestra dentro de dos horas, mantenga la muestra a/o bajo de 4°C. En este caso es necesario empezar el análisis dentro de seis horas. Si no es posible analizar la muestra dentro de seis horas, guardarla a/o bajo de 4°C y anotar este hecho en los resultados, en la hoja de análisis. Anotar la duración de almacenamiento y la temperatura de almacenamiento. En ningún caso se puede empezar el análisis de DBO después de 24 horas.

3.2.1.2 Muestras compuestas: Mantener las muestras a/o bajo de 4°C durante el procesamiento de composición (unión). Limitar el tiempo de composición a 24 horas. Usar los mismos criterios para almacenar estas muestras que las de las muestras individuales.

Empezar la medición de tiempo de almacenamiento desde el final del tiempo de composición. Reportar tiempo de almacenamiento y las condiciones de almacenamiento con los resultados.

3.2.2 Aparatos

3.2.2.1 Botellas de incubación: 250 mL a 300 mL de capacidad, con tapones de vidrio esmerilado.

Lavar las botellas con detergente, enjuagarlas bien y drenarlas antes de usar. Como una precaución contra inhalación de aire en las botellas de dilución durante la incubación, usar un sello de agua. Se puede obtener un sello de agua satisfactorio, si se invierten las botellas en el incubador de baño de agua o agregar agua a la boca de las botellas especiales de DBO. Poner una taza o tapadera de plástico o de papel encima de la boca de la botella para evitar evaporación durante la incubación.

3.2.2.2 Incubador de aire o baño de agua: El incubador debe estar regulado termostáticamente a 20°C \pm 1°C. Excluir del todo la luz para evitar la posibilidad de producción fotosintética de oxígeno disuelto.

3.2.3 Reactivos

3.2.3.1 Solución amortiguadora de fosfato: Disolver 8.5 g KH_2PO_4 , 21.75 g K_2HPO_4 , 33.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 1.7 g NH_4Cl en 500 mL de agua destilada y diluir la solución hasta un litro. El pH debe ser 7.2, sin hacer ningún ajuste. Eliminar el reactivo si hay cualquier indicación

de crecimiento biológico en la botella de reactivo existente.

- 3.2.3.2 Solución amortiguadora de sulfato de magnesio: Disolver 22.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua destilada y diluir hasta un litro.
- 3.2.3.3 Solución de cloruro de calcio: Disolver 27.5 g de $CaCl_2$ en agua destilada y diluirlo hasta un litro.
- 3.2.3.4 Solución de cloruro férrico: Disolver 0.25 de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en agua destilada y diluirlo hasta un litro.
- 3.2.3.5 Soluciones ácidas y alcalinas, 1N. Para la neutralización de muestras caústicas y ácidas de desperdicio.
- 3.2.3.6 Solución de sulfito de sodio 0.025N: Disolver 1.575 g Na_2SO_3 en 1000 mL de agua destilada. Esta solución no es estable, prepararla a diario.
- 3.2.3.7 Inhibidor de nitrificación: Piridina 2 -cloro ó tricloro- metil.
- 3.2.3.8 Solución de glucosa-ácido glutámico: Secar glucosa de calidad de reactivo y ácido glutámico de calidad de reactivo a 103°C por 1 hora. Agregar 150 mg de glucosa y 150 mg de ácido glutámico a agua destilada y diluir hasta 1 litro. Prepararla inmediatamente antes de usarla.

3.2.4 Procedimiento

- 3.2.4.1 Preparación del agua de dilución: Poner el volumen deseado de agua en una botella adecuada y agregar 1 mL de amortiguador fosfato, 1 mL de $MgSO_4$, 1 mL de $CaCl_2$ y 1 mL de $FeCl_3$ /L de agua. Sembrar el agua de dilución, si se quiere, de la forma descrita en la Sección 3.2.4.4. Probar y almacenar el agua de dilución como se describe en las Secciones 3.2.4.2 y 3.2.4.3 para siempre tener a mano agua de calidad asegurada.
- 3.2.4.2 Prueba del agua de dilución: Usar este procedimiento como una prueba aproximada de la calidad del agua de dilución. Si el agua de dilución no ha sido almacenada para mejorar la calidad, agregar suficiente material de siembra para producir un aumento de OD (oxígeno disuelto) de 0.05 a 0.1 mg/L en 5 días a 20°C. No sembrar el agua de dilución que ha sido almacenada para mejorar su calidad. Incubar una botella de DBO llena de agua de dilución por 5 días a 20°C. Determinar el OD inicial y final como se describe en las Secciones 3.2.4.7 y 3.2.4.10. El aumento de OD en 5 días a 20°C no debe ser más de 0.1 mg/L.

Si la disminución del oxígeno de una muestra de agua es mayor de 0.2 mg/L, obtener una muestra satisfactoria mejorando la purificación ó tomándola de otra fuente. Alternativamente si se usa la inhibición de la nitrificación, almacenar el agua de dilución sembrada a 20°C hasta que el aumento de oxígeno es suficientemente reducida para alcanzar el criterio de prueba del agua de dilución. No se re-

comienda el almacenamiento cuando se determinarán las DBO sin la inhibición de la nitrificación porque organismos nitrificantes pueden desarrollarse durante el almacenamiento. Probar el agua de dilución almacenada para determinar si queda suficiente amoníaco después del almacenamiento.

Antes del uso llevar la temperatura del agua de dilución a 20°C. Saturar con OD sacudiendo en una botella parcialmente llenada ó aireando con aire filtrado. Alternativamente, almacenar en botellas tapadas con algodón lo suficiente para que el agua se sature con oxígeno disuelto. Proteger la calidad del agua usando cristalería, tubería y botellas limpias.

3.2.4.3 Prueba de glucosa-ácido glutámico: Debido a que la prueba DBO es un bioensayo, los resultados pueden ser influenciados grandemente por la presencia de sustancias tóxicas ó por el uso de material de siembra pobre. Las aguas destiladas frecuentemente están contaminadas con cobre. Algunas muestras sembradas de aguas negras son relativamente inactivas y siempre se obtienen resultados bajos con estas muestras sembradas y aguas. Periódicamente se debe examinar la calidad del agua de dilución, la efectividad de la muestra sembrada y la técnica analítica haciendo medidas de DBO en compuestos orgánicos puros. En general, para la determinación DBO que no requiera una muestra sembrada adaptada, usar una mezcla de 150 mg de glucosa/L y 150 mg de ácido glutámico/L como una solución de prueba estándar. La glucosa tiene una tasa de oxidación excepcionalmente alto y variable, pero cuando se usa con ácido glutámico, el ritmo de oxidación es estabilizado y es similar al que se obtiene de muchos desperdicios municipales. Alternativamente, si unas aguas negras en particular contiene un constituyente principal identificable que contribuye a la DBO, usar este compuesto en vez de glucosa-ácido glutámico. Determinar el DBO de 5 días 20°C de una dilución 2% de la solución de prueba estándar de glucosa-ácido glutámico usando las técnicas descritas en las Secciones 3.2.4.4 a 3.2.4.10. Si el valor de la prueba de 5 días 20°C de DBO está fuera del rango de 200 ± 37 mg/L, rechazar cualesquiera determinaciones DBO hecha con la muestra sembrada y agua de dilución y buscar la causa del problema.

3.2.4.4 Sembrado: Es necesario tener presente a una población de microorganismos capaces de oxidar la materia orgánica biodegradable en la muestra. Las aguas negras domésticas efluentes no clorinadas ó no desinfectadas de cualquiera otra manera de plantas de desperdicio biológico o aguas de superficie que reciban descargas de aguas negras contienen poblaciones microbiales satisfactorias. Algunas muestras no contienen poblaciones microbiales suficientes (por ejemplo algunos desperdicios de temperatura alta ó desperdicios con valor de pH extremo). Para dichos desperdicios sembrar el agua de dilución agregando una población de microorganismos. La muestra sembrada preferida es efluente de un sistema de tratamiento biológico que procesa el desperdicio. Donde no se dispone de ésto, usar el sobrenadante de aguas negras domésticas después del asentamiento a 20°C por lo menos 1 hora pero no más de 36 horas.

Algunas muestras pueden contener materiales que no son degradados a

ritmos normales por los microorganismos en aguas negras asentadas. Sembrar estas muestras con una población microbiana adaptada obtenida del efluente no desinfectado de un proceso biológico que esté tratando el desperdicio. En caso de que falte esta facilidad, obtener la muestra sembrada al agua, aguas abajo (preferiblemente 3 a 8 kilómetros del punto de descarga). Cuando tampoco se dispone de estas fuentes de muestra sembrada, desarrollar una muestra sembrada adaptada en el laboratorio por medio de aireación continua de una muestra de aguas negras domésticas asentadas y agregando pequeños incrementos diarios de desperdicio. Opcionalmente usar una suspensión de suelo ó lodo activado para obtener la población microbiana inicial.

Determinar la existencia de una población satisfactoria probando el rendimiento de la muestra sembrada en pruebas DBO en la muestra total.

Los valores DBO que aumentan con el tiempo de adaptación a un valor alto estable indican la adaptación exitosa de la muestra sembrada. Al hacer las pruebas usar suficiente volumen de muestra sembrada para asegurar números satisfactorios de microorganismos pero no tanto que la demanda de oxígeno (DO) de la muestra sembrada en sí sea la mayor parte del oxígeno usado durante la incubación.

Determinar el DBO del material de siembra así como para cualquier otra muestra. Este es el control de la muestra sembrada. Del valor de control de la muestra sembrada y un conocimiento de la dilución, determinar la toma de OD de la muestra sembrada. Para determinar la toma de OD de una muestra total, restar la toma de OD de la muestra sembrada de la toma de OD total. La toma de OD del agua de dilución sembrada debe ser entre 0.6 y 1.0 mg/l. Las técnicas para agregar material de siembra al agua de dilución están descritos para dos métodos de dilución de muestra (ver la Sección 3.2.4.6).

3.2.4.5 Pretratamiento de la muestra

3.2.4.5.1 Muestras que contienen alcalinidad caustica ó acidez - Neutralizar las muestras a pH 6.5 a 7.5 con una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) ó hidróxido de sodio (NaOH) de tal concentración que la cantidad de reactivo no diluya la muestra a más del 0.5%. El pH del agua de dilución sembrada no debe ser afectada por la dilución de muestra más baja.

3.2.4.5.2 Muestras que contienen compuestos de cloro residual - Si es posible evitar las muestras que tienen cloro residual haciendo muestreos antes de los procesos de clorinación. Si la muestra ha sido clorada, pero no hay cloro residual presente detectable, sembrar el agua de dilución (ver la Sección 3.2.4.6). No probar muestras clorinadas/desclorinadas sin sembrar el agua de dilución. En algunas muestras el cloro se disipará después de 1 a 2 horas de estar en la luz. Esto ocurre a menudo durante el transporte y manejo de la muestra. Para las muestras en las cuales el cloro no se disipa en un tiempo corto razonable, deshacer el residuo de cloro agregando solución de

Na₂SO₃. Determinar el volumen requerido de solución Na₂SO₃ en una porción de 100 a 1000 mL de muestra neutralizada agregando 10 mL de 1 + 1 de ácido acético ó 1 + 50 H₂SO₄, 10 mL de solución de yoduro de potasio, KI (10 g/100 mL) y titulando con 0.025 N de solución de Na₂SO₃ al punto final de almidón - yodo. Agregar a la muestra neutralizada el volumen de solución de Na₂SO₃ determinado por la prueba anterior, mezclar y después de 10 a 20 minutos revisar la muestra para ver si hay cloro residual.

- 3.2.4.5.3 Muestras que contengan otras sustancias tóxicas - Ciertos desperdicios industriales, por ejemplo, desperdicios de procesos de platina contienen metales tóxicos. Dichas muestras a menudo requieren estudio y tratamiento especial.
- 3.2.4.5.4 Muestras supersaturadas con OD - Las muestras que contienen más de 9 mg OD/L a 20°C se pueden encontrar en las aguas frías ó en el agua donde ocurre fotosíntesis. Para evitar la pérdida de oxígeno durante la incubación de dichas muestras, reducir el OD a saturación a 20°C llevando la muestra a cerca de 20°C en una botella parcialmente llena mientras es agitada por medio de sacudidos vigorosos ó aireando con aire comprimido.
- 3.2.4.5.5 Ajuste de la temperatura de la muestra - Llevar las muestras a 20 ± 1°C antes de hacer las diluciones.
- 3.2.4.5.6 Inhibición de nitrificación - Si se desea la inhibición de la nitrificación, agregar 3.33 mg 2-cloro-6-tricloro-metil piridina a cada botella antes de tapar ó agregar cantidades suficientes al agua de dilución para hacer una concentración final de 10 mg/L. Las muestras que pueden requerir inhibición de la nitrificación incluyen, pero no están limitados a efluentes biológicamente tratados, muestras sembradas de efluentes biológicamente tratados y aguas de ríos. Anotar el uso de inhibición de nitrógeno y reportar en los resultados.
- 3.2.4.6 Técnica de la dilución: Las diluciones que resultan en un OD residual de por lo menos 1 mg/L y una toma de OD de por lo menos 2 mg/L después de 5 días de incubación producen los resultados más confiables. Hacer varias diluciones de la muestra preparada para obtener toma de OD en este rango. La experiencia con una muestra en particular permitirá el uso de un número menor de diluciones. Un análisis más rápido, tal como DQO (Demanda Química de Oxígeno) puede ser correlacionado aproximadamente con DBO y servir como una guía para seleccionar las diluciones: 0.0 a 1.0% para desperdicios industriales fuertes, 1 a 5% para las aguas negras crudas y asentadas, 5 a 25% para efluente tratado biológicamente, y 25 a 100% para las aguas de río contaminadas.

Preparar las diluciones en cilindros graduados y después transferirlos a las botellas DBO, ó prepararlas directamente en las botellas DBO. Cualquiera de los métodos de dilución puede ser combinado con cualquier técnica de medida de OD. El número de botellas que serán preparadas para cada dilución depende de la técnica OD y el número de réplicas que se desea.

Cuando se usen los cilindros graduados para preparar las diluciones, y cuando se hace necesario sembrar, agregar la muestra sembrada directamente al agua de dilución ó a cilindros individuales antes de la dilución. La siembra en cilindros individuales evita una relación declinante de la muestra sembrada respecto a la muestra total conforme se incrementan las diluciones. Cuando las diluciones se preparan directamente en las botellas DBO y cuando la siembra es necesaria, agregar la muestra sembrada directamente al agua de dilución.

- 3.2.4.6.1 Diluciones preparadas en cilindros graduados- Si se usa el método membrana electrodo para la medición de OD, pasar la mezcla de dilución a una botella DBO. Determinar el OD inicial en esta botella y reemplazar cualquier contenido desplazado con la muestra de dilución para llenar la botella. Taparla bien, evitar fugas de agua e incubar por 5 días a 20°C.
- 3.2.4.6.2 Las diluciones preparadas directamente en las botellas DBO :- Usando una pipeta volumétrica de punta ancha, agregar el volumen de muestra deseado a botellas individuales DBO, de capacidad conocida. Llenar las botellas con suficiente agua de dilución, sembrada si es necesario, de manera que la inserción del tapón desplace todo el aire, sin dejar burbujas. Para las diluciones mayores de 1:100 hacer una dilución primaria en un cilindro graduado antes de hacer la dilución final en la botella. Cuando se usen métodos titrimétricos yodurométricos para la medición de OD, preparar dos botellas de cada dilución. Determinar el OD inicial en una botella. Tapar la segunda botella bien, sellarla con sello de agua, e incubarla por 5 días a 20°C. Si se usa el método de membrana electrodo para la medición de OD, solo preparar una botella DBO para cada dilución. Determinar el OD inicial en esta botella y reemplazar cualquier contenido desplazado con agua de dilución para llenar la botella. Taparla bien, evitar fugas de agua e incubarla por 5 días a 20°C.
- 3.2.4.7 Determinación del OD Inicial: Si la muestra contiene materiales que reaccionan rápidamente con el OD, determinar el OD inicial inmediatamente después de llenar las botellas DBO con la muestra diluida. Si el aumento de OD inicial rápida es insignificante, el período de tiempo entre preparar la dilución y medir el OD inicial no es crítico.
- Usar el método membrana electrodo para determinar el OD inicial en todas las diluciones de muestra, blancos de agua de dilución y donde sea apropiado, controles de muestras sembradas.
- 3.2.4.8 Blanco de agua de dilución: Usar un blanco de agua de dilución como una prueba aproximada de la calidad de agua de dilución que no ha sido sembrado y de la limpieza de las botellas de incubación. Junto con cada grupo de muestras incubar una botella de agua de dilución no sembrada. Determinar el OD inicial y final como se describe en las Secciones 3.2.4.7 y 3.2.4.10. El aumento de OD no debe ser más de 0.1 mg/L.
- 3.2.4.9 Incubación: Incubar a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, las botellas DBO que contienen las

diluciones deseadas, controles de semilla, blancos de agua de dilución y pruebas de glucosa-ácido glutámico. Sellar las botellas para la fuga de agua como se describe en la Sección 3.2.4.6.

3.2.4.10 Determinación de OD final: Después de 5 días de incubación determinar el OD en las diluciones de muestra, blancos y pruebas como en la Sección 3.2.4.7.

3.2.5 Cálculo

Cuando el agua de dilución no está sembrada:

$$\text{mg DBO/L} = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

Cuando el agua de dilución está sembrada:

$$\text{mg DBO/L} = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2) f}{P}$$

donde:

D_1 = OD de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación, mg/L.

D_2 = OD de la muestra diluida después de 5 días de incubación a 20°C, mg/L.

P = Fracción volumétrica decimal de la muestra usada

B_1 = OD del control de la muestra sembrada antes de la incubación, mg/L.

B_2 = OD del control de la muestra sembrada después de la incubación, mg/L.

f = Relación de la muestra sembrada en la muestra total a la muestra sembrada en el control.

$$= \left(\frac{\% \text{ de muestra sembrada en } D_1}{\% \text{ de muestra sembrada en } B_1} \right)$$

Si más de una dilución de muestra llena el criterio de un OD residual de por lo menos 1 mg/L y un agotamiento de OD de por lo menos 2 mg/L y no hay evidencia de toxicidad en concentraciones de muestras más altas ó la existencia de una anomalía obvia, hacer un promedio de los resultados en el rango aceptable.

En estos cálculos, no se hacen correcciones para el aumento de OD para el blanco del agua de dilución durante la incubación. Esta corrección no es necesaria si el agua de dilución llena el criterio del blanco estipulado antes. Si el agua de dilución no llena este criterio, es difícil hacer las correcciones apropiadas y los resultados se vuelven poco confiables.

Hoja de Laboratorio
 Para Análisis
 de Demanda Bioquímica
 de Oxígeno (DBO)

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
 DE LA CUENCA GUACERIQUE

PLAN MAESTRO - DEPTO DE LIMNOLOGIA - SANAA

DBO

SITIOS	HORA			TEMPERATURA, °C		CONCENTRACION O.D. DE MUESTRA, Mg/L		FRACCION VOLUMETRICA DE LA MUESTRA	CONCENTRACION O.D. DEL CONTROL, Mg/L		% SIEMBRA EN MUESTRA -f- % SIEMBRA EN CONTROL	Mg DBO/L
	MUESTREO	INICIO DE PREPARACION DE ANALISIS	INICIO DE INCUBACION	ALMACENAMIENTO	INICIO DE INCUBACION	INICIAL	FINAL		INICIAL	FINAL		
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

- 82 -

NOTAS:

FECHA DE MUESTREO: _____ FECHA DE ANALISIS: _____

NOMBRE DEL TECNICO DE LABORATORIO: _____

Dureza

Aguas duras generalmente son aguas que requieren cantidades considerables de jabón para producir espuma o jabonadura y las que producen incrustaciones en la tubería de aguas calientes, calentadores, calderos u otro equipo en que la temperatura del agua es elevada.

Dureza es producida por cationes metálicos divalentes. Esta clase de iones tiene la capacidad de reaccionar con jabón para formar precipitados, y con ciertos aniones en el agua ellos forma incrustaciones. Los mayores cationes que producen dureza son alistados en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Cationes Principales que Produce Dureza y los Aniones Asociados

Cationes Produciendo Dureza	Aniones
Ca ²⁺	HCO ₃ ⁻
Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻
Sr ²⁺	Cl ⁻
Fe ²⁺	NO ₃ ⁻
Mn ²⁺	SiO ₃ ²⁻

La dureza de agua proviene principalmente del contacto con suelo y formaciones rocosas. La habilidad de disolver rocas durante lluvias llega de los suelos en donde el anhídrido carbónico está descargado debido a la actividad bacteriana.

El agua de suelo está cargada del anhídrido carbónico que existe en equilibrio con ácido carbónico. Bajo condiciones de pH bajo, materia como piedra caliza está disuelta (ver Figura 3.3).

En vista de que piedra caliza no es carbonato puro, sino que contiene sulfatos, cloruros y silicatos, todos estos materiales también reaccionan con el agua y forman soluciones.

Generalmente se encuentran aguas duras en áreas donde la capa de suelo es gruesa y donde la piedra caliza está presente. Las aguas suaves se originan en áreas donde la capa de suelo es delgada y donde la piedra caliza no está presente ó existe en pequeñas formaciones.

La dureza de agua es importante para determinar si el agua es adecuada para uso doméstico e industrial.

El valor de dureza se calcula en base de la siguiente fórmula:

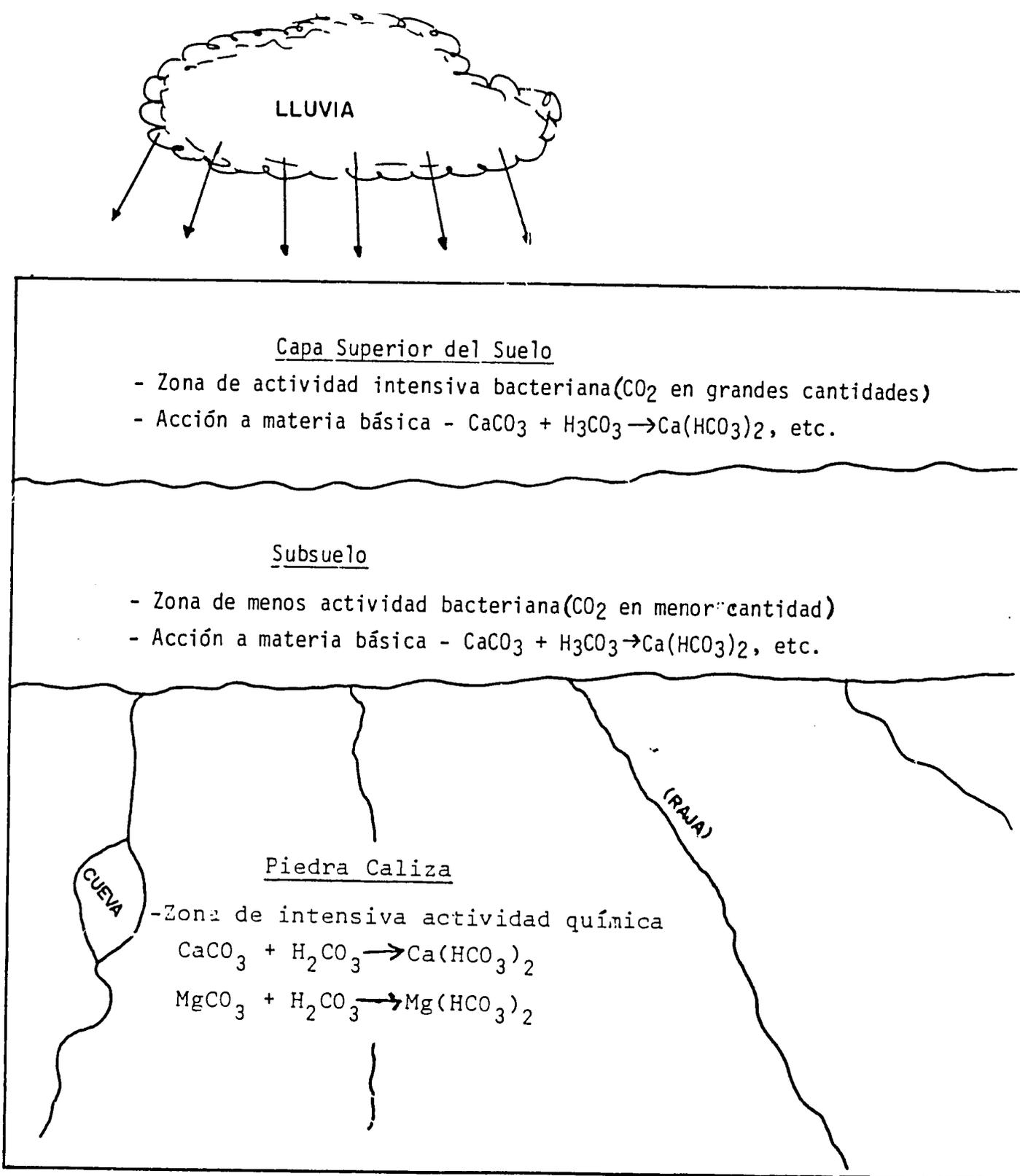


Figura 3.3. Fuentes de Anhídrico Carbónico y la Solución de Materia Básica que causa dureza

$$\text{mg Dureza CaCO}_3/\text{L} = \text{mg M}^{2+}/\text{L} \left(\frac{50}{\text{peso equivalente de M}^{2+}} \right)$$

donde M^{2+} = un ion divalente metálico

3.3.1 Método de Análisis y Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa llegue y se pruebe en el campo.

3.4

Fosfato

El fósforo se encuentra en las aguas naturales y aguas negras casi únicamente como fosfatos. Estos están clasificados como ortofosfatos, fosfatos condensados. (piro - meta - y otros polifosfatos) y complejos orgánicos de fosfatos, y se encuentran en solución en partículas ó detritos, ó en los cuerpos de organismos acuáticos.

Estas formas de fósforo aparecen de una variedad de fuentes. Pequeñas cantidades de ciertos fosfatos condensados se agregan a algunos abastecimientos de agua durante el tratamiento. Cantidades más grandes de los mismos compuestos pueden ser agregados cuando el agua se utiliza para lavandería ó algún otro tipo de limpieza, porque estos materiales son constituyentes mayores de muchas preparaciones comerciales de limpieza. Los fosfatos se usan extensamente en el tratamiento de aguas de caldera. Los ortofosfatos, aplicados como fertilizante a tierra agrícola cultivada ó residencial son transportadas por las aguas de superficie con la escorrentía de lluvias. Los fosfatos orgánicos son formados principalmente por procesos biológicos. Ellos contribuyen a las aguas fecales por desperdicios del cuerpo y residuos de comida, y también pueden ser formados a partir de ortofosfatos, en los procesos de tratamiento biológico ó por la biota del agua donde caen ó se almacenan.

El fósforo es esencial para el crecimiento de organismos y puede ser el nutriente que limita la productividad primaria de un cuerpo de agua. En cuerpos de agua donde el fosfato es un nutriente limitante de crecimiento, la descarga de aguas negras crudas ó tratadas, drenaje agrícola ó algunos desperdicios industriales puede estimular el crecimiento de micro- y macroorganismos acuáticos fotosintéticos en cantidades que molestan.

Los fosfatos también se encuentran en sedimentos del fondo y en lodos biológicos, ambos como formas inorgánicas precipitadas e incorporadas en compuestos orgánicos.

3.4.1 Método de Análisis y Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa de monitoreo llegue y se prueba en el campo.

3.5

Hierro

En las muestras filtradas de aguas superficiales oxigenadas las concentraciones de hierro raras veces alcanzan 1 mg/L. Algunas aguas subterráneas y drenaje superficial de ácido pueden contener considerablemente más hierro. El hierro en el agua puede causar manchas en la ropa y porcelana. Un sabor astringente agrisado es detectado por algunas personas a niveles arriba de 1 mg/L.

Bajo condiciones de reducción, el hierro existe en el estado ferroso. En la ausencia de iones formadores de complejos, el hierro férrico no es significativamente soluble a menos que el pH sea muy bajo. Al ser expuesto al aire ó por la adición de oxidantes, el hierro ferroso es oxidado al estado férrico y se puede hidrolizar para formar óxido férrico hidratado insoluble.

En las muestras de agua el hierro puede ocurrir en solución verdadera, en un estado coloidal que puede ser peptizado por materia orgánica en complejos de hierro en inorgánicos u orgánicos ó en partículas suspendidas relativamente gruesas. El hierro puede ser ferroso ó férrico, suspendido ó disuelto.

Los sedimentos y arcillas en suspensión pueden contener hierro ácido soluble. A veces las partículas de óxido de hierro son colectadas con una muestra de agua como resultado del desprendimiento de hojuelas de óxido de los tubos. El hierro puede proceder también de una tapa de metal usada para cerrar la botella de muestreo.

3.5.1 Método de Análisis y Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa de monitoreo llegue y se pruebe en el campo.

En aguas y aguas negras las formas de nitrógeno de más interés son en orden de estado de oxidación decreciente como nitrato, nitrito, amoníaco y/o nitrógeno orgánico. Todas estas formas de nitrógeno, igual que el gas de nitrógeno son interconvertibles bioquímicamente y son componentes del ciclo de nitrógeno.

El nitrógeno se encuentra en las aguas naturales contaminadas, primero, en las formas de nitrógeno orgánico y luego como amoníaco.

El nitrógeno orgánico se convierte en amoníaco y después si existen condiciones aeróbicas, se convierte a nitritos y nitratos (ver Figuras 3.4 y 3.5).

La conversión autotrófica de amoníaco a nitritos y nitratos requiere oxígeno, y entonces la descarga de nitrógeno amoníaco y la oxidación subsiguiente reduce significativamente el nivel de oxígeno disuelto en los ríos. Este problema es especialmente serio cuando se dispone del tiempo necesario para el crecimiento de bacterias nitrificadas.

Nitrógeno orgánico es definido funcionalmente como nitrógeno unido orgánicamente en el estado de oxidación trinegativo. No incluye todos los compuestos de nitrógeno orgánico. Analíticamente el nitrógeno orgánico y amoníaco pueden ser determinados juntos y se les ha referido como "nitrógeno Kjeldahl", un término que refleja la técnica usada en su determinación. Nitrógeno orgánico incluye materiales naturales tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, urea y numerosos materiales orgánicos sintéticos. Concentraciones de nitrógeno orgánicos típicos varían de pocos cientos de microgramos por litro en algunos lagos a más de 20 mg/L en agua de alcantarilla cruda.

El nitrógeno oxidado total es la suma de nitrógeno - nitrato y nitrito. El nitrato generalmente ocurre en cantidades trazas en aguas superficiales pero puede tener altos niveles en algunas aguas subterráneas. En cantidades excesivas contribuye a la enfermedad conocida como metamoglobinemia en infantes. Se ha establecido un límite de 10 mg/L de nitrato como nitrógeno en el agua potable para prevenir este desorden. El nitrato se encuentra solo en pequeñas cantidades en aguas negras domésticas frescas pero en el efluente de plantas de tratamiento biológico, el nitrato puede ser encontrado en concentraciones de hasta 30 mg/L de nitrato como nitrógeno. Es un nutriente esencial para muchos organismos autotrofos fotosintéticos y en algunos casos ha sido identificado como el nutriente limitante de crecimiento.

El nitrito es un estado de oxidación intermedio del nitrógeno, tanto en la oxidación de amoníaco a nitrato como en la reducción de nitrato. Tal oxidación y reducción puede ocurrir en plantas de tratamiento de aguas negras, sistemas de distribución de aguas y aguas naturales. El nitrito puede entrar al sistema de abastecimiento de agua a través de su uso como inhibidor de corrosión en agua de proceso industrial. Nitrito es el agente etiológico actual de metamoglobinemia.

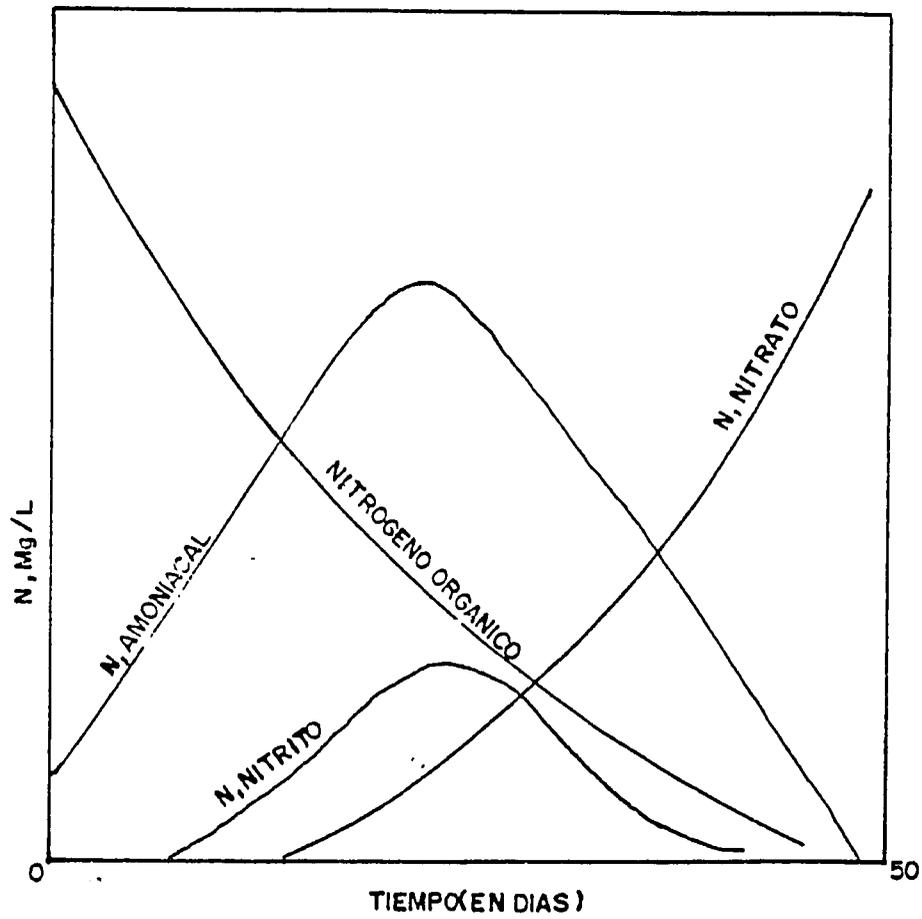


Figura 3.5 Cambios en la Forma de Nitrógeno Presente en Aguas Contaminadas Bajo Condiciones Aeróbicas

(N, Orgánico y NH₄ (Amoniacal) → Nitratos y Nitritos)

El ácido nitroso, el cual es formado de nitrito y solución ácida, puede reaccionar con aminas secundarias ($RR'NH$) para formar nitrosaminas ($RR'N-NO$), muchos de los cuales son conocidos como cancerosos. La significancia toxicológica de reacciones de nitrificación en vivo y en el medio ambiente natural es el objeto de mucha preocupación e investigación actual.

El amoníaco está presente naturalmente en aguas de superficie y aguas negras. Su concentración generalmente es baja en aguas subterráneas porque lo absorbe a partículas de suelo y arcillas y no es colado rápidamente por los suelos. Es producido en su mayoría por diseminación de compuestos que contienen nitrógeno orgánico y por hidrólisis de urea. En algunas plantas de tratamiento de agua se agrega amoníaco para que reaccione con el cloro para formar un residuo combinado de cloro.

En la clorinación de efluentes de aguas negras que contengan amoníaco, esencialmente no se obtiene cloro residual libre hasta que el amoníaco se oxida. Al contrario, el cloro reacciona con el amoníaco para formar mono y dicloraminas. Las concentraciones de amoníaco encontradas en el agua varían de menos de 10 mg/L de amoníaco-nitrógeno en algunas aguas naturales superficiales a más de 30 ug/L en algunas aguas negras. En este manual al nitrógeno orgánico se le refiere como orgánico N, nitrato nitrógeno, como NO_3-N , nitrógeno nitrito como NO_2-N , y nitrógeno amoníaco como NH_3-N .

3.7

Nitrógeno (Amoníaco)

3.7.1. Selección de Método

Los 2 factores mayores que influyen en la selección del método para determinar el amoníaco son la concentración y la presencia de interferencias. En general la determinación manual directa de concentraciones bajas se confina a agua potable, aguas superficiales limpias y el efluente de aguas negras nitrificadas de buena calidad. En otras circunstancias y donde hay interferencias presentes y se necesita una precisión mayor, se requiere un paso preliminar de destilación. Para concentraciones altas de amoníaco se prefiere una técnica de destilación y titulación.

Se presentan la nesslerización y el método por titulación. Como los rangos de concentración máximos establecidos no son límites rigurosos, se prefiere la titulación en concentraciones más altas que los niveles máximos establecidos para el procedimiento fotométrico. El método nessler es sensitivo a 20 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ bajo condiciones óptimas y puede ser usado hasta 5 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Turbidez, color y sustancias precipitadas por el ión hidróxilo, tales como magnesio y calcio interfieren y pueden ser removidos por destilación preliminar o menos satisfactoriamente, por precipitación con sulfato de zinc y alcañal.

El método Fenatc manual tiene una sensibilidad de 10 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ y es útil hasta para 500 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. La destilación preliminar es requerida si la alcalinidad excede 500 mg de $\text{CaCO}_3\text{/L}$, si hay color ó turbidez presente, ó si la muestra ha sido preservada con ácido.

La destilación en ácido sulfúrico absorbente es mandatorio para el método Fenato cuando hay interferencias presentes. El ácido bórico debe ser el absorbente después de la destilación si es que el destilado será nesslerizado o titulado.

3.7.2 Interferencias

Glicina, urea, ácido glutámico cianatos y acetamida, hidrolizan muy lentamente en solución dejándolos solos, aunque solamente los cianatos hidrolizan en destilación con el pH de 9.5. La hidrólisis suma cerca de 7% en este pH para urea y cerca de 5% para cianatos.

Glicina hidrozina y algunas aminos reaccionan con reactivo nessler para dar el color amarillo característico en el tiempo requerido para el ensayo, similarmente compuestos alcalinos como hidrozina y aminos influyen los resultados titulométricos. Algunos compuestos orgánicos tales como cetonas, aldehídos, alcoholes y algunas aminos pueden causar un color amarillento ó verduzco después de la destilación que no es el color característico o una turbidez en la nesslerización.

Algunas de estas sustancias como el formaldehído, pueden ser eliminados hirviéndolos con un pH bajo antes de nesslerización. Se puede remover el cloro residual por pretratamiento de la muestra.

3.7.3 Almacenamiento de muestras

Los resultados más confiables se obtienen en muestras frescas. Se debe destruir el cloro residual inmediatamente después de la colección de la muestra para prevenir su reacción con el amoníaco. Si un análisis inmediato es imposible hay que preservar sus muestras con 0.8 mL de concentrado H_2SO_4/L por muestra y almacenarla a $4^\circ C$. El pH de las muestras preservadas con ácido debe estar entre 1.5 y 2. Algunas aguas negras pueden requerir una mayor concentración de H_2SO_4 para lograr este pH. Si se usa preservación ácida, neutralizar las muestras con NaOH ó KOH inmediatamente antes de hacer la determinación.

3.7.4 Paso de Destilación Preliminar

3.7.4.1 Discusión General

La muestra es amortiguada en pH 9.5 con un amortiguador de borato para disminuir la hidrólisis de cianatos y compuestos de nitrógeno orgánico. Cuando se usa la nesslerización o la titulación, el destilado se amortigua con una solución de ácido bórico. El amoníaco en el destilado puede ser determinado colorimetricamente por nesslerización por el método Fenato ó titulametricamente con H_2SO_4 estándar y un indicador mixto ó con un pH metro. La escogencia entre el método colorimétrico y acidimétrico depende en la concentración de amoníaco. El amoníaco en el destilado también puede ser determinado por el método de electrodo selectivo de amoníaco, usando 0.04N H_2SO_4 para atrapar el destilado.

3.7.4.2 Aparatos

3.7.4.2.1 Aparato de destilación: Arreglar un frasco de vidrio de borosilicato de 800 a 2,000 mL de capacidad, anexo a un condensador vertical de manera que la punta de la salida pueda ser sumergida debajo de la superficie de la solución ácida receptora. Usar un aparato de vidrio borosilicato o uno con unidades condensadoras de tubos de lata o aluminio.

3.7.4.2.2 pH metro.

3.7.4.3 Reactivos

3.7.4.3.1 Agua libre de amoníaco: Prepararla por intercambio de iones ó métodos de destilación:

- 1) Intercambio de iones - Preparar el agua libre de amoníaco pasando agua destilada a través de una columna de intercambio de iones que contenga una resina ácida fuerte de intercambio de cationes mezclada con una resina fuertemente básica de intercambio de aniones. Seleccionar resinas que remueven los compuestos orgánicos que interfieren con la determinación de amoníaco. Algunas resinas de intercambio de aniones tienden a liberar amoníaco. Si esto ocurre preparar agua libre de amoníaco con una resina fuertemente ácida de intercambio de cationes.

Regenerar la columna de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Revisar el agua libre de amoníaco por la posibilidad de un valor alto en el blanco.

- 2) Destilación - Eliminar las trazas de amoníaco en agua destilada agregando 0.1 mL de concentrado H_2SO_4 de agua destilada y redestilada. Alternativamente tratar el agua destilada con suficiente bromo o agua con cloro para producir un residuo libre de halógeno de 2 a 5 mg/L y después redestilada durante por lo menos 1 hora. Descartar los primeros 100 mL de destilado. Revisar el agua redestilada por la posibilidad de un blanco alto. Es muy difícil almacenar agua libre de amoníaco en el laboratorio sin que haga contaminación de amoníaco gaseoso. Sin embargo, si es necesario almacenar, hacerlo en un recipiente de vidrio con un tapón bien apretado al cual se le agregan 10 g de resina de intercambio de iones (preferiblemente una resina fuertemente ácida de intercambio de cationes) por litro de agua libre de amoníaco. Al usarlo dejar que la resina se asiente y decantar el agua libre de amoníaco. Si se produce un valor alto en el blanco, cambiar la resina o preparar agua libre de amoníaco.

Usar agua destilada libre de amoníaco para preparar todos los reactivos, para enjuagar para la dilución de muestras.

- 3.7.4.3.2 Solución amortiguadora de borato: Agregar 88 mL de solución 0.1N NaOH a 500 mL de aproximadamente 0.025M solución de tetraborato de sodio ($9.5 \text{ g Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O/L}$) y diluir a 1 litro.
- 3.7.4.3.3 Hidróxido de sodio 6N: Disolver 240 g de NaOH en agua y diluirlo a 1 litro.
- 3.7.4.4.4 Agente declorizador: Usar 1 mL de cualquiera de los reactivos siguientes para remover 1 mg/L de cloro residual en 500 mL de la muestra.
 - 1) Sulfito de sodio - Disolver 0.9 g Na_2SO_3 en agua y diluir a 1 litro. Prepararla diariamente.
 - 2) Tiosulfato de sodio - Disolver 3.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ en agua y diluir a 1 litro. Prepararla semanalmente.
- 3.7.4.3.5 Agente de neutralización: Prepararlo con agua libre de amoníaco.
 - 1) Hidróxido de sodio, NaOH, 1N.
 - 2) Acido Sulfúrico H_2SO_4 , 1N.
- 3.7.4.3.6 Solución absorbente, ácido bórico corriente: Disolver 20 g H_3BO_3 en agua y diluir a 1 litro.
- 3.7.4.3.7 Solución de indicador mixto: Disolver 200 mg de indicador rojo de metilo en 100 mL 95% de alcohol etílico ó isopropílico. Disolver 100 mg de azul de metileno en 50 mL 95% alcohol etílico ó isopropílico. Combinar las soluciones. Prepararla mensualmente.

- 3.7.4.3.8 Solución de ácido bórico indicador: Disolver 20 g H_3BO_3 en agua destilada libre de amoníaco, agregar 10 mL de solución de indicador mixto y diluir 2 litros, preparar mensualmente.
- 3.7.4.3.9 Acido sulfúrico, 0.04 N: Diluir 1.0 mL de concentrado H_2SO_4 a 1 litro.
- 3.7.4.4 Procedimiento
- 3.7.4.4.1 Preparación del equipo: Agregar 500 mL de agua y 20 mL de amortiguador de borato a un frasco de destilación y ajustar el pH a 9.5 con una solución de 6N NaOH. Agregar unas cuantas pelotitas de vidrio o pedacitos de piedra hirviendo y usar esta mezcla para eliminar el vapor del aparato de destilación hasta que el destilado no indique trazas de amoníaco.
- 3.7.4.4.2 Preparación de la muestra: Usar 500 mL de muestra de clorada a una porción diluida a 500 mL con agua. Cuando la concentración de NH_3-N es menor de 10 ug/L usar un volumen de muestra de 1,000 mL. Remover el cloro residual agregando a la hora de recolección un agente desclorinador equivalente al residuo de cloro. Si es necesario, neutralizar a un pH de 7 con ácido diluido o base, usando un medidor de pH.
- Agregar 25 mL de solución amortiguadora de borato y ajustar a un pH de 9.5 con 6N NaOH usando un medidor de pH.
- 3.7.4.4.3 Destilación: Para minimizar la contaminación, dejar el aparato de destilación armado después de haberle eliminado el vapor y hasta inmediatamente antes de empezar la destilación de la muestra. Desconectar frasco de vaporación e inmediatamente transferir el frasco de la muestra al aparato de destilación. Destilar a un ritmo de 6 a 10 mL/min con la punta del tubo de entrega de bajo de la superficie de la solución recibidora de ácido. Colectar el destilado en un frasco erlenmeyer de 500 mL que contenga 50 mL de solución de ácido bórico corriente para el método de nesslerización. Usar 50 mL de solución de ácido bórico indicador para el método titulométrico. Bajar el destilado colectado para que quede libre de contacto con el tubo de entrega y continuar la destilación durante el siguiente primero ó segundo minuto para limpiar el condensador y el tubo de entrega. Diluir a 500 mL con agua.
- 3.7.4.4.4 Determinación de amoníaco: Determinar el amoníaco por el método de nesslerización (Sección 3.7.5) ó el método por titulación (Sección 3.7.6).
- 3.7.5 Método de Nesslerización (Destilación Directa y Siguiente)
- 3.7.5.1 Discusión General
- Usar el método de nesslerización sólo para agua potable purificada, agua natural, y efluentes de aguas negras altamente puri-

ficados, los que deberán ser bajos en color y tener concentraciones de NH_3N que excedan 20 ug/L. Aplicar el método de nesslerización directa a aguas negras domésticas solo cuando errores de 1 a 2 ug/L sean aceptables. Usar este método solo cuando se haya establecido que produce resultados comparables a los que han sido obtenidos después de la destilación. Revisar la validez de las medidas de nesslerización directa periódicamente.

Pretratamiento antes de nesslerización directa con sulfato de zinc y alcalinos precipita calcio, hierro, magnesio y sulfuro, los cuales forman turbidez cuando son tratados con reactivos nessler.

El flóculo también remueve materia suspendida y a veces materia coloreada. La adición de solución de sal ácido etilen-dimetiltetraacético (EDTA) o sal Rochella, inhiben la precipitación de calcio residual y iones de magnesio en la presencia del reactivo alcalino nessler. Sin embargo el uso de EDTA demanda una cantidad extra de reactivo nessler para asegurar un exceso de reactivo nessler suficiente que reaccione con el amoníaco.

Los colores graduales de amarillo a café producidos por la reacción nessler-amoníaco son absorbidas fuertemente sobre un rango amplio de longitud de onda. El color amarillo es característico de concentración baja de nitrógeno amoníaco (0.4 a 5 mg/L) y estas concentraciones pueden ser medidas con sensibilidad aceptada en la región de longitud de onda de 400 a 525 nm cuando se dispone de un camino de luz de 1 cm. Si se usa un camino de luz de 5 cm se deben extender las medidas dentro del rango de concentración de nitrógeno de 5 a 60 ug/L. Las matices café rojizas típicas de niveles de nitrógeno amoníaco que se acercan a 10 mg/L pueden ser medidas en la región de longitud de onda de 450 a 500 nm. Una selección juiciosa del camino de la luz y de la longitud de onda permite la determinación fotométrica de concentraciones de nitrógeno amoníaco sobre un rango considerable.

El abandono de la ley de Beer pueden ser evidentes cuando se utilizan los fotómetros equipados con filtros de banda ancha.

Por esta razón preparar la curva de calibración bajo condiciones idénticas con las adoptadas para las muestras. Un reactivo nessler preparado cuidadosamente puede responder bajo condiciones óptimas a valores tan bajos, como 1 ug $\text{NH}_3\text{-N}/50$ mL. En la nesslerización directa, esto representa 20 ug/L. Sin embargo, la reproductibilidad bajo 100 ug/L puede ser irregular.

3.7.5.2 Aparatos

3.7.5.2.1 Equipo Colorimétrico: Se requiere uno de los siguientes:

- 1) Espectrofotómetro para uso en 400 a 500 nm y que proporcione un camino de luz de 1 cm o más.
- 2) Fotómetro de filtro, que proporcione un camino de luz de 1 cm ó

más y equipado con un filtro violado que tenga transmisión máxima en 400 a 425 nm. Un filtro azul puede ser usado para concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ más altas.

3) Tubos Nessler, parejos, de 50 mL, de forma alta.

3.7.5.2.2 pH metro, equipado con un electrodo de pH alto.

3.7.5.3 Reactivos

Usar agua libre de amoníaco para preparar todos los reactivos, para enjuagar y hacer las diluciones. Se requieren todos los reactivos listados en destilación preliminar (Sección 3.7.4.3) excepto el amortiguador de borato y solución absorbente, y además los siguientes:

3.7.5.3.1 Solución de sulfato de zinc: Disolver 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y diluir a 1 litro con agua.

3.7.5.3.2 Reactivo estabilizador: Usar sal EDTA o Rochelle para prevenir la precipitación de calcio o magnesio en muestras que no han sido destiladas después de la adición de reactivo nessler alcalino.

1) Reactivo EDTA - Disolver 50 g de dihidrato etileno-dimetiltetraacético de sodio en 60 mL de agua que contengan 10 g NaOH. Si es necesario aplicar calor suave para completar la disolución. Enfriar a la temperatura ambiental y diluirlo a 100 mL.

2) Solución de sal rochelle - Disolver 50 g de tartarato de sodio tetrahidratado $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua. Remover el amoníaco usualmente presente en la sal evaporando por ebullición 30 mL de la solución. Después de enfriar diluir a 100 mL.

3.7.5.3.3 Reactivo nessler: Disolver 100 g HgI_2 y 70 g de KI en una cantidad pequeña de agua y agregar esta mezcla lentamente, agitando continuamente, a una solución fresca de 160 g de NaOH disueltos en 500 mL de agua. Diluir a 1 litro. Guardarlo en frascos de vidrio de borosilicato con tapones de hule y fuera de la luz para mantener la estabilidad del reactivo hasta por 1 año bajo condiciones de laboratorio normales. Revisar el reactivo para asegurar que produzca el color característico con 0.1 mg de $\text{NH}_3\text{-N/L}$ 10 minutos después de haberse agregado y que no produzca un precipitado con pequeñas cantidades de amoníaco durante las siguientes 2 horas (cuidado es tóxico).

3.7.5.3.4 Solución de amoníaco existente: Disolver 3.819 g NH_4Cl anhidro, secado a 100°C en agua y diluir a 1,000 mL; 1.00 mL = 1.00 mg N = 1.22 mg NH_3 .

3.7.5.3.5 Solución de amoníaco estándar: Diluir 10.00 mL de solución de amoníaco existente a 1,000 mL de agua: 1.00 mL = 10.00 ug N = 12.2 ug NH_3 .

3.7.5.3.6 Soluciones de color permanentes:

- 1) Solución de cloroplatinato potasio - Disolver 2.0 g de K_2PtCl_6 en 300 a 400 mL de agua; agregar 100 mL de concentrado HCl y diluir a 1 litro.
- 2) Solución cloruro de cobalto - Disolver 12.0 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en 200 mL de agua. Agregar 100 mL de concentrado HCl y diluir a 1 litro.

3.7.5.4 Procedimiento

- 3.7.5.4.1 Tratamiento de muestras no destiladas: Si es necesario, remover el cloro residual de la muestra fresca recién colectada agregándole una cantidad equivalente de agente descolorizante (no guardar las muestras clorinadas sin antes haberlas descolorizado). Agregar 1 mL de solución de $ZnSO_4$ a 100 mL de muestra y mezclarlos bien. Agregar 0.4 a 0.5 mL de solución 6N NaOH para obtener un pH de 10.5, de terminado con un medidor de pH y un electrodo de vidrio de pH alto, y mezclar suavemente. Dejar la muestra tratada y reposar por unos minutos hasta formarse un flúculo precipitado, dejando un líquido claro e incoloro. Clarificar centrifugando o filtrando. Probar de antemano cualquier papel filtro usado para asegurarse que no hay amoníaco presente como contaminante. Hacer esto pasando agua a través del filtro y examinando el filtrado por nesslerización.

Filtrar la muestra descartando cuidadosamente los primeros 25 mL de filtrado. Las muestras que tengan más de 10 mg NH_3-N/L pueden perder amoníaco durante este tratamiento de muestras no destiladas por el pH alto. Diluir dichas muestras al rango sensitivo para nesslerización antes del pretratamiento.

3.7.5.4.2 Desarrollo de color:

- 1) Muestras no destiladas - Usar 50.0 mL de muestra o una porción diluida a 50.00 mL con agua. Si la porción no destilada contiene suficiente concentración de calcio magnesio y otros iones que producen turbidez o precipitado con el nessler, agregar 1 gota (0.05 mL) de reactivo EDTA ó 1 a 2 gotas de (0.05 a 0.1 mL) de solución de sal de rochelle. Mezclar bien. Agregar 2.0 mL de reactivo nessler si se usa el reactivo EDTA ó 1.0 mL de reactivo nessler si se usa sal de rochelle.
- 2) Muestras destiladas - Neutralizar el ácido bórico que se usó para absorber el destilado de amoníaco agregando 2 mL de reactivo nessler, un exceso que eleva el pH al nivel alto deseado, o alternativamente, neutralizando el ácido bórico con NaOH antes de agregar 1 mL de reactivo nessler.
- 3) Mezclar las muestras, poniendo tapaderas de hule limpias a los tubos nessler, y después invirtiendo los tubos por lo menos 6 veces. Mantener las condiciones tales como temperatura y tiempo de reacción iguales en todas las muestras, blanco y estándares. Dejar que la reacción prosiga por lo menos 10 minutos después de agregar el reactivo nessler. Medir el color de la muestra y estándares. Si el NH_3-N está muy bajo, usar un tiempo de contacto de 30 minutos para la muestra, blanco y estándares. Medir el co-

lor fotométricamente o visualmente como se indica en las siguientes dos secciones.

3.7.5.4.3 Medida Fotométrica

Medir la absorbancia o transmisión con un espectrofotómetro o fotómetro de filtro. Preparar la curva de calibración de la misma temperatura y tiempo de reacción usado para las muestras. Medir las lecturas de transmisión contra un blanco reactivo y por verificaciones paralelas frecuentes contra estándares en el rango de nitrógeno de las muestras. Redeterminar la curva completa de calibración para cada nueva tanda de reactivos nessler.

Para muestras destiladas, preparar la curva estándar bajo las mismas condiciones que las muestras. Destilar el reactivo blanco y los estándares apropiados, cada uno diluido a 500 mL en la misma manera que las muestras. Diluir 300 mL de destilado más 50 mL de absorbente de ácido bórico a 500 mL con agua y tomar una porción de 50 mL para nesslerización.

3.7.5.4.4 Comparación visual: Comparar los colores producidos en la muestra contra los de estándares de amoníaco. Preparar estándares permanentes o temporales de la siguiente manera:

- 1) Estándares temporales - Preparar una serie de estándares visuales en tubos nessler agregando los siguientes volúmenes de solución de NH_4 estándar y diluyendo a 50 mL con agua: 0.2, 0.4, 0.7, 1.0, 1.4, 1.7, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 6.0 mL. Nesslerizar estándares y porciones de destilado agregando 1.0 mL de reactivo nessler a cada tubo y mezclándolo bien.
- 2) Estándares permanentes - Medir dentro de tubos nessler de 50 mL los volúmenes de soluciones de K_2PtCl_6 y CoCl_2 como se indica en el Cuadro 3.3, diluir hasta la marca y mezclar bien. Los valores dados en el cuadro son aproximados; equivalentes actuales de los estándares de amoníaco difieren con la calidad del reactivo nessler, el tipo de iluminación usado y la sensibilidad de color del ojo del analista. Por eso se debe comparar estándares de color con estándares de amoníaco temporal nesslerizados y modificar las tintas como sea necesario. Hacer dichas comparaciones para cada reactivo nessler recién preparado, y para satisfacer cada analista acerca de la capacidad de la igualdad de color.

Proteger los estándares del polvo para prolongar su utilidad por muchos meses. Comparar cada 10 a 30 minutos después de la nesslerización dependiendo del tiempo de reacción usado para preparar estándares de amoníaco nesslerizados contra los cuales fueron comparados.

3.7.5.5 Cálculo

- 3.7.5.5.1 Restar la cantidad de $\text{NH}_3\text{-N}$ en el agua usada para diluir la muestra original, antes de computar el valor final del nitrógeno.

3.7.5.5.2 Restar también el reactivo blanco para el volumen del amortiguador de borato y las soluciones 6N NaOH usadas con la muestra.

Valor en Nitrógeno Amoníaco	Volumen aproximado de la solución de Platino*	Volumen aproximado de la solución de Cobalto*
ug	ml	mL
0	1.2	0.0
2	2.8	0.1
4	4.7	0.1
7	5.9	0.2
10	7.7	0.5
14	9.9	1.1
17	11.4	1.7
20	12.7	2.2
25	15.0	3.3
30	17.3	4.5
35	19.0	5.7
40	19.7	7.1
45	19.9	8.7
50	20.0	10.4
60	20.0	15.0

*En tubos nessler iguales

Cuadro 3.3. Preparación de Estándares de Color Permanentes para la Determinación Visual de Nitrógeno Amoníaco.

3.7.5.5.3 Computar el NH₃-N por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{mg NH}_3\text{-N/L (51 mL volumen final)} = \frac{\text{A}}{\text{Volumen de la muestra, mL}} \times \frac{\text{B}}{\text{C}}$$

donde:

A = NH₃-N, ug (51 mL volumen final)

B = Volumen total del destilado colectado (incluyendo absorbente de ácido bórico, mL.

C = Volumen del destilado tomado para la nesslerización, mL.

La relación B/C se aplica solamente a muestras destiladas; ignorarla en nesslerización directa.

3.7.6 Método por Titulación

3.7.6.1 Discusión General

El método por titulación se usa solo para muestras que han pasado a través de destilación preliminar (ver Sección 3.7.4). Se selecciona el volumen de la muestra para el método de destilación y método por titulación en base a la concentración de nitrógeno amoníaco de la muestra:

Nitrógeno Amoníaco en la muestra mg/L	Volumen de la muestra mL
5 - 10	250
10 - 20	100
20 - 50	50.0
50 - 100	25.0

3.7.6.2 Aparatos

Aparato de Destilación: Ver la Sección 3.7.4.2.

3.7.6.3 Reactivos

Usar agua libre de amoníaco para hacer todos los reactivos y diluciones.

3.7.6.3.1 Solución de indicador mixto: Ver la Sección 3.7.4.3.7.

3.7.6.3.2 Solución de ácido bórico indicador: Ver la Sección 3.7.4.3.8

3.7.6.3.3 Titulante de ácido sulfúrico estándar, 0.02N: Diluir 200 mL 0.10N de ácido sulfúrico estándar a 1000 mL con agua destilada o desionizada. Estandarizar por medio de la titulación potenciométrica contra 15.00 mL de 0.05 N Na_2CO_3 , con unos 60 mL de agua, en un frasco a un pH cerca de 5. Sacar los electrodos, enjuagar en el mismo frasco y hervir suavemente por 3 a 5 minutos bajo una cubierta de vidrio de reloj. Enfriarlo a la temperatura ambiental, enjuagar la cubierta de vidrio en el frasco y terminar de titular al punto de inflexión de pH. Calcular la normalidad:

$$\text{Normalidad, N} = \frac{A}{53.00 \times C}$$

donde:

A = Na_2CO_3 pesado en un frasco de 1 L, g

B = Volumen de solución Na_2CO_3 tomado para la titulación, mL

C = Volumen de ácido usado, mL

Usar la normalidad medida en los cálculos ó ajustar a 0.10 N; 1 mL 0.10 N solución = 5.00 mg CaCO_3 . Para mayor exactitud estandarizar el titulante contra una cantidad de Na_2CO_3 que ha sido incorporada en la solución de ácido bórico indicadora para reproducir las condiciones actuales de titulación de las muestras; 1.00 mL = 280 ug N.

3.7.6.4. Procedimiento

3.7.6.4.1 Proceder de la manera que ha sido indicada en la Sección 3.7.4 usando una solución de ácido bórico indicadora como absorbente para el destilado.

3.7.6.4.2 Muestras de aguas negras, desechos de tratamiento biológico o sedimento: Rapidamente pesar a $\pm 1\%$ una cantidad de muestra húmeda equivalente a aproximadamente 1 g de peso seco en un frasco de pesado ó crisol. Lavar la muestra en un frasco Kjeldahl de 500 mL con agua y diluirla a 250 mL. Proceder como se indica la Sección 3.7.4 pero agregar un pedazo de parafina (cera) al frasco de destilación y coleccionar solo 100 mL de destilado.

3.7.6.4.3 Titular el amoníaco en el destilado con titulante 0.02N H_2SO_4 estándar hasta que el color se vuelva lila (lavanda) pálido.

3.7.6.4.4 Blanco: Llevar un blanco a través de todos los pasos del procedimiento y aplicar la corrección necesaria a los resultados.

3.7.6.5 Cálculo

3.7.6.5.1 Muestras líquidas:

$$\text{mg NH}_3\text{-N/L} = \frac{(A - B) \times 280}{\text{Volumen de muestra, mL}}$$

3.7.6.5.2 Muestras de aguas negras o sedimento:

$$\text{mg NH}_3\text{-N/Kg} = \frac{(A - B) \times 280}{\text{Peso de muestra seca, g}}$$

donde:

A = Volumen de H_2SO_4 titulado para la muestra, mL

B = Volumen de H_2SO_4 titulado para el blanco, mL

Figura 3.6.

Hoja de Laboratorio
Para Análisis
de Nitrógeno (Amoníaco)

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
DE LA CUENCA GUACERIQUE
PLAN MAESTRO-DEPTO DE LIMNOLOGIA-SANAA

METODO DE NESSLERIZACION

SITIOS	Conc. de $\text{NH}_3\text{-N}$ en agua usada para dilución de muestra, mL	Conc. de reactivo blanco	Vol. total de destilado colectado, mL	Vol. de destilado usado para nesslerización	Concentración, mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

METODO POR TITULACION

SITIOS	Vol. de H_2SO_4 titulado para la muestra, mL	Vol. de H_2SO_4 titulado para el blanco, mL	Vol. de la muestra, mL	Concentración, mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

FECHA DE MUESTREO: _____ NOMBRE DEL TECNICO DE LABORATORIO: _____
FECHA DE ANALISIS: _____

3.8 Nitrógeno (Nitrato)

3.8.1 Selección de Método

Determinación de nitrato (NO_3^-) es difícil porque se requieren procedimientos relativamente complejos debido a la alta probabilidad de que hay constituyentes interferentes presente y por los rangos limitados de concentración de los distintos métodos.

El método de ácido cromotrópico es aplicable para concentraciones de 0.1 a 5.0 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$. Para concentraciones mayores de $\text{NO}_3\text{-N}$, diluir al rango del método de ácido cromotrópico ó usar el método de reducción de la aleación de Devarda para "nitrogeno total oxidado" ($\text{NO}_3\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N}$).

3.8.2 Almacenamiento de muestras

Comenzar las determinaciones de NO_3^- pronto después de recolectar las muestras. Si se necesita almacenarlas, preservar las muestras con 40 mg HgCl_2/L (1 mL saturado HgCl_2/L) y almacenar a 4°C o congelar a -20°C .

3.8.3 Método de Acido Cromotrópico

3.8.3.1 Discusión General

3.8.3.1.1 Principio: Dos moles de NO_3^- reacciona con un mol de ácido cromotrópico para formar un producto de reacción amarillo con una absorbancia máxima a 410 nm. El color máximo desarrolla dentro de 10 minutos y se mantiene estable por 24 horas. Un baño de enfriamiento dispensa suficiente calor para prevenir que hiervan las soluciones; por esta razón, la temperatura del baño de enfriamiento puede variar entre 10 a 20°C sin afectar seriamente los resultados. Se recomienda este método para el rango de concentraciones de 0.1 a 5.0 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$.

3.8.3.1.2 Interferencias: El cloro residual, algunos oxidantes, y NO_2^- producen colores amarillos con el ácido cromotrópico. Se elimina la interferencia del cloro residual y los agentes de oxidación agregando sulfito. Agregando urea convierte el NO_2^- a gas N_2 . La antimonio se enmascara efectivamente hasta 2000 mg Cl^-/L , y este nivel de tolerancia puede ser subido a 4000 mg/L duplicando la concentración del reactivo de antimonio específico. El color amarillo del complejo de cloroferrato (III) en cantidades hasta 40 mg Fe (III)/L se descarga agregando antimonio. Los iones Ba^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , I^- , IO_3^- , selenita y selenata son incompatibles con el sistema y forman precipitados. Sin embargo, su ocurrencia en cantidades significativas es improbable en la mayoría de las muestras. Concentraciones del ion Cr^{3+} que exceden 20 mg/L contribuyen a un color interferente.

3.8.3.1.3 Concentración mínima detectable: 50 ug $\text{NO}_3\text{-N/L}$.

3.8.3.2 Aparatos

Equipo colorimétrico: Se requiere uno de los siguientes:

- 3.8.3.2.1 Espectrofotómetro, para uso en 410 nm, que proporcione un camino de luz de 1 cm ó más.
- 3.8.3.2.2 Fotómetro de filtro que proporcione un camino de luz de 1 cm ó más y equipado con un filtro violado que tenga transmitancia máxima en aproximadamente 410 nm.
- 3.8.3.3 Reactivos
 - 3.8.3.3.1 Agua libre de nitratos: Usar agua redestilada o destilada y desionizada de la máxima pureza posible para preparar todas las soluciones y diluciones.
 - 3.8.3.3.2 Solución de nitrato existente: Secar nitrato de potasio (KNO_3) en un horno a 105°C por 24 horas. Disolver 0.7218 g en agua y diluir a 1000 mL. Preservar con 2 mL de CHCl_3/L ; 1.00 mL = 100 $\mu\text{g NO}_3^-$ -N. Esta solución se mantiene estable por lo menos 6 meses.
 - 3.8.3.3.3 Solución de nitrato estándar: Diluir 50.0 mL de solución de nitrato existente a 500 mL con agua, 1.00 mL = 10.0 $\mu\text{g NO}_3^-$ -N.
 - 3.8.3.3.4 Reactivo de sulfito-urea: Disolver 5 g de urea y 4 g de Na_2SO_3 anhidro en agua y diluir a 100 mL.
 - 3.8.3.3.5 Reactivo de antimonia: Calentar 500 mg de Sb metal en 80 mL de H_2SO_4 concentrado hasta que se disuelva todo el metal. Enfriar y cuidadosamente agregar a 20 mL agua helada. Si se forman cristales después de dejarlo toda la noche, redissolver calentándolo.
 - 3.8.3.3.6 Reactivo de ácido cromotrópico: Purificar el ácido cromotrópico (ácido disulfónico naftalino 4,5-dihidroxi 2,7) como se describe a continuación: Hervir 125 mL de agua en un frasco y agregar gradualmente 15 g de sal disodio de ácido disulfónico naftalino 4,5-dihidroxi 2,7, revolviéndolo constantemente. Agregar 5 g de carbón activado para decolorar. Hervir la mezcla por unos 10 minutos. Agregar agua para reponer el agua perdida debido a la evaporación. Filtrar la solución caliente a través de lana algodón. Agregar 5 g de carbón activado al filtrado y hervir por 10 minutos más. Filtrar primeramente a través de lana algodón y luego a través de papel de filtro para remover completamente el carbón. Enfriar y lentamente agregar 10 mL de H_2SO_4 concentrado y libre de nitratos. Hervir la solución hasta que queden aproximadamente 100 mL en el frasco. Dejarlo toda la noche. Transferir los cristales de ácido cromotrópico a un embudo Buchner y lavar completamente con alcohol etílico al 95% hasta que los cristales estén blancos. Secar cristales a 80°C .

Disolver 100 mg de ácido cromotrópico purificado en 100 mL de H_2SO_4 concentrado y almacenar en una botella de color café. Preparar cada 2 semanas. Una solución de reactivo incolora significa la ausencia de contaminación de NO_3^- de parte del H_2SO_4 .

3.8.3.3.7 Acido sulfúrico, H₂SO₄, concentrado, libre de nitratos.

3.8.3.4 Procedimiento

3.8.3.4.1 Preparación de estándares de nitrato: Preparar estándares de NO₃ en el rango de 0.10 a 5.0 mg N/L diluyendo 0, 1.0, 5.0, 10, 25, 40 y 50 mL de solución estándar de NO₃ a 100 mL con agua.

3.8.3.4.2 Desarrollo de color: Si cantidades apreciables de materia en suspensión están presentes en la muestra, removerla centrifugando o filtrando, succionar con pipeta porciones de 2.0 mL de estándares, muestras, y un blanco de agua a frascos volumétricos secos de 10 mL. Usar diluciones de los estándares y las muestras en el rango de 0.1 a 5.0 mg NO₃-N/L. Agregar 1 gota de reactivo de sulfito-urea a cada frasco. Colocar los frascos en un baño de agua fría (10 a 20°C) y agregar 2 mL de reactivo de Sb (antimonio). Remolinar los frascos durante la adición de cada reactivo. Después de unos 4 minutos en el baño, agregar 1 mL de reactivo de ácido cromotrópico, remolinar y dejarlo en el baño de enfriamiento por 3 minutos. Agregar H₂SO₄ concentrado para acercar el volumen alrededor de la marca de 10 mL. Tapar los frascos y mezclar invirtiendo cada frasco cuatro veces. Dejarlo por 45 minutos a la temperatura ambiental y ajustar al volumen a 10 mL con H₂SO₄ concentrado. Ejecutar la mezcla final muy suavemente para evitar introducir burbujas de aire. Leer la absorbancia a 410 nm entre 15 minutos y 24 horas después del último ajuste de volumen. Usar agua libre de nitratos en la célula de referencia del espectrofotómetro. Enjuagar la célula de la muestra con la solución de muestra, y luego llenar cuidadosamente sosteniendo la célula a una inclinación y derramando la solución lentamente en un lado de la célula para evitar la formación de burbujas.

3.8.3.5 Cálculo

$$\text{mg NO}_3\text{-N/L} = \frac{\text{ug NO}_3\text{-N (en volumen final de 10 mL)}}{\text{Volumen de la muestra, mL}}$$

3.8.4 Método de Reducción de la Aleación de Devarda

3.8.4.1 Discusión General

3.8.4.1.1 Principio: Se recomienda este método para concentraciones de N oxidado (NO₃-N+NO₂-N) mayores de 2 mg/L. Es particularmente conveniente cuando se ha hecho una determinación de amoníaco usando el paso de destilación preliminar (Sección 3.7.4). En este procedimiento NO₃ y NO₂ son reducidos a NH₃ bajo condiciones alcalinas de calor en la presencia del agente de reducción, la aleación de Devarda (una aleación de 50% Cu, 45% Al y 5% Zn). La reducción se lleva a cabo en un aparato de destilación Kjeldahl. Bajo condiciones alcalinas de calor, el NH₃ que se forma se destila y se colecta en un frasco receptor que contiene ácido bórico (Sección 3.7.4). El NH₃ puede ser determinado por nesslerización directa (Sección 3.7.5.4) o acidimetricamente (Sección 3.7.6.4).

- 3.8.4.1.2 Interferencias: Remover el amoníaco de la muestra a través de la destilación preliminar como se describe en las Secciones 3.7.4.4.2 -3,7.4.4.4, si no se determina NH_3 en la misma porción de muestra. Nitrito también se reduce a NH_3 bajo las condiciones de la prueba. Si no se hace una determinación de NO_2^- por separado, reportar los resultados como "nitrógeno total oxidado". No se recomienda el método para niveles menores de 2 mg/L. A este nivel, particularmente en la presencia de concentraciones altas de nitrógeno amino, usar por lo menos 50 mL y preferiblemente 100 mL de muestra debido a la posibilidad de interferencia positiva por descomposición de esta materia nitrogenada.
- 3.8.4.2 Aparatos
- 3.8.4.2.1 Aparato de destilación: Frasco Kjeldahl de vidrio de 800 mL, con un condensador y adaptor arreglado de tal forma que el destilado pueda colectarse en la solución de ácido bórico. Para muestras más pequeñas, también se puede usar una unidad microkjeldahl de destilación de vapor.
- 3.8.4.2.2 Cuchara de medida: Diseñada para contener 1 g de aleación de Devarda.
- 3.8.4.2.3 Equipo colorimétrico: Ver Sección 3.7.5.2.1.
- 3.8.4.3 Reactivos
- 3.8.4.3.1 Agua libre de amoníaco: Ver Sección 3.7.4.3.1.
- 3.8.4.3.2 Solución amortiguadora de borato: Ver Sección 3.7.4.3.2.
- 3.8.4.3.3 Hidróxido de sodio, NaOH, 6N.
- 3.8.4.3.4 Aleación de Devarda: De luz de malla de 20 ó más pequeña que contenga menos de 0.005% N.
- 3.8.4.3.5 Para titulaciones acidimétricas: Todos los reactivos alistados en la Sección 3.7.6.3.
- 3.8.4.3.6 Para nesslerización: Todos los reactivos alistados en las Secciones 3.7.5.3.3 - 3.7.5.3.5.
- 3.8.4.4 Procedimiento
- 3.8.4.4.1 Si no se eliminó el NH_3 por un método de la destilación preliminar diluir una porción de muestra a 500 mL con agua libre de amoníaco. Agregar 25 mL de amortiguadora de borato y ajustar a un pH de 9.5 con 6N NaOH usando un pH metro o papel de pH de corto rango. Destilar 250 a 300 mL a un frasco receptor seco y descartar. Asegurar que se realice la última parte de la destilación con el punto del condensador fuera del líquido en el frasco receptor.
- 3.8.4.4.2 Al residuo después de remover el NH_3 (descrito en el párrafo anterior) agregar 1 g de aleación de Devarda y suficiente agua destilada libre de amoníaco para acercar el volumen total a unos 350 mL.

Meter 50 mL de absorbente de H_3BO_3 en un frasco receptor para cada mg de $NO_3^- - N$ en la muestra. Sumergir el punto de condensor en el absorbente.

Calentar el frasco de destilación hasta que hierva o burbujee vigorosamente. Bajar el calor y destilar a una tasa de 5 a 10 mL/minuto hasta que se haya recolectado por lo menos 150 mL de destilado. Bajar el receptor para que el líquido esté abajo del punto del condensor y continuar la destilación por 1 a 2 minutos para limpiar el condensor.

Determinar el NH_3-N por el método de nesslerización (Sección 3.7.5) ó por el de titulación con un ácido fuerte estándar (Sección 3.7.6).

3.8.4.5

Cálculo

Calcular NH_3-H como en la Sección 3.7.5.5 ó 3.7.6.5. Este valor representa el NH_3 producido de la oxidación de NO_2^- y NO_3^- (nitrógeno total oxidado). Para obtener el NO_3^- , determinar por separado el NO_2^- y restar los resultados.

Figura 3.7.

Hoja de Laboratorio
Para Análisis
de Nitrógeno (Nitrato)

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
DE LA CUENCA GUACERIQUE
PLAN MAESTRO-DEPTO DE LIMNOLOGIA-SANAA

METODO DE ACIDO CROMOTROPICO

SITIOS	Volumen de la Muestra, mL	Absorbancia a 410 nm	Nitrógeno (nitrato) mg/L
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

METODO DE ALEACION DE DEVARDA - NESSLERIZACION

SITIOS	Conc. de NH_4-N en agua usada para dilución de muestra	Concentración de reactivo blanco	Volumen total de destilado colectado mL	Volumen de destilado usado para nesslerización, mL	Nitrógeno total oxidado, mL
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

METODO DE ALEACION DE DEVARDA - TITULACION

SITIOS	Vol. de H_2SO_4 titulado para muestra, mL	Volumen de H_2SO_4 titulado para blanco, mL	Volumen de la muestra, mL	Nitrógeno (total oxidado), mg/L
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

NOMBRE DEL TECNICO _____
DE LABORATORIO : _____
FECHA DE MUESTREO : _____
FECHA DE ANALISIS : _____

Oxígeno Disuelto

Todos los organismos vivos dependen del oxígeno en una forma u otra para mantener los procesos metabólicos que producen energía para el crecimiento y la reproducción. Los procesos aeróbicos son sujetos de gran interés por su necesidad de oxígeno libre.

Todos los gases de la atmósfera son solubles en agua en algún grado. Tanto el nitrógeno como el oxígeno están clasificados como poco solubles, y como no reaccionan con el agua químicamente, su solubilidad es directamente proporcional a sus presiones parciales.

La Figura 3.8 muestra curvas de solubilidad para los dos gases en agua destilada o de bajo contenido de sólidos en equilibrio con el aire a 760 mm de presión. La solubilidad es menor en las aguas salinas. Se notará que bajo las condiciones de presión parcial que existen en la atmósfera, se disuelve más nitrógeno que oxígeno en el agua. En el momento de saturación, los gases disueltos contienen alrededor de 38% de oxígeno, o casi el doble de oxígeno que contiene la atmósfera normalmente.

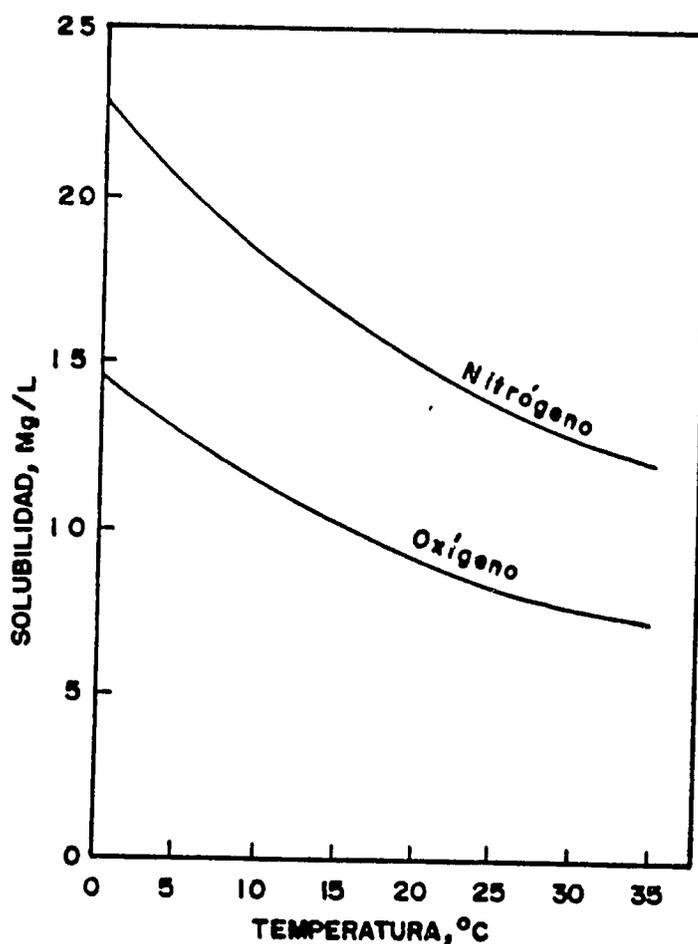


Figura 3.8. Solubilidad del Oxígeno y Nitrógeno en Agua Destilada Saturada con Aire a 760 mm Hg.

La solubilidad del oxígeno atmosférico en las aguas dulces varía de 14.6 mg/L a 0°C a cerca de 7 mg/L a 35°C, bajo una atmósfera de presión. Como es un gas pobremente soluble, en solución su concentración varía directamente con la presión atmosférica a cualquier temperatura dada. Esta es una consideración importante en altitudes altas. Debido a que la oxidación biológica se incrementa con la temperatura, y por consiguiente se incrementa la demanda de oxígeno, las condiciones de temperatura alta, donde el oxígeno disuelto es menos soluble, son de gran interés. La mayoría de las condiciones críticas relacionadas con la deficiencia de oxígeno disuelto en el medio, ocurre durante los meses de verano cuando las temperaturas son altas y la solubilidad de oxígeno está al mínimo. Por esta razón se acostumbra pensar en los niveles de oxígeno disuelto alrededor de 8 mg/L como que fueran lo máximo disponible bajo condiciones críticas.

La baja solubilidad del oxígeno es el mayor factor que limita la capacidad de purificación de las aguas naturales y necesita el tratamiento de los desperdicios para remover la materia de contaminación antes de ser descargada a las corrientes recipientes. En los procesos de tratamiento aeróbicos biológicos, la solubilidad limitada del oxígeno es de gran importancia debido a que ésta controla el grado en que el oxígeno será absorbido por el medio y por consiguiente el costo de la aireación.

En desperdicios líquidos, el oxígeno disuelto es el factor que determina si los cambios biológicos se deben a organismos aeróbicos o anaeróbicos. Los primeros usan el oxígeno libre para la oxidación de materia orgánica e inorgánica y producen productos finales inocuos, mientras que los últimos llevan a cabo esa oxidación a través de la reducción de ciertas sales inorgánicas tales como sulfatos y los productos finales a menudo son muy mal olientes. Como los dos tipos de organismos están presentes en la naturaleza, es altamente importante que las condiciones favorables a los organismos aeróbicos se mantengan (condiciones aeróbicas): de otra manera los organismos anaeróbicos tomarían posesión y se desarrollarían condiciones molestas. Por eso las mediciones de oxígeno disuelto son vitales para mantener las condiciones aeróbicas en las aguas naturales que reciben materia contaminante y en los procesos de tratamiento aeróbico intencionados para purificar las aguas negras domésticas e industriales.

Las determinaciones de oxígeno disuelto se usan para una variedad de otros propósitos. Es una de las pruebas individuales más importantes que el ingeniero ambiental utiliza. En la mayoría de las instancias que involucran el control de contaminación de corrientes, es deseable mantener condiciones favorables al crecimiento y reproducción de una población normal de peces y otros organismos acuáticos. Esta condición requiere el mantenimiento de niveles de oxígeno disuelto que mantendrán la vida acuática deseable en una condición sana todo el tiempo. Las determinaciones de oxígeno disuelto sirven como la base de la prueba de DBO, y por tanto son la base de la determinación más importante usada para evaluar la concentración de contaminación de desperdicios domésti-

cos e industriales. La oxidación bioquímica puede ser medida determinando oxígeno disuelto residual en un sistema en varios intervalos de tiempo.

Todos los procesos de tratamiento aeróbico dependen de la presencia de oxígeno disuelto, y las pruebas para oxígeno son indispensables como un medio de controlar la tasa de aireación para asegurarse que las cantidades adecuadas de aire son suplidas para mantener las condiciones aeróbicas y también para prevenir el uso excesivo del aire.

El oxígeno es un factor significativo en la corrosión del hierro y el acero particularmente en los sistemas de distribución de agua y en calderas de vapor. La eliminación del oxígeno de las aguas alimentadas de calderas por medios físicos y químicos es una práctica común en la industria eléctrica. La prueba de oxígeno disuelto sirve como el medio de control.

3.9.1

Método de Análisis y Cálculo

El método de análisis será elaborado cuando el equipo pedido para este programa de monitoreo llegue y se pruebe en el campo.

3.10

Sulfato

El ion sulfato es uno de los aniones más comunes que se encuentran en aguas naturales (ver la Figura 3.9). Sulfato es muy importante en relación al suministro público del agua potable, debido a su efecto catártico a humanos, si está presente en cantidades altas. Además, los sulfatos producen escamas duras en calentadores de agua y calderas. Hay bastante preocupación sobre sulfatos porque ellos son responsables (indirectamente) por dos problemas graves en el procesamiento y tratamiento de aguas negras. Problemas de mal olor y corrosión resultan por la reducción de sulfatos a sulfuro de hidrógeno, bajo las condiciones aneróbicas. En la ausencia de oxígeno disuelto y de nitratos, los sulfatos sirven como una fuente de oxígeno para oxidaciones bioquímicas producidas por bacterias aneróbicas. Bajo condiciones aneróbicas, el ion sulfato se reduce al ion sulfuro, el cual mantiene un equilibrio con el ion hidrógeno y forma sulfuro de hidrógeno. Esta situación crea un problema grave de olor desagradable, si se está produciendo cantidades significantes del ion sulfuro. En lugares de temperaturas relativamente altas (como Honduras), donde las aguas negras son retenidas por tiempos prolongados, y donde existen suficientes concentraciones de sulfatos, la corrosión de la alcantarilla es un problema serio. El problema está asociado con la reducción de sulfatos a sulfuro de hidrógeno, la cual es responsable indirectamente por la corrosión de las cimas de las alcantarillas.

3.10.1 Selección de Método

Los métodos gravimétricos son convenientes para concentraciones de SO_4^{2-} mayores de 10 mg/L; usar uno de estos métodos para resultados exactos. El método turbidimétrico es aplicable en el rango de 1 a 40 SO_4^{2-} /L.

3.10.2 Muestreo y Almacenamiento

En la presencia de materia orgánica ciertas bacterias pueden reducir SO_4^{2-} a S^{2-} . Para evitar eso, almacenar muestras, fuertemente contaminadas a 4°C.

3.10.3 Método Gravimétrico de Encender el Residuo

3.10.3.1 Discusión General

3.10.3.1.1 Principio: Se precipita el sulfato en una solución de ácido clorhídrico (HCl) como sulfato de bario (BaSO_4) al agregar cloruro de bario (BaCl_2).

La precipitación se lleva a cabo a una temperatura cerca del punto de ebullición y después de un período de digestión el precipitado, es filtrado, lavado con agua hasta que esté libre de Cl^- , encendido o secado, y pesado como BaSO_4 .

3.10.3.1.2 Interferencias: La determinación gravimétrica de SO_4^{2-} es sujeto a muchos errores, tanto positivos como negativos. En agua pota-

ble en la cual la concentración de minerales es baja, éstos pueden ser de poca importancia.

1) Interferencias que producen resultados altos-materia en suspensión, sílice, precipitante de $BaCl_2$, NO_3^- , SO_3^{2-} y licor madre ocluido en el precipitado son los factores principales en los errores positivos. Materia en suspensión puede estar presente en la muestra y en la solución de precipitación; silica soluble puede ser convertido en insoluble y SO_3^{2-} puede ser oxidado a SO_4^{2-} durante el análisis. Nitrato de bario ($Ba(NO_3)_2$), $BaCl_2$, y agua son ocluidos parcialmente con el $BaSO_4$ aunque el agua es eliminado si la temperatura de encendido es suficiente alta.

2) Interferencias que producen resultados bajos.- sulfatos de metales alcalinos frecuentemente producen resultados bajos, particularmente los sulfatos de hidrógeno alcalino. La oclusión de sulfato alcalino con $BaSO_4$ causa una substitución de un elemento de peso atómico menor que el bario en el precipitado. Sulfatos de hidrógeno de metales alcalinos se portan en forma similar y, además se descomponen al calentarse. Metales pesados, como cromo y hierro, causan resultados bajos interfiriendo con la precipitación completa de SO_4^{2-} y formando sulfatos de metales pesados. $BaSO_4$ tiene una solubilidad pequeña pero significativa, la cual se aumenta en la presencia de un ácido. Aunque un medio ácido es necesario para prevenir la precipitación de carbonato de bario y fosfato, es importante limitar su concentración para minimizar su efecto de solución.

3.10.3.2 Aparatos

3.10.3.2.1 Baño de vapor.

3.10.3.2.2 Horno para secar, equipado con un control termostático.

3.10.3.2.3 Horno de mufla, con indicador de temperatura.

3.10.3.2.4 Desecador.

3.10.3.2.5 Balanza analítico, con capacidad de pesar a 0.1 mg.

3.10.3.2.6 Filtro: Usar uno de los siguientes:

1) Papel de filtro, lavado con ácido, de superficie dura, sin ceniza, suficientemente retentivo para precipitados finos.

2) Filtro de membrana, con un tamaño de poro de aproximadamente 0.45 μm .

3.10.3.2.7 Aparato de filtración, apropiado al tipo de filtro seleccionado. (Revestir la base del filtro de membrana con un fluido de silicón para prevenir que el precipitado adhera).

- 3.10.3.3 Reactivos
- 3.10.3.3.1 Solución indicador rojo de metilo: Disolver 100 mg de rojo de metilo, sal de sodio en agua destilada y diluir a 100 mL.
- 3.10.3.3.2 Acido clorhídrico, HCl, 1 + 1.
- 3.10.3.3.3 Solución de cloruro de bario: Disolver 100 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada. Filtrar a través del filtro de membrana o papel de filtro de superficie dura antes de usar; 1 mL es suficiente para precipitar aproximadamente 40 mg SO_4^{2-} .
- 3.10.3.3.4 Reactivo de ácido nitrato-nitrito de plata: Disolver 8.5 g AgNO_3 y 0.5 mL de HNO_3 concentrado en 500 mL de agua destilada.
- 3.10.3.3.5 Fluído de silicón: Se conoce como "Desicote" (Beckman) o equivalente.
- 3.10.3.4 Procedimiento
- 3.10.3.4.1 Eliminación de silicón: Si la concentración del silicón excede 25 mg/L, evaporar la muestra hasta casi sequedad en un plato de platino en un baño de vapor. Agregar 1 mL HCl, inclinar y girar el plato hasta que el ácido se haga contacto completo con el residuo. Continuar la evaporación hasta que se seque. Terminar el secar en un horno a 180°C y si hay materia orgánica presente, carbonizar sobre la llama de un quemador. Mojar el residuo con 2 mL de agua destilada y 1 mL de HCl, y evaporar hasta sequedad en un baño de vapor. Agregar 2 mL de HCl, recoger el residuo soluble en agua caliente, y filtrar. Lavar el silicón insoluble con algunas porciones pequeñas de agua destilada caliente. Combinar el filtrado y los lavados. Descartar el residuo.
- 3.10.3.4.2 Precipitación del sulfato de bario: Ajustar el volumen de la muestra clarificada para que contenga aproximadamente 50 mg SO_4^{2-} en un volumen de 250 mL. Se puede tolerar concentraciones bajas de SO_4^{2-} si es impracticable concentrar la muestra al nivel óptimo, pero en tales casos limitar el volumen total a 150 mL. Ajustar el pH con HCl a un pH de 4.5 a 5.0, usando un pH metro ó el color anaranjado del indicador rojo de metilo. Agregar 1 a 2 mL HCl. Calentar hasta que hierva y, mientras se revuelve suavemente, agregar lentamente la solución de BaCl_2 , tibia, hasta que la precipitación parece ser completa; luego agregar unos 2 mL más de la solución. Si la cantidad del precipitado es pequeña, agregar un total de 5 mL de solución de BaCl_2 . Digerir el precipitado a 80 a 90°C, preferiblemente durante toda la noche pero durante no menos de 2 horas.
- 3.10.3.4.3 Filtración y pesado: Mezclar una cantidad pequeña de pulpa de papel de filtro sin ceniza con el BaSO_4 , transferir cuantitativamente a un filtro, y filtrarlo a la temperatura ambiental. La pulpa ayuda la filtración y disminuye la tendencia de que el precipitado se disperse. Lavar el precipitado con porciones pequeñas de agua destilada tibia hasta que los lavados estén libres de Cl^- co

mo se indica a través de la prueba con el reactivo $\text{AgNO}_3\text{-HNO}_3$. Colocar el filtro y el precipitado en un crisol de platino y encenderlo a 800°C por 1 hora. No permitir que el papel de filtro se queme con la llama. Enfriar en el desecador y pesar.

3.10.3.5 Cálculo

$$\text{mg SO}_4^{2-}/\text{L} = \frac{\text{mg BaSO}_4 \times 411.6}{\text{Volumen de la muestra, mL}}$$

3.10.4 Método Gravimétrico de Secar el Residuo

3.10.4.1 Discusión General

Ver la Sección 3.10.3.1.

3.10.4.2 Aparatos

Con la excepción del papel de filtro se requieren todos los aparatos descritos en la Sección 3.10.3.2, más los siguientes:

3.10.4.2.1 Filtros: Usar uno de los siguientes:

1) Filtro de vidrio esmerilado de porosidad fina, con un tamaño máximo de poro de 5 μm .

2) Filtro de membrana, con un tamaño de poro de unos 0.45 μm .

3.10.4.2.2 Horno al vacío.

3.10.4.2.3 Reactivos

Se requieren todos los reactivos alistados en la Sección 3.10.3.3.

3.10.4.4 Procedimiento

3.10.4.4.1 Eliminación de la interferencia: Ver la Sección 3.10.3.4.1.

3.10.4.4.2 Precipitación de sulfato de bario: Ver la Sección 3.10.3.4.2.

3.10.4.4.3 Preparación de filtros:

1) Filtro de vidrio esmerilado. Secar hasta que tenga un peso constante* en un horno mantenido a 105°C ó más caliente, enfriar en un desecador, y pesar.

2) Filtro de membrana. Colocar el filtro en un papel de filtro ó un vidrio de reloj y secar hasta que tenga un peso constante*

* Se define peso constante como un cambio de no más que 0.5 mg en dos operaciones sucesivas que consisten en calentar, enfriar en un desecador, y pesar.

en un horno al vacío a 80°C, mientras se mantiene un vacío de por lo menos 85 kilopascales ó en un horno convencional a una temperatura de 103 a 105°C. Enfriar en un desecador y pesar solamente la membrana.

3.10.4.4.4 Filtración y pesado: Filtrar el BaSO₄ a temperatura ambiental. Lavar el precipitado con algunas porciones pequeñas de agua destilada tibia hasta que los lavados estén libres de Cl⁻ como se indica a través de la prueba con el reactivo AgNO₃-HNO₃. Si se usa un filtro de membrana agregar algunas gotas del fluido de silicón a la suspensión antes de filtrar para prevenir que el precipitado adhiera a la base. Secar el filtro y precipitar a través del mismo procedimiento que se usó para preparar el filtro. Enfriar en un desecador y pesar.

3.10.4.5 Cálculo

$$\text{mg/SO}_4^{2-} / \text{L} = \frac{\text{mg BaSO}_4 \times 411.6}{\text{Volumen de la muestra, mL}}$$

3.10.5 Método Turbidimétrico

3.10.5.1 Discusión General

3.10.5.1.1 Principio: El ion sulfato (SO₄²⁻) se precipita en un medio de ácido acético con cloruro de bario (BaCl₂) para formar cristales de sulfato de bario (BaSO₄) de tamaño uniforme. Se mide la absorbancia de luz de la suspensión de BaSO₄ con un fotómetro y se determina la concentración de SO₄²⁻ comparando la lectura con una curva estándar.

3.10.5.1.2 Interferencias: Color o materia en suspensión en grandes cantidades interfieren. Con tal que éstos estén bajos en comparación con la concentración de SO₄²⁻, corregir por la interferencia como se indica en la Sección 3.10.5.4.4.

El silicón en exceso de 500 mg/L interfiere. Puede que no sea posible precipitar adecuadamente el BaSO₄ en aguas que contengan grandes cantidades de materia orgánica.

En agua potable no existen otros iones además de SO₄²⁻ que puedan formar compuestos insolubles con el bario bajo condiciones fuertemente ácidas. Realizar las determinaciones a temperatura ambiental; variaciones de un rango de 10°C no producen errores apreciables.

3.10.5.1.3 Concentración mínima detectable: Aproximadamente 1 mg SO₄²⁻/L.

3.10.5.2 Aparatos

3.10.5.2.1 Agitador magnético: Usar una velocidad constante de agitación. Es conveniente fijar una resistencia en serie con el motor que opera

el agitador magnético para regular la velocidad de agitación. La velocidad exacta de agitación no es crítica, pero tiene que ser constante para cada juego de muestras y estándares, y no debe causar salpicaduras.

3.10.5.2.2 Fotómetro: Se requiere uno de los siguientes:

- 1) Nefelómetro.
- 2) Espectrofotómetro, para uso en 420 nm y que proporcione un camino de luz de 2.5 a 10 cm.
- 3) Fotómetro de filtro, equipado con un filtro violado que tenga transmisión máxima en aproximadamente 420 nm y que proporcione un camino de luz de 2.5 a 10 cm.

3.10.5.2.3 Cronómetro o contador de tiempo.

3.10.5.2.4 Cuchara de medida, con capacidad de 0.2 a 0.3 mL.

3.10.5.3 Reactivos

3.10.5.3.1 Solución amortiguadora A: Disolver 30 g de cloruro de magnesio, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g de acetato de sodio, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, 1.0 g de nitrato de potasio, KNO_3 , y 20 mL de ácido acético, CH_3COOH (al 99%), en 500 mL de agua destilada y llevar a 1000 mL.

3.10.5.3.2 Solución amortiguadora B (requerida cuando la concentración de SO_4^{2-} de la muestra sea menor de 10 mg/L): Disolver 30 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, 1.0 g KNO_3 , 0.111 g de sulfato de sodio, Na_2SO_4 , y 20 mL de ácido acético (al 99%), en 500 mL de agua destilada y llevar a 1000 mL.

3.10.5.3.3 Cristales de cloruro de bario, $BaCl_2$ de luz de malla de 20 a 30: En la estandarización se produce una turbidez uniforme con este rango de luz de malla y la solución amortiguadora apropiada.

3.10.5.3.4 Solución de sulfato estándar: Preparar una de las dos siguientes soluciones; 1.00 mL = 100 μg SO_4^{2-} .

- 1) Diluir 10.4 mL de titulante estándar de 0.02 N H_2SO_4 , descrito en la Sección 3.1.3.3, a 100 mL con agua destilada.
- 2) Disolver 0.1479 g de Na_2SO_4 anhidro en agua destilada y diluir a 1000 mL.

3.10.5.4 Procedimiento

3.10.5.4.1 Formación de la turbidez del sulfato de bario: Medir 100 mL de la muestra o una porción conveniente diluida 100 mL, en un frasco erlenmeyer de 250 mL. Agregar 20 mL de solución amortiguadora y mezclar en el aparato de agitación. Mientras se agita, agregar una cucharada de cristales de $BaCl_2$ y comenzar a medir el tiempo inmediatamente. Agitar por 60 ± 2 segundos a una velocidad constante.

- 3.10.5.4.2 Medición de la turbidez del sulfato de bario: Después que termine el período de agitación, derramar la solución en la célula de absorción del fotómetro y medir la turbidez a 5 ± 0.5 minutos.
- 3.10.5.4.3 Preparación de la curva de calibración: Estimar la concentración de SO_4^{2-} en la muestra comparando la lectura de turbidez con una curva de calibración que se prepara llevando los estándares de SO_4^{2-} a través de todo el procedimiento. Hacer los estándares en el rango de 0 a 40 mg SO_4^{2-} /L, en incrementos de 5 mg/L. La exactitud disminuye arriba de 40 mg/L y las suspensiones de BaSO_4 pierden estabilidad. Comprobar la confiabilidad de la curva de calibración probando un estándar después de cada tres o cuatro muestras.
- 3.10.5.4.4 Corrección para el color y la turbidez de la muestra: Corregir para el color y la turbidez de la muestra probando blancos a los cuales no se agrega BaCl_2 .

3.10.5.5 Cálculo

$$\text{mg SO}_4^{2-}/\text{L} = \frac{\text{mg SO}_4^{2-} \times 1000}{\text{Volumen de la muestra, ml}}$$

Si se usa la solución amortiguadora A, determinar la concentración de SO_4^{2-} directamente de la curva de calibración después de restar la absorbancia de la muestra antes de agregar el BaCl_2 . Si se usa la solución amortiguadora B, restar la concentración de SO_4^{2-} del blanco de la concentración de SO_4^{2-} aparente que se determinó usando el procedimiento descrito arriba; debido a que la curva de calibración no es una línea recta, este paso no es equivalente a restar la absorbancia del blanco de la absorbancia de la muestra.

Figura 3.10.

Hoja de Laboratorio
Para Análisis
de Sulfato

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
DE LA CUENCA GUACERIQUE
PLAN MAESTRO-DEPTO DE LIMNOLOGIA-SANAA

METODO GRAVIMETRICO DE ENCENDER EL RESIDUO

SITIOS	Volumen de la muestra, mL	Peso del crisol, g	Peso del crisol + residuo, g	concentración, mg SO ₄ ²⁻ /L
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

METODO GRAVIMETRICO DE SECAR AL RESIDUO

SITIOS	Volumen de la muestra, mL	Peso del filtro, g	Peso del filtro + residuo, g	Concentración, mg SO ₄ ²⁻ /L
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

METODO TURBIDIMETRICO

SITIOS	Volumen de la muestra, mL	absorbancia (turbidez)		Concentración, mg SO ₄ ²⁻ /L
		con BaCl ₂	sin BaCl ₂	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
BLANCO				

NOMBRE DEL TECNICO _____
DE LABORATORIO : _____
FECHA DE MUESTREO : _____
FECHA DE ANALISIS : _____

Introducción

Este capítulo describe procedimientos para hacer exámenes microbiológicos de muestras de agua para determinar la calidad sanitaria. Los métodos tienen la intención de indicar el grado de contaminación con las mejores técnicas disponibles actualmente; sin embargo sus limitaciones deben ser entendidas completamente.

Se utilizan exámenes para la detección y enumeración de organismos indicadores en vez de patógenos. El grupo de bacterias coliformes como es definida aquí es el indicador principal en el análisis del agua para usos domésticos, dietéticos u otros. Las reacciones culturales y las características de este grupo de bacterias han sido estudiados extensivamente; llegando a la conclusión de que al encontrarse en ciertos niveles pueden ser características de una buena o mala calidad de agua.

La experiencia ha establecido la importancia de la densidad del grupo coliforme como un criterio del grado de contaminación y por lo tanto de calidad sanitaria del agua. La significancia de los exámenes y la interpretación de resultados están bien autenticados y han sido usados como una base para los estándares de calidad bacteriológica de los abastecimientos de agua.

La técnica de filtro de membrana, la cual involucra un cultivo en placa directa para la detección y estimación de densidades de coliformes es tan efectiva como el examen de fermentación de tubo múltiple para detectar bacterias del grupo coliforme. La modificación de los detalles de procedimiento, particularmente del medio de cultivo, ha hecho los resultados comparables a aquellos que han sido dados por el procedimiento de fermentación del tubo múltiple. Aunque hay limitaciones en la aplicación de la técnica de filtro de membrana, es equivalente cuando es usada con adherencia estricta a estas limitaciones y a los detalles técnicos especificados.

Se acostumbra reportar los resultados de la prueba coliforme por medio del procedimiento de fermentación de tubo múltiple con el índice "número más probable" (MPN). Esto es un índice del número de bacterias coliformes que más probablemente que cualquier otro número daría los resultados del examen de laboratorio; no es una enumeración real. Por otra parte métodos de cultivo en placa directas tales como el procedimiento filtro de membrana permiten un conteo directo de colonias de coliformes. En ambos procedimientos la densidad de coliformes se reporta convencionalmente como el MPN ó conteo de filtro de membrana por 100 mL. El uso de cualquiera de los procedimientos permite estimar la calidad sanitaria del agua y la efectividad de procesos de tratamiento. Porque no es necesario proveer una evaluación cuantitativa de bacterias coliformes para todas las muestras, una prueba cualitativa de presencia-ausencia ha sido agregado.

Métodos para la diferenciación del grupo coliformes están incluidos. Tal diferenciación generalmente es considerada de valor limitado en

la determinación de la calidad de agua potable porque la presencia de cualquier bacteria coliforme vuelve al agua potencialmente no satisfactoria ó insegura. La espaciación (distribución en el espacio) puede proveer información en la colonización de un sistema de distribución y así confirmar aún más la validez de los resultados de coliformes.

Las bacterias del grupo coliforme presentes en el intestino y heces de animales de sangre caliente generalmente incluyen organismos capaces de producir gas a partir de lactosa en un medio de cultivo adecuado a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Considerando que organismos coliformes de otras fuentes frecuentemente no pueden producir gas bajo estas condiciones, este criterio es usado para definir al componente fecal del grupo coliforme. Tanto las técnicas de dilución de tubo múltiple como el procedimiento de filtro de membrana han sido modificados para incorporar la incubación en pruebas confirmatorias a 44.5°C y así proveer estimaciones de la densidad de organismos fecales como ha sido definido. Procedimientos para coliformes fecales también incluyen una prueba de tubos múltiples de 24 horas usando medio A-1 y un método rápido de 7 horas. Esta diferenciación produce información de mucho valor que concierne la posible fuente de contaminación en el agua y especialmente su lejanía, porque se puede esperar que los miembros no fecales del grupo coliforme vivan más tiempo que los miembros fecales en el medio ambiente no favorable que es provisto por el agua.

No se puede asegurar que el examen de muestras bacteriológicas de rutina provea información completa concerniente con la calidad del agua. Siempre considerar los resultados bacteriológicos en relación con la información disponible concerniente con las condiciones sanitarias que rodean a la fuente de la muestra. Para un abastecimiento de agua, la evaluación precisa de la calidad se puede hacer sólo cuando los resultados de exámenes de laboratorio son interpretados en relación a datos de estudios sanitarios, considerando inadecuados los resultados del examen de una sola muestra de una fuente determinada. Cuando sea posible hacer la evaluación de la calidad del agua en el examen de una serie de muestras colectadas en un período de tiempo conocido y prolongado.

4.2

Pautas de Control de Calidad en el Laboratorio

El énfasis cada día más grande en los estándares de calidad del agua y su cumplimiento y monitoreo requieren el establecimiento de un programa de seguridad de calidad para sustentar la validez de los datos.

Un programa de laboratorio de seguridad de calidad es la aplicación ordenada de las prácticas necesarias para remover o reducir errores que puedan ocurrir en cualquier operación de laboratorio, causadas por el personal, equipo, provisiones, procedimientos de muestreo y metodología analítica.

El programa debe ser práctico e integrado. Debe requerir sólo una cantidad de tiempo razonable o deberá ser evitada.

Cuando se administra adecuadamente un programa de seguridad de calidad, balanceado y aplicado concientemente, se producirán datos uniformes de alta calidad sin interferir con las funciones analíticas primarias del laboratorio. Descripciones detalladas de prácticas de control de calidad están disponibles. Generalmente 15% del tiempo total del analista debería ser usado en diferentes aspectos del programa de seguridad de calidad. Las prácticas de control de calidad dentro del laboratorio y entre distintos laboratorios deberían estar documentados y los archivos deben estar disponibles para inspección. Las pautas de seguridad de calidad en las secciones siguientes son recomendables como un programa mínimo para un laboratorio de microbiología.

Todos los laboratorios tienen algunas prácticas de control de calidad intralaboratorio, que han evolucionado del sentido común y los principios de experimentación controlado. Existen problemas especiales en microbiología porque estándares analíticos, adiciones conocidas y muestras de referencia usualmente no están disponibles. Más frecuentemente se requiere juicio personal. Un programa efectivo debe controlar todos los factores, desde recolección de muestras hasta el reporte de datos que puedan influenciar los resultados. Los factores incluyen técnicas de muestreo, facilidades, personal, equipo, provisiones, medio y procedimientos de exámenes analíticos.

Es especialmente importante que los laboratorios que ejecutan solo una cantidad limitada de exámenes microbiológicos ejerciten un control de calidad estricto. Estas pautas ayudarán a los laboratorios a establecer y mejorar los programas de calidad de control.

4.2.1 Facilidades y Personal

4.2.1.1 Ventilación: Diseñar laboratorios bien ventilados que puedan ser mantenidos libres de polvo, vientos y cambios extremos de temperatura. Se recomienda aire acondicionado central para reducir la contaminación para permitir una operación más estable de las incubadoras y para disminuir problemas de humedad con balanzas del medio y balanzas analíticas.

- 4.2.1.2 Uso del espacio: Diseñar y operar el laboratorio para minimizar el tráfico a través de él y las visitas. Proveer un área separada para preparar y esterilizar el medio, la cristalería y el equipo. Usar un área de trabajo especial como una cubierta de protección ventilada para dispensar y preparar el medio estéril, transferir cultivos microbianos, o trabajar con materiales patógenos. En laboratorios más pequeños puede ser necesario aunque no es lo apropiado ejecutar todas estas actividades en la misma habitación.
- 4.2.1.3 Areas de banco del laboratorio: Proveer un mínimo de 2 metros lineales de espacio para banco por analista, y áreas adicionales para las actividades de preparación y apoyo. Para el trabajo que se hace de pie, las dimensiones estándares del banco son de 90 a 97 cms de alto y 70 a 76 cm de ancho. Para actividades que requieren estar sentado tales como microscopia y conteo de placas, los bancos son de 75 a 80 cms de alto. Especificar las cubiertas de los bancos de acero inoxidable, plástico u otra superficie suave e impermeable que sea inerte y resistente a la corrosión y que tenga un número mínimo de grietas o juntas. Instalar luz que sea uniforme y libre de resplandor con aproximadamente una intensidad de luz de 1000 sobre la superficie en que se trabaja.
- 4.2.1.4 Paredes y pisos: Cubrir las paredes con una superficie suave que sea fácil de limpiar y desinfectar. Especificar pisos de concreto suave y sellado, azulejos de vinyl o asfalto, u otra superficie impermeable que sea fácil de lavar.
- 4.2.1.5 Monitoreo del aire: Mantener estándares altos de limpieza en las áreas de trabajo. Monitorear el aire con platos de densidad de aire y las tapas de los bancos con platos RODAC o con otro método.
- 4.2.1.6 Limpieza de laboratorio: Regularmente limpiar las habitaciones del laboratorio y lavar los bancos, estantes, pisos y ventanas, trapear los pisos y tratarlos con una solución desinfectante; no barrer o poner un trapeador seco. Limpiar las superficies de los bancos y tratarlos con un desinfectante antes y después del uso. No permitir que el laboratorio se vuelva desordenado.
- 4.2.1.7 Personal: Idealmente, exámenes bacteriológicos se deberían hacer por un microbiólogo profesional. Si no es posible, se debe tener un microbiólogo o analista entrenado listo para guiar y dar asistencia.
- Definir claramente las asignaciones de trabajo. Entrenar al analista en procedimientos de laboratorio básicos. El supervisor debiera revisar periódicamente los procedimientos de recolección de muestras y su manejo, preparación del medio y la cristalería, esterilización, procedimientos de pruebas rutinarias, conteo, manejo de datos y técnicas de control de calidad para identificar y eliminar problemas. Los jefes debieran animar al personal del laboratorio a tomar entrenamiento adicional para avanzar su habilidad y conocimiento.
- 4.2.2 Equipo de Laboratorio e Instrumentación
- Verificar que cada parte del equipo llene las necesidades del usuario de exactitud y precisión. Dar mantenimiento al equipo periódicamente

conforme a las recomendaciones del fabricante, u obtener contratos de mantenimiento preventivo en autoclave y balanzas cuando sea económicamente posible. Anotar directamente todas las pruebas de control de calidad en un libro de control de calidad del laboratorio.

Usar los siguientes procedimientos de control de equipo:

- 4.2.2.1 Termómetro/Termógrafo (instrumento que grafica la temperatura): Examinar la exactitud de los termómetros o termógrafos contra un termómetro certificado de la Dirección Nacional de Estándares de E.E.U.U. (National Bureau of Standards) ó uno que conforme las especificaciones de esa organización. Para propósitos generales usar termómetros graduados en incrementos de 0.5°C ó menos. Para un baño maría de 44.5°C, usar un termómetro sumergido con escala de por lo menos 0.2°C. Apuntar los datos de pruebas de temperatura en un libro de control de calidad. Marcar correcciones de calibración en cada termómetro usado con un incubador, refrigerador ó congelador. Cuando sea posible equipar a los incubadores y baños maría con un termógrafo que provea un registro continuo de la temperatura operacional.
- 4.2.2.2 Balanza: Limpiar la balanza antes y después de cada uso con un cepillo suave hecho de materiales tales como pelo de camello ó polonium. Limpiar los platillos de la balanza después de cada uso y secar lo que se haya regado o botado inmediatamente con una toalla húmeda. Inspeccionar las pesas con cada uso y descartarlas si están corroídas. Comprobar las pesas mensualmente contra pesos certificados. Para pesar 2 gramos ó menos, usar una balanza analítica con una sensibilidad menor a 1 mg para una carga de 10 g. Para cantidades mayores, usar una balanza de platillo con una sensibilidad de 0.1 g para una carga de 150 g. Ejecutar mantenimiento preventivo.
- 4.2.2.3 Ph metro: Regularizar el pH metro con por lo menos dos amortiguadores estándares (pH 4.0, 7.0 ó 10.0) y compensar para la temperatura antes de cada serie de pruebas. Poner fecha a las soluciones amortiguadoras al abrirlas y comparar mensualmente contra otro pH metro si es que hay uno disponible.
- 4.2.2.4 Unidad de desionización del agua: columnas apropiadas de resina de desionización del medio mezclado producen un buen grado de agua pura. Hay sistemas comerciales disponibles que combinan la prefiltración, resinas del medio mezclado, carbón activado y cartuchos de filtración final para producir un agua ultra pura. La vida de estos cartuchos se puede extender bastante si el agua de entrada es destilada ó tratada con ósmosis reversa. Normalmente estas aguas no son almacenadas. Los sistemas de desionización tienden a producir la misma calidad de agua hasta que las resinas ó carbón activado están casi exhaustos y la calidad se vuelve inaceptable abruptamente. El monitoreo del agua desionizada debe hacerse continuamente ó diariamente con un medidor de conductividad y analizarla por lo menos anualmente para ver si hay metales, trozos, etc. Reemplazar los cartuchos a intervalos recomendados por el fabricante ó de acuerdo a los resultados analíticos. Filtrar el agua producida a través de un filtro de membrana de 0.22 um diámetro de poro para remover la contaminación bacteriana. Llevar un control por lo menos mensual y reemplazar el filtro cuando el conteo del plato heterotrófico exceda 1000/mL.

- 4.2.2.5 Destiladora de agua: Las destiladoras producen agua de buen grado que característicamente se deteriora lentamente con el tiempo al ocurrir corrosión y al arruinarse (mal olor, color, etc.). Estas condiciones pueden ser controladas con un mantenimiento apropiado y limpieza. Las destiladoras remueven las sustancias disueltas, eficazmente, pero no gases disueltos ó químicos orgánicos volátiles. Agua recién destilada puede contener cloro y amoníaco (NH₃). En almacenamiento el agua absorbe aún más NH₃ y CO₂ del aire. Usar agua suavizada a fin de reducir la frecuencia de limpiar la destiladora. Vaciar y limpiar la destiladora y el depósito de acuerdo a las instrucciones de uso del fabricante.
- 4.2.2.6 Horno de aire caliente: Probar el funcionamiento con tiras de esporas disponibles comercialmente ó con suspensiones de esporas trimestralmente. Controlar la temperatura con un termómetro que sea exacto en el rango de 160 a 180°C y reportar los resultados. Usar cinta indicadora de calor para identificar la provisión y materiales que han sido expuestos a temperaturas de esterilización.
- 4.2.2.7 Autoclave: Anotar la temperatura, presión y tiempo para cada uso. Oportimamente usar un termógrafo. Probar el funcionamiento con tiras de esporas ó suspensiones mensualmente. Usar cinta sensitiva al calor para identificar las provisiones y materiales que han sido esterilizados.
- 4.2.2.8 Refrigerador: Revisar y apuntar la temperatura diariamente y limpiar la unidad cada mes. Identificar y poner fecha a los materiales almacenados. Descongelarlo cuando sea necesario y deshechar los materiales que estén vencidos trimestralmente.
- 4.2.2.9 Equipo del filtro de membrana: Antes de usarlo, montar las unidades de filtración y revisar que no haya escapes. Cubrir las unidades con silicón para mejorar el drenaje. Descartar las unidades si las superficies internas están rayadas. Limpiar el equipo de filtración completamente después de su uso, envolverlo en papel que no sea tóxico ó ponerlo en un recipiente que no sea corrosivo y esterilizar en el autoclave.
- 4.2.2.10 Gabinete de seguridad (cubierta de protección): Revisar los filtros mensualmente para comprobar que no estén obstruidos o con acumulación de sucio. Una vez por mes exponer las placas de agar al flujo del aire por 1 hora. Incubar las placas a 35°C por 24 horas y examinarlos por si hay contaminación.
- Desconectar las lámparas UV y limpiarlas mensualmente restregándolas con un trapo suave humedecido con etano.
- Examinar la eficacia de la lámpara UV cada tres meses y reemplazarla si los platos de agar que contengan 200 a 250 microorganismos no muestren una reducción de 99% después de exponerse a la lámpara por 2 minutos. Inspeccionar trimestralmente los gabinetes a fin de que no haya escapes de aire y comprobar la tasa de flujo del aire. Usar un instrumento de monitoreo de la presión para medir la eficacia de la cubierta. Mantenerlo como sea indicado por el fabricante.
- 4.2.2.11 Incubador de baño maría: Mantener un termómetro que sea exacto, inmer

so en el baño maría; controlar y anotar la temperatura diariamente a menos que se use un termógrafo o un sistema de alarmas. Sólo usar estantes y recipientes de acero inoxidable, cubiertos de plástico u otros que no sean corrosivos.

4.2.2.12 Incubador (cubierto de aire o agua): Revisar y anotar la temperatura dos veces al día (mañana y tarde) en las áreas de estantes en uso. Si se usa un termómetro de vidrio, sumergir el bulbo y el tallo en agua o glicerina hasta la marca del tallo. Para mejores resultados usar un termógrafo de registro continuo y sistema de alarma. Ubicar el incubador donde la temperatura de la habitación sea entre 16 y 27°C.

4.2.2.13 Microscopios: Usar papel de lente para limpiar objetivos y la platina después de cada uso. Cubrir el microscopio cuando no esté en uso.

Para microscopios fluorescentes sólo permitir que técnicos entrenados usen el microscopio y la fuente de luz. Monitorear la lámpara fluorescente con un medidor de luz y reemplazarla cuando exista una pérdida significativa de florecencia.

Anotar tiempo de operación de la lámpara, la eficiencia de la lámpara y el alineamiento. Comprobar periódicamente el alineamiento de la lámpara particularmente cuando ha sido cambiado el foco y realinearla si es necesario.

4.2.3 Provisiones del Laboratorio

4.2.3.1 Cristalería: Después de cada uso, examinar la cristalería y descartar aquellos con orillas cortadas o con la superficie interior rayada. Particularmente examinar las botellas de dilución con tapones de rosca y los frascos para comprobar que no tengan orillas picadas que pueden gotear y contaminar el área de trabajo o crear aerosoles. Inspeccionar la cristalería después de lavarla; si el agua forma gotas excesivamente en la superficie, volver a lavar.

Hacer las siguientes pruebas para ver si la cristalería está limpia:

4.2.3.1.1 Comprobación de pH- Porque algunas soluciones de limpieza son difíciles de remover completamente, comprobar grupos de cristalería al azar para ver si se produce una reacción del pH, especialmente si ha sido remojado en medio alcalino o ácido. Para comprobar la cristalería para ver si tienen residuos alcalinos o ácidos, agregar unas cuantas gotas de azul de bromotimol al 0.04% u otro indicador de pH y observar la reacción del color. El azul de bromotimol puede volverse amarillo (en medio ácido) o azul-verdoso (en medio neutral) o azul (en medio alcalino), en el rango de pH de 6.5 a 7.3. Para preparar la solución indicadora de azul de bromotimol 0.04%, agregar 16 mL de 0.01 NaOH a 0.1 g de azul de bromotimol (BTB) y diluir a 250 mL con agua destilada.

4.2.3.1.2 Hacer pruebas para ver si hay residuos inhibidores en la cristalería. Algunos agentes humectantes o detergentes usados para lavar cristalería puede contener sustancias bacteriostáticas o inhibidoras los que requieren de 6 a 12 enjuagues sucesivos para remover todas las trazas

y asegurar libertad de la acción bacteriostática residual. Hacer esta prueba anualmente y antes de usar un suministro nuevo de detergente. Si se usan artículos plásticos preesterilizados y prelavados, examinarlos para ver si hay residuos inhibidores.

- 1) Procedimiento- Lavar 6 cápsulas de petri de acuerdo a la práctica de laboratorio usual y designarlos como el grupo A.

Lavar 6 cápsulas de petri de igual forma, enjuagar 2 veces con porciones sucesivas de agua destilada y designarlos como el grupo B.

Enjuagar 6 cápsulas de petri con agua de lavado detergente (en concentración de uso) secarlos sin enjuagarlos y designarlos como el grupo C.

Esterilizar las cápsulas en los grupos A,B,C, por medio del procedimiento usual. Para probar equipo plástico preesterilizado, formar el grupo D, que consiste en 6 cápsulas de petri estériles, y proceder.

No agregar más de 1 mL de una muestra que produzca 50 a 150 colonias y proceder de acuerdo al procedimiento descrito para el conteo de cápsulas (ver la Sección 4.7.1.4.6). Si hay dificultad para obtener una muestra adecuada, inocular 3 cápsulas de cada grupo con 0.1 mL y las otras 3 cápsulas de cada grupo con 1 mL.

- 2) Interpretación de resultados - Una diferencia en el número promedio de colonias de menos del 15% en cápsulas de los grupos A,B, C y D indica que el detergente no tiene características tóxicas ó inhibidoras ó que las cápsulas preesterilizadas son aceptables.

Una diferencia en el conteo de colonias de 15% ó más entre los grupos A y B ó D y B demuestra residuo inhibidor.

Un desacuerdo en los promedios de menos de 15% entre los grupos A y B y más del 15% entre los grupos A y C indica que el detergente de limpieza tiene propiedades inhibidoras que son eliminadas durante el lavado de rutina.

4.2.3.2 Utensilios y recipientes para la preparación del medio de cultivo: Usar utensilios y recipientes de vidrio de bososilicato, acero inoxidable, aluminio u otro material que no sea corrosivo ó contaminante (ver la Sección 4.3).

4.2.3.3 Calidad del agua pura: La calidad del agua obtenida de un sistema de agua pura difiere con el sistema usado y su mantenimiento (ver las Secciones 4.2.2.4 y 4.2.2.5). Los límites aceptables de la calidad del agua son dados en el Cuadro 4.1. Si éstos límites no son alcanzados, investigarlos y corregirlos. Aunque la medida del pH de agua purificada se caracteriza por fluctuar, las lecturas extremas son indicativas de contaminación química.

Cuadro 4.1. Calidad del Agua Purificada Usada en Pruebas de Microbiología

Prueba	Frecuencia de Monitoreo	Límite
Pruebas Químicas:		
Conductividad	Constantemente o con cada uso	> 0.5 megohmios de resistencia o 2 umhos/cm a 25 °C
pH	Con cada uso	5.5 - 7.5
Metales pesados, solos (Cd,Cr,Cu,Ni,Pb y Zn)	Mensualmente	< 0.5 mg/L
Metales pesados, total	Mensualmente	≤ 1.0 mg/L
Amoníaco/nitrógeno orgánico	Mensualmente	< 0.1 mg/L
Residuo de cloro total	Mensualmente o con cada uso	Límite de detección
Pruebas bacteriológicas:		
Conteo de placa (Ver la Sección 4.7.1.4.6)	Mensualmente	< 1000 colonias/mL
Pruebas de calidad de agua (Ver la Sección 4.2.3.3)	Anualmente y para una fuente nueva	Relación de 0.8 - 3.0
Prueba de uso (Ver la Sección 4.2.3.4)	Anualmente y para una fuente nueva	t de "Student" ≤ 2.78

Las pruebas de calidad bacteriana de agua pura se basan en el crecimiento de Enterobacter aerogenes en un medio químicamente definido de crecimiento mínimo. La presencia de un agente tóxico ó una sustancia promotora del crecimiento alterará la población de 24 horas con un incremento ó disminución de 20% ó más, cuando se compara con un control. Realizar la prueba por lo menos anualmente, cuando la fuente de agua pura se cambie, y cuando ocurra un problema analítico.

4.2.3.3.1 Aparatos y materiales - Usar cristalería de borosilicato y enjuagar en agua recién destilada usando un destilador de vidrio antes de esterizarla con calor seco; la esterilización por vapor volverá a contaminar estos artículos que fueron limpiados especialmente. La sensibilidad de prueba y reproducibilidad depende en parte de la limpieza de los recipientes de la muestra, frascos, tubos y pipetas. A veces es conveniente guardar cristalería nueva (pipetas, buretas, etc.) para el uso exclusivo de esta prueba. Usar cualquier clase de tipo IMVic de coliformes --++ (E. aerogenes) obtenidos de una muestra de agua de río ó de aguas negras.

4.2.3.3.2 Reactivos - Usar sólo reactivos de la más alta pureza. Algunas marcas de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) contiene grandes cantidades de impurezas. La sensibilidad de la prueba es controlada en parte por la pureza del reactivo.

Preparar los reactivos en agua recién destilada en una destiladora de vidrio.

1) Solución de citrato de sodio - Disolver 0.29 g de citrato de sodio, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de agua destilada.

2) Solución de sulfato de amoníaco - Disolver 0.60 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 500 mL de agua.

3) Solución de mezcla de sal - Disolver 0.26 g de sulfato de magnesio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.17 g de cloruro de calcio, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.23 g de sulfato ferroso, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; y 2.50 g de cloruro de sodio, NaCl , en 500 mL de agua.

4) Solución amortiguadora de fosfato - Solución amortiguadora de fosfato existente (ver la Sección 4.5.3.1.1) diluida 1:25 en agua.

Hervir todas las soluciones de reactivos para matar las células vegetativas. Almacenar las soluciones en botellas con tapas de vidrio esterilizadas en la oscuridad, a 5°C hasta por varios meses con tal de que se prueben para ver si hay esterilidad antes de cada uso. Porque la solución de mezcla de sal desarrollará algo de turbidez dentro de 3 a 5 días: cuando la sal ferrosa se convierta al estado ferrico, preparar la solución de mezcla de sal sin FeSO_4 para almacenamiento por largo tiempo. Para usar la mezcla, agregar una cantidad apropiada de sal de hierro recién preparada y recién hervida. Descartar las soluciones con turbidez pesada y preparar

una solución nueva. Descartar la solución amortiguadora de fosfato si se vuelve turbia.

- 4.2.3.3.3 Muestras - Para preparar las muestras de prueba coleccionar 150 a 200 mL de agua de laboratorio pura, usada rutinariamente, y agua de control en frascos de vidrio de borosilicato estériles y hervir durante 2 minutos. Evitar hervirla por más tiempo para prevenir cambios químicos.
- 4.2.3.3.4 Procedimiento - Marcar 5 frascos ó tubos, A,B,C,D y E. Agregar las muestras de agua, reactivos del medio y agua redestilada a cada frasco como se indica en el Cuadro 4.2. Agregar una suspensión de E.aerógenes (IMViC tipo: -- ++) de tal densidad que cada frasco contendrá 30 a 80 células/mL, preparada como se indica a continuación. Densidades de células debajo de este rango resultan en relaciones inconsistentes mientras que las densidades arriba de 100 células/mL resultan en una sensibilidad disminuida a los nutrientes en el agua de prueba. Hacer un conteo inicial bacteriana colocando porciones de 1 mL triplicadas de cada frasco de cultivo en el agar de conteo de placa. Incubar los frascos A a E a 35°C por 24 ± 2 horas. Preparar los conteos finales de placa de cada frasco, usando diluciones de 1,0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mL.

Cuadro 4.2. Adiciones de Reactivo para la Prueba de Calidad de Agua

Reactivos del Medio	Pruebas de control, mL		Pruebas opcionales, mL		
	Control	Agua destilada desconocida	Alimento Disponible	Fuente de Nitrógeno	Fuente de Carbono
	A	B	C	D	E
Solución de citrato de sodio	2.5	2.5	--	2.5	--
Solución de sulfato de amoníaco	2.5	2.5	--	--	2.5
Solución de mezcla de sal	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Amortiguador de fosfato (7.3 ± 0.1)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Agua desconocida	--	21.0	21.0	21.0	21.0
Agua redestilada	21.0	--	5.0	2.5	2.5
Volumen total	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0

- 4.2.3.3.5 Preparación de suspensión bacteriana - En el día anterior a hacer la prueba de conveniencia (adaptabilidad) incubar una clase de E.aerógenes en un agar nutritivo con una inclinación de aproximadamente 6.3 cm de largo contenido en un tubo con tapa de rosca de 125x16mm.
- Rayar la superficie entera del agar para desarrollar una capa de crecimiento continuo e incubarlo 18 a 24 horas a 35°C.
- 4.2.3.3.6 Cosechando células viables - Succionar con pipeta 1 a 2 mL de agua de dilución estéril de un blanco de agua de 99 mL en el cultivo de 18 a 24 horas. Emulsionar el crecimiento en la inclinación frotando suavemente la capa de bacterias con la pipeta, teniendo cuidado de no romper el agar; succionar con la pipeta la suspensión de regreso al blanco de agua de 99 mL original.
- 4.2.3.3.7 Dilución de la suspensión bacteriana - Hacer una dilución 1:100 de la botella original en una segunda botella con blanco de agua, una dilución 1:100 más de la segunda botella en una tercera botella con blanco de agua, una dilución 1:10 de la tercera botella en una cuarta botella con blanco de agua moviéndola vigorosamente después de cada transferencia. Succionar con pipeta 1.0 mL de la cuarta dilución (1:10⁵) en cada uno de los frascos A,B,C,D, y E. Este procedimiento debe resultar en una dilución final de los organismos a un rango de 30 a 80 células viables por mililitro de solución de prueba.
- 4.2.3.3.8 Verificación de la densidad bacteriana - Las variaciones dentro de las cepas del mismo organismo de organismos diferentes del medio y del área de superficie de las inclinaciones de agar, posiblemente requerirán que se ajuste el proceso de dilución para llegar a un rango específico de densidad entre 30 a 80 células viables. Para establecer el rango de crecimiento numericamente para un organismo y medio específicos hacer una serie de conteos de placa de la tercera dilución para determinar la densidad bacteriana. Escoger el volumen apropiado de esta tercera dilución, la cual cuando ha sido diluida por los 30 mL en los Frascos A,B,C,D y E, contendrá entre 30 a 80 células viables/mL. Si los procedimientos son estandarizados en lo que se refieren a la inclinación del área de superficie y la técnica de laboratorio, es posible reproducir los resultados en experimentos repetidos con la misma cepa.
- 4.2.3.3.9 Dificultades de procedimiento - Los problemas en este método pueden ser causados por: almacenamiento de agua destilada desconocida en recipientes de vidrio suave ó en recipientes de vidrio sin forros para las tapas de metal; el uso de químicos en la preparación del reactivo que no son de grado de reactivo analítico ó que no son de fabricación reciente; contaminación del reactivo por el agua destilada con antecedentes bacterianos (para evitar esto, hacer un conteo de placa heterotrófica en todos los reactivos antes de comenzar la prueba de conveniencia, como una comprobación de la contaminación de solución existente); fallar en obtener la concentración bacteriana inicial deseada ó la selección incorrecta de dilución usada para obtener el conteo de placa de 24 horas; tardarse al derramar

las placas; y la prolongación del período de incubación más allá del límite de 26 horas, la que resulta en una respuesta de crecimiento desensibilizada.

4.2.3.3.10 Cálculo - Para sustancias inhibidoras del crecimiento:

$$\text{Relación} = \frac{\text{Conteo de la colonia/mL, Frasco B}}{\text{Conteo de la colonia/mL, Frasco A}}$$

Una relación de 0.8 a 1.2 (inclusive) muestra que no hay sustancias tóxicas; una relación de menos de 0.8 muestra sustancias inhibidoras del crecimiento en la muestra de agua. Para fuentes de nitrógeno y carbono que promueven el crecimiento:

$$\text{Relación} = \frac{\text{Conteo de la colonia/mL, Frasco C}}{\text{Conteo de la colonia/mL, Frasco A}}$$

Para fuentes de nitrógeno que promueven el crecimiento:

$$\text{Relación} = \frac{\text{Conteo de la colonia/mL, Frasco D}}{\text{Conteo de la colonia/mL, Frasco A}}$$

Para fuentes de carbono que promueven el crecimiento bacteriana:

$$\text{Relación} = \frac{\text{Conteo de la colonia/mL, Frasco E}}{\text{Conteo de la Colonia/mL, Frasco A}}$$

No calcular las tres últimas relaciones cuando la primera indica una reacción tóxica. Para estas relaciones un valor arriba de 1.2 indica una fuente disponible de crecimiento bacteriano.

4.2.3.3.11 Interpretación de resultados - El conteo de colonia del Frasco A después de 20 a 24 horas a 35°C depende del número de organismos inicialmente sembrados en el Frasco A y la cepa (variedad) de E. aerógenes usada. Por este motivo debe incluirse el control, Frasco A, en cada serie de pruebas individuales. Sin embargo para una variedad dada de E. aerógenes, bajo condiciones ambientales idénticas, el conteo terminal (final) debe ser razonablemente constante cuando la siembra inicial es la misma. La diferencia en la siembra inicial de 30 a 80 será aproximadamente 3 veces mayor para los 80 organismos inicialmente inoculados en el Frasco A, con tal de que la tasa de crecimiento se mantenga constante. Por eso es esencial que los conteos de colonia iniciales en Frascos A y B sean aproximadamente iguales.

Cuando la relación excede 1.2, asumir que hay sustancias estimulantes del crecimiento presentes. Sin embargo, este procedimiento es extremadamente sensitivo y las relaciones arriba de 3.0 tienen poco significado en la práctica real. Entonces si la relación es entre 1.2 y 3.0, no hacer las pruebas C, D, y E excepto en circunstancias especiales.

Usualmente el Frasco C será muy bajo y los Frascos D y E tendrán una relación de menos de 1.2 cuando la relación de Frasco B y

Frasco A es entre 0.8 y 1.2. Los factores limitantes del crecimiento en el Frasco A son nitrógeno y carbono orgánico. Una cantidad ex tremadamente grande de nitrógeno de amoníaco sin carbono orgánico puede incrementar la relación en el Frasco D arriba de 1.2, ó la ausencia de nitrógeno con concentraciones altas de carbono podría producir relaciones arriba de 1.2 en el Frasco E, con una relación B:A entre 0.8 y 1.2.

Una relación abajo de 0.8 indica que el agua contiene sustancias tóxicas, y ésta relación incluye a todas las tolerancias permitibles. Como se indicó en el párrafo anterior, la relación podría llegar tan alto como 3.0 desde 1.2 sin ninguna consecuencia no deseable.

Medidas correctivas específicas no pueden ser recomendadas en circunstancias específicas de aparato de destilación defectuoso. Sin embargo hacer una inspección cuidadosa del equipo de destilación y revisar la producción y el manejo del agua destilada para ayudar a localizar y corregir la causa de la dificultad.

El agua introducida a la destiladora a veces es pasada a través de una columna desionizadora y un filtro de carbón. Si a estas columnas se les da buen mantenimiento la mayoría de los contaminantes inorgánicos y orgánicos serán removidos. Si el mantenimiento es po bre, por otra parte, el agua de entrada puede ser degradada a una calidad más baja que la del agua cruda de la llave.

El mejor sistema de destilación está hecho de cuarzo ó vidrio de borosilicato con un contenido alto de sílice con tolerancia termal especial. Destiladoras revestidas de estaño no son recomendables. Para la tubería de conexión usar acero inoxidable, vidrio borosilicato, ó tubos de plástico especiales hechos de cloruro polivinílico (PVC). Usar depósitos de almacenamiento de acero inoxidable y protegerlos del polvo.

Tomando al cobre como una medida relativa de toxicidad del agua destilada, la sensibilidad máxima de las pruebas es 0.05 mg Cu/L en una muestra de agua destilada.

4.2.3.4 Prueba de uso para evaluación de agua pura de laboratorio del medio y de las membranas - Cuando un nuevo lote de medio de cultivo, filtros de membrana ó una nueva fuente de agua de laboratorio sean usa dos ó durante pruebas anuales del agua, hacer pruebas de comparación del lote actual en uso (lote de referencia) contra el lote nue vo (lote de prueba) en la siguiente manera:

4.2.3.4.1 Procedimiento- Usar un solo grupo de agua pura, cristalería, filtros de membrana u otros materiales necesitados como ha sido espe cificado para controlar todas las otras variables excepto la que se está estudiando. Hacer pruebas paralelos de placa de derrame ó placa del filtro de membrana en el lote de referencia y lote de prueba de acuerdo a los procedimientos en la Sección 4.7. Como mí nimo, hacer análisis individuales en 5 muestras de agua positivas. Los análisis repetidos y muestras adicionales pueden ser probados

para incrementar la sensibilidad de detectar diferencias entre los lotes de referencia y los de prueba.

Cuando se comparen las fuentes de agua, hacer las pruebas paralelamente usando agua de referencia y agua de prueba separadamente para toda el agua usada en las pruebas (dilución, enjuague, preparación del medio, etc.).

- 4.2.3.4.2 Conteo y Cálculos - Después de la incubación, comparar las colonias de bacterias de los dos lotes en tamaño y apariencia. Si las colonias en el lote de prueba son atípicos ó notablemente más pequeños que las colonias en las placas de referencia de lote, anotar la evidencia de inhibición u otro problema, sin importar las diferencias de conteo. Contar las placas y calcular el conteo individual por 1 mL ó por 100 mL. Transformar el conteo a logaritmos y anotar los resultados transformados para los dos lotes en dos columnas paralelas. Calcular la diferencia, d , entre los dos resultados transformados para cada muestra incluyendo el signo + ó -, la media, \bar{d} , y la desviación estándar, S_d , de estas diferencias.

Calcular la estadística, t de Student usando el número de muestras como n :

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d / \sqrt{n}}$$

- 4.2.3.4.3 Interpretación - Usar el valor t crítico de la tabla t de Student para la comparación contra el valor calculado. Al nivel de significancia 0.05, este valor es 2.78 para cinco muestras (cuatro grados de libertad).

Si el valor calculado de t no excede 2.78, los lotes no producen resultados significativamente diferentes y el lote de prueba es aceptable. Si el valor calculado de t excede 2.78, los lotes producen resultados que son significativamente diferentes. Si el lote de prueba t excede el resultado de lote de referencia, el lote de prueba es más estimuladorio. Si el resultado del lote de prueba es menor que el del lote de referencia, el lote de prueba es menos estimuladorio.

Si las colonias son atípicas ó notablemente más pequeñas en el lote de prueba y la t de Student excede 2.78, revisar las condiciones de la prueba, repetir la prueba y/o rechazar el lote de pruebas y obtener otro.

- 4.2.3.5 Reactivos: Porque los reactivos son una parte integral de los análisis microbiológicos su calidad debe ser asegurada. Usar solamente productos químicos de alta calidad porque las impurezas pueden inhibir el crecimiento bacteriano, proveer nutrientes y fallar en producir la reacción deseada. Poner la fecha en los productos químicos y los reactivos cuando se reciben y cuando se abren la primera vez para usarlos. Convertir los reactivos en volumen mediante frascos volumétricos y transferirlos para almacenaje a botellas inertes de plástico de buena calidad ó a botellas de vidrio borosilicato con tapones de borosilicato ó polietileno u otro plástico.

Anotar en la botella de los reactivos preparados el nombre y la concentración, fecha de preparación y las iniciales del preparador. Incluir cultivos de control positivos y negativos con cada serie de pruebas de cultivos ó bioquímicos.

- 4.2.3.6 Tintes y colorantes: En análisis microbiológicos se usan químicos orgánicos como agentes reactivos (e.g., verde brillante) como indicadores (e.g., lactosa roja de fenol), y como colorantes microbiológicos (e.g., tinte Gram). Los tintes de suplidores comerciales varían de lote a lote en porcentaje de tinte, complejo de tinte, sustancias insolubles y materiales inertes presentes. Porque los tintes para la microbiología debe ser de concentración y estabilidad apropiadas para producir reacciones correctas, usar solo tintes certificados por la Comisión de Colorantes Biológicos. comprobar los colorantes bacteriológicos antes de usarlos con por lo menos un cultivo de control positivo y uno negativo y anotar los resultados.
- 4.2.3.7 Filtros de membrana y almohadillas: La calidad y funcionamiento de los filtros de membrana varían con el fabricante, tipo, marca y lote. Estas variaciones resultan de diferencias en los métodos de fabricación, materiales, control de calidad y condiciones de almacenamiento.
- Filtros de membrana y almohadillas deben llenar las especificaciones siguientes:
- 4.2.3.7.1 Diámetro de filtro 47 mm, diámetro del poro promedio 0.45 ± 0.04 μm . Tamaños de poros alternos pueden ser usados si el fabricante provee información verificando el funcionamiento igual ó mejor que el del filtro de tamaño de poro de 45 μm . Por lo menos 70% del área del filtro debe ser poros.
- 4.2.3.7.2 El agua de laboratorio pura se difunde uniformemente a través de los filtros en 15 segundos sin puntos secos en los filtros cuando son suspendidos en el agua.
- 4.2.3.7.3 Una tasa de flujo de por lo menos 55 mL/min/cm² a 25°C y una presión diferencial de 93 kPa.
- 4.2.3.7.4 Filtros no tóxicos libres de sustancias inhibidoras ó estimulantes del crecimiento de bacterias y libres de materiales que directa ó indirectamente interfieren con los sistemas indicadores de bacterias en el medio; rejilla de la tinta no tóxica. El promedio aritmético de cinco conteos en los filtros debe ser por lo menos el 90% del promedio aritmético de los conteos en cinco placas de esparcimiento de agar usando los mismos volúmenes de muestra y medio ambiente del agar.
- 4.2.3.7.5 Filtros para retener los organismos en una suspensión de 100 mL de Serratia marcescens que contengan 1×10^3 células/mL.
- 4.2.3.7.6 Los extractables de agua en el filtro no pueden exceder 2.5% después de hervir en 100 mL de agua pura de laboratorio por 20 minutos.

tos, secándolos, enfriándolos y llevándolos a un peso constante.

- 4.2.3.7.7 El diámetro de la almohadilla absorbente 47 mm, grosor 0.8 mm, capaz de absorber 2.0 ± 0.2 mL caldo Endo.
- 4.2.3.7.8 Almohadillas deben liberar menos de 1 mg de la acidez total calculada como CaCO_3 , cuando han sido tituladas al punto final de fenolftaleína con 0.02 N NaOH.
- 4.2.3.7.9 El filtro y absorbente no deben ser degradados por la esterilización a 121°C por 10 minutos. La esterilidad puede ser comprobada por la ausencia de crecimiento cuando un filtro de membrana es puesto en una almohadilla saturada con caldo extracto de glucosa de triptoma ó agar extracto de glucosa triptona e incubados a 35°C por 24 horas.
- 4.2.3.8 Pruebas estandarizadas de filtros de membrana: Hay pruebas estandarizadas disponibles para evaluar la retención, recuperación extractables y las características de tasa de flujo de los filtros de membrana.

Algunos fabricantes proveen información más allá de la que es requerida por las especificaciones y certifica que sus membranas son satisfactorias para el análisis de agua. Ellos reportan la retención, tamaño del poro, ritmo del flujo, esterilidad, pH, porcentaje de recuperación, y los límites para los extractores químicos específicos orgánicos e inorgánicos.

Para mantener la calidad de control, inspeccionar cada lote de membrana antes de usarlo y al estar haciendo las pruebas para asegurar que son redondos y flexibles plegables, con líneas de rejilla no distorcionadas después de autoclave. Posterior a la incubación, las colonias deberán ser desarrolladas, con el color y la forma bien definidos como ha sido descrito por el procedimiento de prueba (ver la Sección 4.2.3.4). La tinta de la línea de rejilla no debe canalizar el crecimiento a lo largo de la línea de tinta y ni debe restringir el crecimiento de la colonia. Las colonias deberán estar distribuidas de una manera uniforme a través de la superficie de la membrana.

- 4.2.3.9 Medio del cultivo: Porque los métodos de cultivo dependen de un medio preparado apropiadamente, usar los mejores materiales disponibles y técnicos en la preparación del medio, almacenamiento y aplicación. Para el control de calidad, usar medios preparados comercialmente cuando sea disponible pero fijarse que dicho medio varía en calidad entre los fabricantes y aún de lote a lote del mismo fabricante.

Pedir el medio en cantidades que no duren más de un año. Cuando sea práctico, pedir el medio en cantidades de cuartos de libra (115g) en vez de botellas de una libra (454g) a fin de mantener la provisión sellada por el mayor tiempo posible. Anotar el tipo cantidad y la apariencia del medio recibido, número de lote, fe-

cha en que se recibió y abrió. Revisar el inventario trimestralmente para volver a hacer pedidos. Descartar medios que estén apelmazados, descoloridos ó tenga otro tipo de deterioro.

Porque las condiciones de temperatura, luz y humedad difieren entre laboratorios es imposible establecer límites absolutos de duración para botellas de medio que no han sido abiertas. Un límite conservador para botellas que no han sido abiertas en 2 años a la temperatura ambiental. Si las botellas del medio tienen más de un año, comparar la recuperación de los aislados de cultivos puros recientes y muestras naturales usando el medio viejo y otro lote que ha sido comprobado.

Usar las botellas abiertas de medio dentro en un período de 6 meses después de abrirse. Cuando las botellas han sido abiertas, almacenarlas en un desecador con puerta grande de bisagras, inmediatamente después del uso si la humedad ambiental es un problema.

- 4.2.3.9.1 Preparación de medio- Preparar el medio en recipientes que tengan por lo menos dos veces el volumen del medio que se está preparando. Revolver el medio, particularmente los agars, cuando se estén calentando. Evitar chamuscar ó rebalsar al hervir, usando un baño de agua hirviendo para pequeños grupos del medio y atendiendo continuamente a volúmenes más grandes calentados en un plato caliente ó hornilla de gas. Preferiblemente usar combinaciones de un plato caliente con agitador magnético. Identificar y poner la fecha al medio que ha sido preparado. Preparar todos los medios en agua desionizada ó destilada de calidad comprobada. Medir los volúmenes de agua y el medio con cilindros graduados ó pipetas aprobadas de alta calidad.

Para muestras potencialmente contaminadas, no usar pipetas de succión. Después de la preparación y almacenamiento, el medio agar puede ser derretido en agua hirviendo ó vapor.

Examinar el pH de una porción de cada medio después de la solución y de nuevo después de la esterilización. Anotar los resultados. Hacer ajustes menores en el pH (≤ 0.5 unidades de pH) con solución de NaOH ó HCl al pH especificado. Si la diferencia de pH es mayor, descartar el grupo preparado. Valores del pH incorrectos pueden indicar un problema con la calidad del agua destilada, deterioro del medio, ó preparación inapropiada. Revisar las instrucciones de la preparación y examinar el pH del agua. Si el pH del agua no es satisfactorio preparar un nuevo grupo de medio usando agua de una nueva fuente. Si el agua es satisfactoria, volver a hacer el medio y comprobarlo; si el pH está incorrecto de nuevo, preparar el medio a partir de otra botella.

Apuntar los problemas del pH en el libro de registros del medio y reportarlo al fabricante si el medio ha sido indicado como la fuente de error. Examinar el medio que ha sido preparado para ver si hay color no usual, oscurecimiento ó precipitación y ano-

tar las observaciones. Considerar las variaciones de tiempo de esterilización y temperatura como causas posibles de problemas. Si ocurre cualquiera de las anteriores, descartar el medio.

- 4.2.3.9.2 Esterilización- Exponer el medio a temperatura de esterilización por el tiempo mínimo especificado. Un autoclave de doble pared permite el mantenimiento de presión y temperatura total en la cubierta entre cargas y reduce la posibilidad de daños por calor. Seguir las instrucciones del fabricante para la esterilización de un medio específico. El tiempo de exposición requerido varía con la forma y tipo de material, tipo de medio, presencia de carbohidratos y volumen. El Cuadro 4.3 presenta detalles específicos sobre la hora y temperatura para la esterilización por autoclave.

Cuadro 4.3 Hora y Temperatura para la Esterilización por Autoclave.

MATERIAL	TIEMPO A 121°C
Filtros de membrana y almohadillas	10 min.
Medio que contenga carbohidratos (lauril triptoso, caldo BGB, etc.)	12-15 min.
Materiales contaminados y cultivos descartados	30 min.
Partes del filtro de membrana (envueltas), botellas de muestra de colección (vacías)	15 min.
Agua de dilución, 99 mL en botellas con tapón de rosca	15 min.
Volúmenes de agua de enjuague de 0.5 a 1 L	30 min.
Agua de enjuague de más de 1 L	Ajustar para el volumen; comprobar si hay esterilidad

Remover el medio esterilizado del autoclave tan pronto como la presión de la cámara llegue a cero. Nunca volver a autoclavar el medio.

Revisar la efectividad de la esterilización con cada pasada, usando suspensiones de esporas ó tiras (disponibles comercialmente). La esterilización a 121°C por 15 minutos mata las esporas; si el crecimiento de las esporas autoclavadas ocurre después de la incubación a 55°C, la esterilización fue inadecuada.

Esterilizar las soluciones ó medio que no pueden pasarse por autoclave por medio de filtración de membrana a través de un filtro de 0.22 um de diámetro de poro en un aparato de filtración estéril y receptor. Filtrar y distribuir el medio en un gabinete de seguridad ó una cubierta protectora si están disponibles. Esterilizar la cristalería (pipetas, cápsulas de petri, botellas de muestras) en un autoclave ó un horno a 170°C por 2 horas. Esterilizar el equipo, provisiones y otros materiales sólidos ó secos que son sensitivos al calor, exponiéndolos a óxido etileno es un esterilizador de gas. Usar tiras de esporas ó suspensiones disponibles comercialmente para comprobar la esterilización de calor seco y óxido etileno.

4.2.3.9.3

Uso de agars y caldos - Mantener los agars derretidos en un baño de agua de 44 a 46°C hasta que han sido usados pero no tenerlos allí por más de 3 horas. Para monitorear la temperatura del agar exponer una botella de agua ó medio a las mismas condiciones de calentamiento y enfriamiento que el agar. Insertar un termómetro en la botella de control para determinar cuando la temperatura está entre 44 y 46°C y adecuada para el uso en placas de Petri. Después de colocar el agar en las cápsulas de Petri, mantener las tapaderas levemente abiertas por lo menos 15 minutos para secar la superficie del agar.

Manejar los tubos de fermentación estériles con cuidado para evitar que quede aire atrapado en el interior de los tubos, el cual produce reacciones positivas falsas. Examinar los tubos recién preparados para determinar que no haya burbujas de gas.

4.2.3.9.4

Almacenamiento del medio - Preparar el medio estéril en cantidades que serán usadas dentro de los límites de tiempo de almacenamiento dados en el Cuadro 4.4. Si los medios de tubo de fermentación son refrigerados, incubarlos una noche antes del uso y examinar por si hay burbujas de gas positivas falsas. Preparar medios que serán almacenados por más de una semana en tubos ó frascos con tapón de rosca ó que estén tapados fuertemente para prevenir la pérdida de humedad. Si se colocó el agar de antemano en las cápsulas de Petri, sellarlas en bolsas plásticas y refrigerarlas para retener la humedad.

Para comprobar la pérdida de humedad en tubos con caldo de cultivo, marcar el nivel del líquido original en varios tubos de cada grupo y controlar la pérdida de humedad. Si la pérdida estimada excede el 10%, descartar los tubos. Proteger los medios que contienen tintes de la luz; si se observan cambios de color, descartar el medio.

Cuadro 4.4 Tiempo de Retención y Almacenamiento para los Medios Preparados

Medio	Tiempo de Retención
Filtro de membrana (MF) Caldo en frascos de tapón de rosca a 4°C	96 horas
Agar de MF en placas con cubierta apretada a 4°C	2 semanas
Agar ó caldo en tubos de tapón flojo a 4°C	1 semana
Agar ó caldo en tubos con tapón de rosca apretado a 4°C	3 meses
Cápsulas de Petri con agar colocado en bolsas plásticas selladas a 4°C	2 semanas
Volumen grande de agar en frasco ó botella con tapón de rosca apretado a 4°C	3 meses

Caldos y agars estériles preparados obtenidos en el comercio pueden ofrecer ventajas cuando los análisis se hacen intermitentemente, cuando no hay empleados disponibles para el trabajo de preparación, ó cuando el costo puede ser balanceado contra otros factores de la operación laboratorio. Comprobar el funcionamiento de estos medios de la manera descrita en la Sección 4.2.3.9.5 a continuación. Los límites de tiempo de retener los medios preparados se presentan en el Cuadro 4.4.

4.2.3.9.5 Control de calidad de los medios preparados - Mantener en un libro empastado el registro completo de cada grupo de medios preparados con el nombre del preparador y la fecha, nombre y número de lote del medio, cantidad de medio que ha sido pesado, volumen del medio preparado, tiempo de esterilización y temperatura, medidas y ajustes del pH, y preparaciones de componentes lábiles. Incluir comprobaciones de esterilidad y de control positivo y negativo de cultivo en todos los medios como se describe a continuación.

4.2.4 Procedimientos de Control de Calidad Analítico

4.2.4.1 Procedimientos generales de control de calidad:

4.2.4.1.1 Para exámenes de filtro de membrana, examinar la esterilidad del medio, los filtros de membrana, el agua de dilución y enjuague, cristalería y equipo, una vez durante cada serie de muestras usadas

do agua estéril como muestra.

- 4.2.4.1.2 Para cada lote de medios, examinar los procedimientos analíticos inoculando con cultivos de control conocidos negativos y positivos para el organismo (s) bajo examen (ver el Cuadro 4.5) para los ejemplos de cultivo de muestra.

Cuadro 4.5 Cultivos de Control Para Exámenes Microbiológicos

Grupo	Cultivo de Control	
	POSITIVO	NEGATIVO
Coliformes totales	<u>Escherichia coli</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
	<u>Enterobacter aerogenes</u>	<u>Pseudomonas sp.</u>
Coliformes fecales	<u>E. coli</u>	<u>E. aerogenes</u>
Estreptococos fecales	<u>Streptococcus faecalis</u>	<u>Streptococcus faecalis</u>
		<u>Staphylococcus aureus</u>
		<u>E. coli</u>

- 4.2.4.1.3 Hacer análisis duplicados en el 10% de las muestras y en por lo menos una muestra por examen.
- 4.2.4.1.4 En los laboratorios con más de un analista hacer que cada uno haga análisis paralelos en por lo menos una muestra positiva cada mes.
- 4.2.4.2 Medida de la precisión del método: Calcular la precisión de los análisis duplicados para cada tipo diferente de muestra examinado, por ejemplo: agua potable, agua ambiental, aguas negras, etc. de acuerdo al procedimiento siguiente:
- 4.2.4.2.1 Hacer análisis duplicados en las primeras 15 muestras positivas de un tipo específico. Hacer que cada pareja de duplicados sean analizados por el mismo analista, pero incluir a todos los analistas dentro del laboratorio. Reportar los análisis duplicados como D_1 y D_2 .
- 4.2.4.2.2 Calcular el logaritmo de cada resultado. Si cualquiera de la pareja de duplicados resulta en cero, 1.0 a ambos valores antes de calcular los logaritmos.
- 4.2.4.2.3 Calcular el rango (R) para cada pareja de duplicados transformados como la media (\bar{R}) de estos rangos. Ver el cálculo de la muestra en el Cuadro 4.6.

Cuadro 4.6 Cálculo de Criterios de Precisión

No.de muestra	Análisis duplicados		Logaritmos de los conteos		Rango de los logaritmos (R _{log}) (L ₁ - L ₂)
	D ₁	D ₂	L ₁	L ₂	
1	89	71	1.9494	1.8513	0.0981
2	38	34	1.5789	1.5315	0.0483
3	58	67	1.7634	1.8261	0.0627
.
.
.
14	7	6	0.8451	0.7782	0.0669
15	110	121	2.0414	2.0828	0.0414

$$\sum R_{log} = 0.71889$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R_{log}}{n} = \frac{0.71889}{15} = 0.0479$$

$$\text{Criterio de precisión} = 3.27 \bar{R} = 3.27 (0.0479) = 0.1566$$

4.2.4.2.4 De allí en adelante analizar el 10% de las muestras de rutina en forma duplicada. Transformar los duplicados como en la Sección 4.2.4.2.2 y calcular su rango. Si el rango es mayor de 3.27 \bar{R} , la variabilidad del análisis es excesiva. Determinar si la imprecisión incrementada es aceptable; si no lo es, descartar todos los resultados analíticos desde la última comprobación de precisión (ver Cuadro 4.7). Identificar y resolver el problema analítico antes de hacer más análisis.

4.2.4.2.5 Poner al día el criterio usado en la Sección 4.2.4.2.4 periódicamente repitiendo los procedimientos de las Secciones 4.2.4.2.1 a 4.2.4.2.3, usando las parejas más recientes de los resultados de 15 duplicados.

Quadro 4.7 Comprobaciones Diarias en la Precisión de Conteos Duplicados *

Fecha de análisis	Análisis Duplicados		Logarítmos de los conteos		Rango de los logarítmos	Aceptación del Rango **
	D ₁	D ₂	L ₁	L ₂		
8/29	71	65	1.8513	1.8129	0.0383	A
8/30	110	121	2.0414	2.0828	0.0414	A
8/31	73	50	1.8633	1.6990	0.1643	I

* Criterio de precisión = $(3.27 \bar{R}) = 0.1566$

** A = Aceptable I = Inaceptable

4.2.4.3 Control de calidad en los procedimientos de filtro de membrana:

4.2.4.3.1 Verificación de la colonia - Para cada tipo de prueba que se ha llevado a cabo, verificar las colonias mensualmente a partir de una muestra positiva conocida. Si el laboratorio tiene 2 ó más analistas, cada uno debe contar colonias típicas en la misma membrana a partir de una muestra positiva por mes. Verificar las colonias en la membrana y comparar el conteo de los analistas al conteo verificado.

4.2.4.3.2 Análisis de coliformes totales - Verificar recogiendo por lo menos 10 colonias y examinándolas por si hay fermentación de lactosa ó alternativamente por pruebas bioquímicas rápidas ó sistemas de pruebas múltiples:

Para las muestras de agua potable, verificar todas las colonias brillantes contadas como coliformes cuando este número es $\leq 10/100$ mL. Cuando el número excede 10/100 mL, recoger al azar y verificar por lo menos 10 colonias representativas de todos los tipos brillantes. Si no resulta ningún positivo de los exámenes de muestras de agua potable, analizar por lo menos una positiva conocida de agua trimestralmente.

i) Fermentación de lactosa - Transferir el crecimiento de por lo menos 10 colonias brillantes contadas como coliformes a tubos de caldo de bilis de triptosa de lauril y lactosa verde brillante. Incubar a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y examinarlos para la producción de gas a 24 y 48 horas.

Si solo el tubo de triptosa de lauril de una colonia en particular produce gas, transferir el crecimiento del tubo positivo a otro tubo de caldo de bilis de lactosa verde brillante y volver a probarlo. La producción de gas en caldo de bilis de lactosa verde brillante en 48 horas verifica los organismos de coliformes totales y excluye a los resultados falsos positivos.

Idealmente escoger por lo menos 10 colonias que no sean productoras de brillo para verificar que no ocurren reacciones negativas falsas.

- 2) Pruebas bioquímicas alternativas - Estas pruebas requieren usar colonias aisladas (separadas por más de 2mm) y colonias puras. Si se sospecha de una colonia mixta, rayar el crecimiento en el medio M-Endo y escoger una colonia aislada ó usar el método de tubo de fermentación descrito anteriormente.
- 3) Prueba rápida - Ejecutar la prueba de citocromo oxidasa (CO) para indofenol y la prueba de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) para β -D-galactosidasa como se describe abajo. Un equipo para estas pruebas está disponible comercialmente. Una prueba negativa de CO y positivo de ONPG verifica que la colonia es colifome.

Pruebas de citocromo oxidasa - Usar tiras de papel preparadas comercialmente ó un nutriente de agar inclinado. Inocular el nutriente de agar inclinado e incubarlo a 35°C por 18 a 24 horas. No usar los cultivos viejos. Preparar los Reactivos A y B.

- o Reactivos A: Disolver 1 g de alfa-naftalina en 100 mL de etanol al 95%.
- o Reactivo B: Disolver 1 g para-amino-dimetilamina hidrocioruro (ó oxilato) en 100 mL de agua pura de laboratorio.

Preparar frecuentemente y almacenarlos en el refrigerador.

Agregar 2 a 3 gotas de los Reactivos A y B a la placa, inclinarla para mezclar, y leer la reacción en dos minutos. Una reacción positiva fuerte (color azul) ocurre en 30 segundos. Ignorar las reacciones débiles que ocurren después de 2 minutos.

Prueba ONPG.- Preparar las soluciones de reactivos:

- o Solución de fosfato de monosodio, 1.0M: Disolver 6.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 45 mL de agua pura de laboratorio. Agregar 3 mL de NaOH al 3% y ajustar el pH a 7.0. Diluir a 50 mL y almacenar en el refrigerador.
- o Solución ONPG: Diluir 80 g o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) en 15 mL de agua a 37°C. Agregar 5 mL de 1M NaH_2PO_4 ; la solución debe ser incolora. Almacenada en el refrigerador. Antes de usarla calentar a 37°C una porción suficiente para el número de pruebas que se realizarán.

Emulsificar una cantidad suficiente de cada cultivo inclinado de 18 a 24 horas en un tubo de fermentación de 10 por 75 mm ó en una placa. Agregar una gota de azuleno a cada tubo y agitar lo bien. Dejar los tubos por 5 minutos en un baño María a 35°C. Agregar 0.25 mL de solución ONPG amortiguada a cada tubo y volver a incubar en un baño María de 35°C. Leer los tubos ó placas en 0.5, 1, y 24 horas. Un resultado positivo es indicado por el desarrollo del color amarillo.

4) Sistemas de pruebas múltiples - Inocular a partir de la colonia en un sistema de pruebas múltiples obtenido comercialmente que incluya fermentación de lactosa y/o pruebas de CO y ONPG.

4.2.4.3.3 Análisis de coliformes fecales - Verificar recogiendo por lo menos 10 colonias aisladas de membranas que contienen colonias azules típicas y transfiriéndolas a caldo de lauril triptosa. Incubar a 35°C por 24 y 48 horas y examinar para ver si hay producción de gas. Transferir el crecimiento de los tubos positivos a caldo EC e incubar a 44.5°C por 24 horas. La producción de gas en EC verifica la presencia de organismos coliformes fecales.

4.2.4.3.4 Análisis para estreptococos fecales - Verificar recogiendo por lo menos 10 colonias de color rosado ó rojo aisladas y transfiriéndolas a un agar y caldo de infusión cerebro corazón (BHI). Hacer la prueba de catalasa en los cultivos de 24 horas. Transferir los cultivos de catalasa negativos (posiblemente estreptococos fecales) a caldo de bilis BHI al 40% e incubarlos a 35°C. Transferirlos también al caldo BHI e incubarlos a 45°C. El crecimiento en bilis al 40% y a 45°C verifican estreptococos fecales.

4.2.5 Registros y Datos

Guardar los registros de análisis microbiológicos por lo menos 5 años. Informes de laboratorio actuales se pueden guardar, ó los datos pueden ser transferidos a resúmenes tabulados, con tal de que la siguiente información sea incluida: Fecha, lugar y hora del muestreo, nombre del colector de la muestra; identificación de la muestra; fecha del recibo de la muestra y del análisis; persona(s) responsable (s) de hacer los análisis; método analítico utilizado; y resultados del análisis. Verificar que cada resultado sea indicado correctamente en la hoja de laboratorio y que tenga las iniciales del analista. Si se usa un sistema de almacenar y retirar la información por computadora revisar dos veces los datos en los impresos.

4.2.6 Manejo de Datos

4.2.6.1 Distribución de poblaciones bacterianas: En la mayoría de análisis químicos la distribución de los resultados analíticos se guía por la curva Gaussian la cual tiene distribución simétrica de valores alrededor de la media. La distribución de microbios no es necesariamente simétrica. Los conteos bacterianas a veces se caracterizan por tener una distribución desviada de la curva normal debido

a muchos valores bajos y unos pocos altos. Estas características guían a una media aritmética que es considerablemente más grande que la mediana. La curva de frecuencia de esta distribución tiene una cola derecha larga como se ve en la Figura 4.1 y se dice que exhibe una desviación positiva.

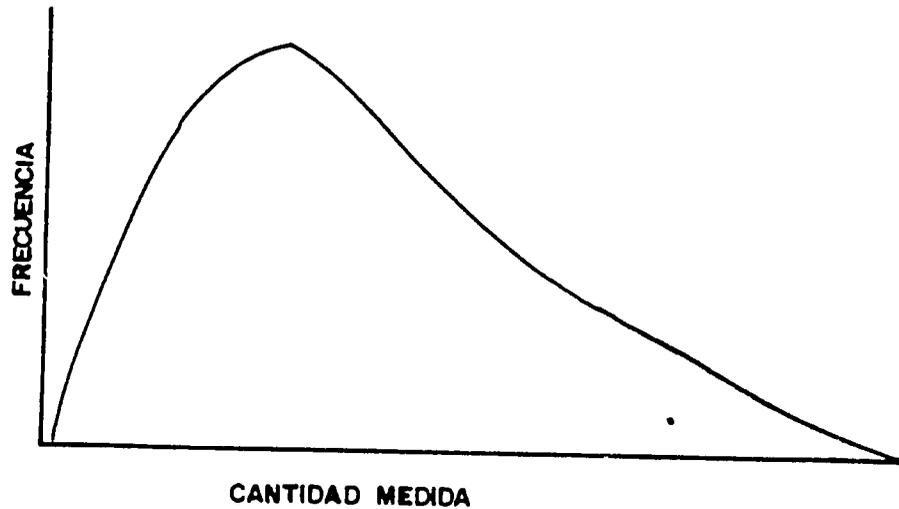


Figura 4.1. Curva de Frecuencia (Distribución desviada positivamente)

Aplicación de las técnicas estadísticas más rigurosas requiere de la asunción de distribuciones simétricas tales como la curva normal. Por eso es normalmente necesario convertir datos desviados para que resulte una distribución simétrica parecida a la distribución normal. Una distribución normal apropiada se puede obtener de datos positivamente desviados convirtiendo los números a sus logaritmos como se ve en el Cuadro 4.8.

Cuadro 4.8. Conteos de Coliformes y sus Logaritmos

Conteo de Coliformes No./100 mL	Log.Conteo
11	1.041
27	1.431
36	1.556
48	1.681
80	1.903
85	1.929
120	2.079
130	2.114
136	2.134
161	2.207
317	2.501
601	2.779
760	2.881
1020	3.009
3100	3.491

$$\bar{x} = 442$$

$$\bar{X}_g = \text{antilog } 2.1825 = 152$$

Comparación de los Cuadros de Frecuencia para los datos originales y sus logaritmos (Cuadros 4.9 y 4.10) demuestran que los logaritmos se aproximan a una distribución simétrica.

Cuadro 4.9. Comparación de la Frecuencia de Datos de Conteo

Intervalo de Clase			Frecuencia (conteo)
0	a	400	11
400	a	800	2
800	a	1200	1
1200	a	1600	0
1600	a	2000	0
2000	a	2400	0
2400	a	2800	0
2800	a	3200	0

Cuadro 4.10. Comparación de Frecuencia de Datos de Log Conteo

Intervalo de Clase			Frecuencia (Log Conteo)
1.000	a	1.300	1
1.300	a	1.600	2
1.600	a	1.900	1
1.900	a	2.200	5
2.200	a	2.500	1
2.500	a	2.800	2
2.800	a	3.100	2
3.100	a	3.400	0
3.400	a	3.700	1

4.2.6.2

Medidas de tendencia central de distribución desviada: Si los logaritmos de números de una distribución desviada positiva están aproximadamente normalmente distribuidas, los datos originales tienen una distribución log-normal. El mejor estimado de tendencia central de datos de log-normal es la media geométrica, definida como:

$$\bar{X}_g = \sqrt[n]{(X_1)(X_2)\dots(X_n)}$$

y

$$\text{Log } \bar{X}_g = \frac{\sum (\text{log } X_i)}{n}$$

eso es, la media geométrica es igual al antilogaritmo de la media aritmética de los logaritmos.

Aunque las regulaciones ó tradición pueden requerir ó causar que los datos microbiológicos sean reportados como la media ó mediana aritmética, la estadística preferida para resumir datos microbiológicos es la media geométrica.

4.3

Aparatos de Laboratorio

Además de las especificaciones dadas en las Secciones 4.2.2 y 4.2.3.

4.3.1

Incubadoras

Las incubadoras deben mantener una temperatura uniforme y constante a todo momento en todas las áreas, eso es que no deben variar en más de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en las áreas usadas. Obtener esa exactitud usando un incubador rodeado de agua o del tipo anhidrico con unidades de calor eléctricas de temperatura baja controladas termostáticamente que son apropiadamente aisladas y localizados en o adyacentes a las paredes o pisos de la recámara y preferiblemente equipadas con medios mecánicos de circulación del aire.

Mantener un termómetro exacto, con el bulbo inmerso en líquido (glicerina, agua o aceite mineral) en cada estante en uso dentro del incubador y apuntar la lectura diaria de temperatura (preferiblemente mañana y tarde). Además es deseable mantener un termómetro de temperatura máxima y mínima dentro del incubador en el estante de medio para registrar el rango de temperatura bruta en un período de 24 horas. A intervalos, determinar las variaciones de temperatura dentro del incubador cuando esté lleno a la capacidad máxima. Instalar un termómetro registrador (termógrafo) cuando sea posible, para mantener un registro continuo y permanente de la temperatura.

Un baño María con una cubierta para reducir pérdida de agua y calor o un incubador tipo lavabo de calor sólido, normalmente es requerido para mantener una temperatura de $44.5 \pm 0.20^{\circ}\text{C}$. Si no se alcanza un control de temperatura satisfactorio, poner el agua a recircularse. Mantener la profundidad del agua en el incubador suficiente para sumergir los tubos al nivel superior del medio.

4.3.2

Hornos Esterilizadores de Aire Caliente

Usar hornos esterilizadores de aire caliente de tamaño suficiente para prevenir amontonamiento interno; construídos para proveer temperaturas de esterilización uniformes y adecuadas de $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ y equipados con termómetros adecuados. Opcionalmente usar un instrumento registrador continuo de temperatura.

4.3.3

Autoclaves

Usar autoclaves de suficiente tamaño para prevenir amontonamiento interno; construídas para proveer temperaturas uniformes dentro de las recámaras (hasta incluyendo la temperatura de esterilización de 121°C): equipado con un termómetro exacto cuyo bulbo esté localizado apropiadamente en la línea de escape para poder registrar la temperatura mínima dentro de las recámaras de esterilización (el instrumento registrador continuo de temperatura es opcional); equipado con un calibrador de presión y válvulas de seguridad ajustadas apropiadamente que estén conectadas directamente con líneas de abastecimiento saturadas de vapor o directamente a un generador de va-

por especial adecuado (no se debe usar vapor por un hervidor que ha sido tratado con aminal para el control de la corrosión); y que sea capaz de alcanzar la temperatura deseada en 30 minutos.

El uso de una autoclave vertical u olla de presión solamente se usa en una emergencia o circunstancias especiales por la dificultad de ajustar y mantener la temperatura de esterilización y por el peligro potencial. En caso de tener que usar este equipo, equiparlo con un calibrador de presión eficiente y un termómetro cuyo bulbo esté 2.5 arriba del nivel del agua.

4.3.4 Contadores de Colonias

Usar un contador de colonia de tipo Quebec, siendo preferido uno con fondo oscuro, o uno que provea una magnificación equivalente (15 diámetros) y visibilidad satisfactoria.

4.3.5 Equipo de pH

Usar pH metros electrónicos, exactos en por lo menos 0.1 unidades de pH, para determinar los valores de pH del medio.

4.3.6 Balanzas

Usar balanzas que provean sensibilidad de por lo menos 0.1 g en una carga de 150 g con pesos apropiados. Usar una balanza analítica que tenga una sensibilidad de 1 mg bajo una carga de 10 g para pesar cantidades pequeñas de materiales (menores de 2 g). Las balanzas de un solo plato y pesado rápido son las más convenientes.

4.3.7 Utensilios de Preparación del Medio

Usar vidrio borosilicato u otro equipo no corrosivo adecuado, tal como acero inoxidable. Usar cristalería que esté limpia y libre de residuos, agar, secado u otros materiales foráneos que puedan contaminar el medio.

4.3.8 Pipetas y Cilindros Graduados

Usar pipetas de cualquier tamaño conveniente, con tal de que ellas proporcionen el volumen exacto y rápidamente. El error de calibración de el lote de cualquier fabricante no debe exceder el 2.5%. Usar pipetas que tengan graduaciones marcadas distintivamente y sin los puntos quebrados. Usar cilindros graduados de los más exactos que se pueda obtener.

4.3.9 Recipientes de Pipetas

Usar cajas de aluminio ó acero inoxidable de bases de 5.0 a 7.5 cm cilíndricas ó rectangulares y de una longitud de aproximadamente 40 cm. Cuando estos no son disponibles, pueden ser sustituidos por envoltura de papel. Para evitar carbonización excesiva durante la esterilización usar papel de pulpa de sulfato (Kraft) de la mejor calidad. No usar cobre, cajas ó latas de alea

ciones de cobre, como recipientes de pipetas.

4.3.10 Botellas ó tubos de dilución

Usar botellas ó tubos de vidrio resistente, preferiblemente vidrio borosilicato, cerrados con tapones de vidrio ó tapas de rosca equipados con forros que no produzcan compuestos tóxicos ó bacteriostáticos en la esterilización. No usar algodón como tapones. Marcar los niveles de graduación indeleblemente en el lado de la botella ó tubo de dilución. Botellas plásticas de material que no sea tóxico y tamaño aceptable pueden ser sustituidas por vidrio con tal de que puedan ser esterilizados apropiadamente.

4.3.11 Cápsulas de Petri

Para el conteo de placa, usar cápsulas de petri de vidrio ó plástico de 100 x 15 mm. Usar cápsulas cuyos fondos estén libres de burbujas y rayones y que sean planos para que el medio sea de grosor uniforme en toda la placa. Para la técnica de filtro de membrana usar placas de vidrio ó plástico de tapadera floja, 60 x 15 mm. ó cápsulas de petri y almacenarlas en latas de metal (aluminio ó acero inoxidable, pero no cobre) ó envolverlos en papel preferiblemente de pulpa de sulfato de la mejor calidad (Kraft) antes de esterilizar.

4.3.12 Botellas de muestreo

Para los muestreos bacteriológicos usar botellas esterilizadas de vidrio ó plástico de cualquier tamaño ó forma adecuada. Usar botellas que tengan un volumen suficiente de muestra para todas las pruebas requeridas y un espacio de aire adecuado, que permitan un lavado adecuado y que mantengan a las muestras sin contaminación hasta que se terminen los exámenes. Botellas con tapones de vidrio molido, preferiblemente de boca amplia y de vidrio resistente, son recomendados. Botellas de plástico de tamaño adecuado, de boca amplia y hechas de materiales que no sean tóxicos tales como polipropileno que puedan ser esterilizadas repetidamente son satisfactorias como recipientes de muestras. Bolsas de plástico que han sido esterilizadas con ó sin un agente desclorinante pueden obtenerse comercialmente y pueden ser usadas. El usar recipientes de plástico elimina la posibilidad de que se quiebren durante el embarque y reduce el peso de embarcado.

Cierres de metal ó plástico de tapa de rosca con forros pueden ser usados en las botellas de muestra con tal de que no se produzcan compuestos tóxicos en la esterilización.

Antes de la esterilización cubrir las tapas y cuellos de las botellas de muestra que tengan cierres de vidrio con papel aluminio ó papel Kraft pesado.

Limpiar toda la cristalería con mucho cuidado con un detergente adecuado y agua caliente, enjuagarlo con agua caliente para remover todos los trazos de compuesto de lavado residual y finalmente enjuagarlo con agua pura de laboratorio. Si se usan lavadoras de cristalería mecánicas, equiparlas con tubería afluyente de acero inoxidable u otro material no tóxico para el sistema de agua de enjuague.

Esterilizar la cristalería, excepto cuando están en recipientes de metal, durante por lo menos 60 minutos a una temperatura de 170°C, a menos que se sepa mediante termómetros de registro continuo que las temperaturas de los hornos son uniformes y bajo dichas condiciones excepcionales usar 160°C durante por lo menos 2 horas.

Esterilizar las botellas de muestra que no sean de plástico igual que arriba ó en una autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para las botellas plásticas aflojar las tapaderas antes de hacer autoclave para prevenir la distorsión.

4.5 Preparación del Medio de Cultivo

4.5.1 Procedimientos Generales

4.5.1.1 Almacenamiento del medio de cultivo: Almacenar el medio deshidratado (polvos) en botellas que estén bien cerradas, en la oscuridad, a menos de 30°C en una atmósfera de humedad baja. No usarlos si se decoloran ó se vuelven compactos y pierden el carácter de un polvo suelto. Comprar el medio deshidratado en pequeñas cantidades que serán usadas dentro de 6 meses después de haber sido abierto. Adicionalmente, usar existencias de medio deshidratado que contengan agentes selectivos tales como sales de bilis ó derivados antibióticos, amino ácidos que contengan sulfuro, etc., de número de lote relativamente reciente(dentro de un año de la compra) para mantener una selectividad óptima. Ver también la Sección 4.2.

Preparar el medio de cultivo en grupos de un tamaño de tal manera que el grupo entero pueda ser usado en menos de una semana. Sin embargo, si los medios están contenidos en tubos con tapa de rosca pueden ser almacenados hasta por 3 meses. Ver Cuadro 4.4 para los detalles específicos. Almacenar el medio a la sombra y evitar la contaminación y la evaporación excesiva.

4.5.1.2 Ajuste de la Reacción

Expresar la reacción del medio de cultivo a términos de concentración de iones de hidrógeno expresado como pH.

El aumento en la concentración de iones de hidrógeno (disminución de pH) durante la esterilización variará levemente con el esterilizador individual que se esté usando, y la reacción inicial requerida para obtener la reacción final correcta, tendrá que ser determinada. La disminución en pH normalmente será 0.1 a 0.2, pero ocasionalmente será tan grande como 0.3 en el medio de doble concentración. Cuando sales amortiguantes tales como fosfatos están presentes en el medio la disminución en el valor del pH serán imperceptible.

Hacer pruebas con un pH metro para controlar el ajuste hasta la concentración de iones de hidrógeno requerida. Titular el volumen conocido de medio con una solución de NaOH al pH deseado. Calcular la cantidad de NaOH que tiene que ser agregada al resto del medio para alcanzar esta reacción. Después de agregarla y revolverla bien, examinar la reacción y ajustarla si es necesario. El pH final requerido está dado en las instrucciones para preparar cada medio. Si un pH específico no ha sido prescrito, el ajuste es innecesario.

El pH del medio deshidratado reconstituido, raras veces requerirá ajuste si se hace de acuerdo a las instrucciones. Factores tales como errores en el pesado del medio deshidratado ó sobrecalentamiento del medio reconstituido pueden producir un pH final inaceptable. Medir regularmente el pH, especialmente del medio selectivo rehidratado, para asegurar el control de calidad y las especificaciones del medio.

4.5.1.3 Esterilización

Después de rehidratar un medio, dispersarlo rápidamente a recipientes de cultivos y esterizarlo dentro de 2 horas. No refrigerar o de otra manera almacenar el medio que no se haya esterilizado.

Esterilizar todos los medios, excepto los caldos de azúcar u otros caldos con otras especificaciones, en un autoclave a 121°C por 15 minutos después de que la temperatura haya alcanzado 121°C. Cuando la presión llegue a cero remover el medio del autoclave y enfriarlo rápidamente para evitar la descomposición de los azúcares por la prolongada exposición al calor. Para permitir calentamiento uniforme y enfriamiento rápido, empacar los materiales flojamente y en recipientes pequeños. Esterilizar los caldos de azúcar a 121°C por 12 a 15 minutos. El tiempo máximo que los caldos de azúcar pueden estar expuestos a cualquier calor (desde el momento de cerrar el autoclave cargado al momento de descargar) es 45 minutos. Precalear el autoclave antes de cargarlo para reducir el tiempo total necesario de calentamiento dentro del límite de 45 minutos.

4.5.2 Agua

Para preparar el medio de cultivo y los reactivos, usar solamente agua destilada o desmineralizada que haya sido probada y encontrada libre de metales disueltos y compuestos bactericidas o inhibidores. La toxicidad en el agua destilada puede derivarse de alguna fluorinada alta en sílice. Otras fuentes de toxicidad son la plata, el plomo y varios complejos orgánicos no identificados. Donde el retorno condensado es usado como alimento para una destiladora, aminos tóxicos u otros compuestos del hervidor pueden estar presentes en el agua destilada. Cloro o cloraminas residuales también pueden ser encontrados en el agua destilada que ha sido preparada a partir de abastecimientos de agua clorada. Si se encuentran compuestos de cloro en el agua destilada, neutralizarlos agregando una cantidad equivalente de tiosulfato de sodio o sulfito de sodio.

El agua destilada también debe estar libre de nutrientes contaminantes. Dicha contaminación puede derivarse de químicos orgánicos durante la destilación, uso continuo de lechos de filtro de carbón exhaustos, columnas desionizadas que necesitan ser recargadas, residuos de la fusión de la soldadura en tubería nueva, polvo y gases químicos y el almacenamiento del agua en botellas que no están limpias. Almacenar el agua destilada fuera de la luz solar directa para prevenir el crecimiento de algas. Ver la Sección 4.2.3.4 para la prueba de conveniencia del agua destilada.

4.5.3 Especificaciones del Medio

La necesidad de uniformidad dicta el uso de medios deshidratados. Nunca preparar medios de ingredientes básicos cuando haya medio deshidratado disponible. Seguir las instrucciones del fabricante para la rehidratación y esterilización. Medio preparado comercial

mente en forma líquida (ampollas estériles u otro) también puede ser usado si se sabe que da resultados equivalentes.

Los términos utilizados para la fuente de proteínas en la mayoría de los medios, por ejemplo peptona, triptona, triptosa, fueron llamados por los desarrolladores del medio y pueden referirse a productos comerciales en vez de entidades claramente definidas. No debe prevenir el uso de materiales alternativos siempre cuando ellos produzcan resultados equivalentes.

NOTA: El término de "solución de por ciento" usado en estas instrucciones se debe entender como "gramos de soluto por 100 mL de solución."

4.5.3.1 Agua de dilución

4.5.3.1.1 Agua amortiguador: Para preparar la solución amortiguador de fosfato existente, disolver 34.0 g de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 ± 0.5 con 1N hidróxido de sodio (NaOH) y diluirlo a 1L con agua destilada.

Agregar 1.25 mL de solución amortiguadora existente de fosfato y 5.0 mL de solución de cloruro de magnesio (81.1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /L de agua destilada a 1 L de agua destilada. Repartir en cantidades que provean 99 ± 2.0 mL ó 9 ± 0.2 mL después de autoclavar por 15 minutos.

4.5.3.1.2 Agua peptona: Preparar una solución al 10% de peptona en agua destilada. Diluir un volumen medido para proveer una solución final de 0.1%. El pH final deberá ser 6.8.

Repartir en cantidades que provean 99 ± 2.0 mL ó 9 ± 0.2 mL después de autoclavar por 15 minutos.

No mantener bacterias de cualquier agua de dilución por más de 30 minutos a la temperatura ambiental porque puede ocurrir muerte ó multiplicación.

4.5.3.2 Medio del cultivo

Las especificaciones para los medios individuales están incluidos en las secciones subsiguientes. Se proveen detalles donde el uso de un medio se describe primero.

4.6

Muestreo

Hacer exámenes bacteriológicos de muestras colectadas en puntos representativos a través de toda la cuenca.

Es importante examinar muestras repetidas de un punto designado, así como muestras de un número ampliamente distribuido de puntos de muestreo. Tomar las muestras a intervalos de tiempo que estén razonablemente espaciados uniformemente.

Para la técnica de filtro de membrana, el número máximo de organismos coliformes permisibles está presentado en términos de volumen de porción estándar (100 mL). El límite de calidad del agua es 1 colonia de coliformes por 100 mL.

4.6.1 Colección

4.6.1.1 Recipientes

Colectar las muestras para el examen microbiológico en botellas que hayan sido depuradas y enjuagadas cuidadosamente, dándoles un enjuague final con agua destilada y esterilizadas como se describe en las Secciones 4.3 y 4.4. Para algunas aplicaciones las muestras pueden ser colectadas en bolsas de plástico pre-esterilizadas.

4.6.1.2 Desclorización

Agregar un agente reductor a los recipientes que se usan para la recolección de agua que tenga cloro residual u otro halógeno a menos que los recipientes contengan caldo para la siembra directa de la muestra. El tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) es un agente desclorificante que neutraliza a cualquier halógeno residual y previene la continuación de la acción bacteriana durante el tránsito de la muestra. El examen entonces indicará más exactamente el contenido microbiano verdadero del agua en el momento del muestreo.

Agregar suficiente $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a la botella limpia antes de la esterilización para dar una concentración cerca de 100 mg/L en la muestra. A una botella de 120 mL agregar 0.1 mL solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% (esto neutralizará una muestra que contenga cerca de 15 mg/L de cloro residual). Tapar la botella y esterilizarla con calor seco ó con calor húmedo.

4.6.1.3 Procedimientos de muestreo

Quando se colecta la muestra, dejar un espacio amplio de aire en la botella (por lo menos 2.5 cm) para facilitar la mezcla por sacu dimiento antes del examen. Tomar muestras que sean representativas del agua que se examinará y usar técnicas asépticas para evitar la contaminación de las muestras.

Mantener la botella de muestra cerrada hasta que se llena. Remover la tapadera y el tapón, si existen los dos, como una sola unidad; no contaminar la superficie interior del tapón ó tapadera ó el cue

llo de la botella. Llenar la botella sin enjuagarla, colocar el tapón ó tapadera inmediatamente, y si se usa, asegurar la cubierta alrededor del cuello de la botella.

- 4.6.1.3.1 Agua potable: Si la muestra de agua será tomada de un grifo de un sistema de distribución sin accesorio, seleccionar un grifo que abastece agua de un tubo de servicio que esté conectado directamente a la tubería principal y que no esté por ejemplo atendida por una cisterna ó tanque de almacenamiento. Abrir el grifo del todo y dejar correr el agua por 2 ó 3 minutos, ó por tiempo suficiente para permitir el limpiado de la línea de servicio. Reducir el flujo del agua para permitir llenar las botellas sin salpicaduras. No tomar la muestra de grifos que goteen o que permitan el flujo del agua hacia afuera del grifo.

Al tomar la muestra de una llave de mezclado (agua caliente y agua fría), quitar los accesorios de la llave por ejemplo el colador, etc., dejar correr el agua caliente por 2 minutos, después el agua fría por 2 a 3 minutos, y luego coleccionar la muestra como se indica arriba.

Si la muestra será tomada de un pozo que tenga una bomba de agua manual, bombear el agua y dejarla derramar por 5 minutos antes de coleccionar la muestra. Si el pozo está equipado con una bomba mecánica, coleccionar la muestra de un grifo. Si no hay máquinas de bombear, coleccionar una muestra directamente del pozo por medio de una botella esterilizada que tenga un peso en la base; tratar de evitar contaminar las muestras con nata ó espuma superficial.

- 4.6.1.3.2 Abastecimiento de agua cruda: Al coleccionar la muestra directamente de un río, arroyo, lago, embalse, nacimiento ó pozo poco profundo, obtener las muestras que sean representativas del agua que es la fuente de abastecimiento para los consumidores. No es deseable tomar muestras muy cerca de la orilla ó muy lejos del punto de toma ó a una profundidades superior ó inferior del punto de toma.

La localización de los lugares de muestreo y la frecuencia de muestreo son factores críticos para obtener información confiable acerca de la contaminación bacteriana en cualquier cuerpo de agua. Coleccionar la muestra de una localización y profundidad representativas.

- 4.6.1.3.3 Aguas de superficie: Para estudios extensivos de ríos y arroyos para determinar la fuente y la extensión de la contaminación, tomar muestras representativas considerando el lugar, método y hora del muestreo.

El número de sitios de muestreo normalmente representa un término medio basado en las limitaciones físicas del laboratorio, la detección de picos de contaminación y la frecuencia de la colección de muestreo. El número de muestras que serán procesadas depende de sí el objetivo del estudio es medir ciclos de contaminación inmediata, la duración de la contaminación máxima ó la contaminación promedia probable. Los lugares para medir la contaminación cíclica

y su duración están inmediatamente abajo de la fuente de contaminación. Tomar las muestras tan frecuentemente como sea posible, consistente con las necesidades.

Seleccionar un lugar designado para medir las condiciones de la contaminación promedia estimada, a suficiente distancia aguas abajo para asegurar la mezcla completa del contaminante y el agua. La toma de muestras en estos puntos no elimina todas las variaciones posibles pero minimizará cualquier fluctuación brusca en la calidad. El muestreo aguas abajo no se necesita hacer tan frecuentemente como el muestreo de contaminación cíclica.

Colectar las muestras a un cuarto, a la mitad y a tres cuartos del ancho de la corriente en cada lugar ó a otras distancias dependiendo de los objetivos del estudio. Evitar las áreas de estancamiento relativo. Frecuentemente se colecta una sola muestra, tomada cerca de la superficie, en el canal de la corriente.

4.6.1.3.4 Playas para bañistas: Colectar las muestras de agua de playa para bañistas en los lugares y a la hora de mayor número de bañistas; en lugares naturales para bañarse, incrementar la frecuencia de muestreo durante los períodos de escorrentía de tormenta en la temporada de baños (verano, vacaciones).

4.6.1.3.5 Muestreo Manual: Tomar muestras de un río corriente, lago ó embalse, sosteniendo la botella cerca de su base en la mano y sambuyéndola con el cuello hacia abajo, bajo la superficie. Invertir la botella hasta que el cuello apunte apenas hacia arriba y la boca esté dirigida hacia la corriente. Si no hay corriente, como en el caso de una presa, crear una corriente artificialmente empujando la botella hacia adelante horizontalmente en una dirección que se aleje de la mano. Cuando se toman muestras de una lancha, obtener las muestras del lado del barco que esté aguas arriba. Si no es posible colectar muestras de estas situaciones en esta manera, ponerle un peso a la base de la botella y bajarlo al agua. En cualquier caso, tratar de evitar tener contacto con la orilla ó el lecho de la corriente, porque puede ocurrir ensuciamiento del agua.

4.6.1.3.6 Aparato de muestreo: Un aparato especial que permita remover mecánicamente el tapón de la botella bajo la superficie del agua, es requerida para colectar muestras de profundidad de un lago ó embalse. Hay varios tipos de aparatos de muestreo disponibles. El más común es el muestrador Zobell J-Z, el cual usa una botella estéril de 350 mL y un tapón de hule a través del cual ha sido pasado un pedazo de tubo de vidrio. Este tubo está conectado a otro pedazo de tubo de vidrio por medio de una manguera de hule conectora. La unidad está montada en un marco de metal que contiene un cable y un mensajero. Cuando el mensajero es liberado, le pega a la tubería de vidrio en un punto que ha sido levemente debilitado con una lima. El tubo de vidrio se quiebra por medio del mensajero y la tensión que ha sido montada por la manguera de hule conectora en liberada y la tubería oscila hacia el lado. El agua es succionada hacia la botella, como una consecuencia del vacío parcial creado sellando la unidad a la hora del autoclavado. Adaptaciones comercia

les de este muestrador y otros son obtenibles.

Muestreo de sedimento del fondo también requiere un aparato especial. El muestrador descrito por Van Donsel y Geldreich, ha sido efectivo para una variedad de materiales de fondo para el muestreo remoto (agua profunda) ó manual (agua poco profunda). Construir este muestrador preferiblemente de acero inoxidable y encajado con una bolsa plástica estéril. Una cuerda de nylon cierra a la bolsa después de que el muestrador penetra el sedimento. Una barra deslizadora mantiene a la bolsa cerrada durante el descenso y es abierta, así abriendo la bolsa, durante el muestreo de sedimento.

Para el muestreo de aguas negras ó efluentes las técnicas descritas arriba generalmente son adecuadas; además ver la Sección 1.4.

4.6.1.4 Tamaño de la muestra

El volumen de la muestra debe ser suficiente para llevar a cabo todas las pruebas requeridas, preferiblemente no menos de 100 mL.

4.6.1.5 Datos de identificación

Acompañar a las muestras con datos de identificación y descripción completos. No aceptar para el examen muestras identificadas inadecuadamente.

4.6.2 Preservación y Almacenamiento

Empezar el examen microbiológico de una muestra de agua inmediatamente después de la colección para evitar cambios imposibles de predecir. Si las muestras no se pueden procesar dentro de una hora después de ser colectadas, usar una hielera con hielo para su almacenamiento durante el transporte al laboratorio. Si se sabe que los resultados serán usados en acción legal, emplear un mensajero especial para la entrega de las muestras al laboratorio en un período de 6 horas.

Mantener la temperatura de todas las muestras de corrientes contaminadas abajo de los 10°C durante un período de transporte máximo de 6 horas. Refrigerar estas muestras al recibir las en el laboratorio y procesarlas dentro de 2 horas. Cuando las condiciones locales producen retrasos en la entrega de muestras por más de 6 horas, hacer los exámenes en el campo, usando facilidades de laboratorio de campo localizados en el lugar de la colecta ó usar procedimientos de incubación retrasados.

Desafortunadamente, estos requisitos raras veces son realísticos en el caso de muestras individuales de agua potable que han sido enviados al laboratorio por servicio de correo, pero el tiempo entre la colecta y el examen no debe exceder 30 horas. Donde no es posible la refrigeración de muestras de agua individuales que han sido enviadas por correo, una botella de muestra aislada tipo termo que puede ser esterilizada se puede usar. Anotar la hora y temperatura de almacenamiento de todas las muestras y considerar esta información en la interpretación de los resultados.

Técnica de Filtro de Membrana para los Miembros del Grupo Coliforme

La técnica de filtro de membrana es altamente reproducida, puede ser usada para probar volúmenes relativamente grandes de muestras, y produce resultados definitivos más rápidamente que el procedimiento de tubo múltiple, aunque tiene limitaciones para examinar aguas altas en turbidez y bacterias que no sean del grupo coliforme. Su uso ha sido aprobado en los estándares de la Agencia para la Protección del Ambiente de EE.UU., (U.S.EPA). La técnica de filtro de membrana es extremadamente útil para el monitoreo de emergencias de agua potable y en el examen de una variedad de aguas naturales. Sin embargo cuando la técnica de filtro de membrana no ha ya sido usada previamente, es deseable llevar a cabo pruebas paralelas con la técnica de fermentación de tubo múltiple para demostrar la aplicabilidad.

De la manera aplicada a la técnica de filtro de membrana, el grupo coliforme puede ser redefinido como agrupante de todas las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, gram-negativas, no formadoras de spora, de forma de vara que producen una colonia oscura con un brillo metálico dentro de 24 horas a 35°C en un medio tipo-Endo que contiene lactosa.

La turbidez causada por la presencia de algas u otro material interferente puede que no permita el examen de un volumen de muestra suficiente para producir resultados significativos. Estimados bajos de coliformes pueden ser causados por la presencia de números altos de bacterias no-coliformes ó de sustancias tóxicas. La técnica de filtro de membrana es aplicable en el examen de aguas salinas, pero no en aguas negras que solo han recibido tratamiento primario seguido de aplicación de cloro, debido a la turbidez en muestras de volumen alto ó aguas negras que contengan metales tóxicos ó sustancias orgánicas tóxicas tales como fenoles. Una técnica de filtro de membrana modificada para los coliformes fecales puede ser usada si el examen paralelo con la técnica de fermentación de tubo múltiple no demuestra diferencias significativas.

El volumen estándar que se filtrará para las muestras de agua potable es 100 mL. Esto puede ser distribuido entre membranas múltiples si es necesario. Debido a que el agua potable tratada no debe contener coliformes por 100 mL, los laboratorios de plantas de tratamiento deben considerar probando muestras de 1 L de agua terminada, siempre que no hayan partículas presentes para interferir con la filtración ó el desarrollo de colonias discretas. En estas situaciones, dividir la muestra en cuatro porciones de 250 mL para los análisis y totalizar cualquier coliforme en los cultivos en un solo reporte de 1 L examinado. Muestras más pequeñas o más grandes pueden ser usadas para otras aguas ó análisis especiales.

Comparaciones estadísticas de resultados obtenidos por el método de tubo múltiple y la técnica de filtro de membrana demuestran que el filtro de membrana es más preciso. Aunque los datos de cada prueba producen aproximadamente la misma información de la calidad del

agua, los resultados numéricos no son idénticos. Para las fuentes de agua cruda se esperaría que el 80% de los resultados de los exámenes de filtro de membrana estuvieran dentro del 95% de los límites de confianza de los resultados de los exámenes de tubo múltiple completados. Se espera que los resultados del examen de tubo múltiple sean más altos que los resultados del filtro de membrana debido a una preferencia estadística positiva automática.

4.7.1 Procedimiento de Filtro de Membrana de Coliforme Total Estándar

4.7.1.1 Aparatos de laboratorio

Para los análisis de filtro de membrana usar cristalería y otros aparatos compuestos de materiales libres de agentes que pueden tener efectos desfavorables en el crecimiento bacteriana. Cuidadosamente anotar cualquier desviación de las recomendaciones presentadas abajo y hacer pruebas cuantitativas para demostrar que tales desviaciones no han introducido factores o agentes que resulten en condiciones menos favorables para el crecimiento bacteriana.

Esterilizar la cristalería de la manera descrita en la Sección 4.4., Lavado y Esterilización.

4.7.1.1.1 Botellas de muestreo: Ver la Sección 4.3.12.

4.7.1.1.2 Botellas de dilución: Ver la Sección 4.3.10.

4.7.1.1.3 Pipetas y cilindros graduados. Ver la Sección 4.3.8. Antes de la esterilización cubrir la abertura de los cilindros graduados con papel aluminio o un sustituto de papel adecuado.

4.7.1.1.4 Recipientes para el medio de cultivo: Usar frascos de vidrio de borosilicato limpios pre-esterilizados para reducir la contaminación bacteriana. Frascos de cualquier tamaño o forma pueden ser usados, pero los frascos Erlenmeyer con tapas de metal, cubiertas de papel aluminio o tapas de rosca sirven para mezclar adecuadamente el medio contenido y son convenientes para el almacenamiento.

4.7.1.1.5 Placas de cultivo: Usar vidrio borosilicato estéril o tipos de cápsulas de petri plásticas desechables, 60x15 mm, 50x12 mm, u otro tamaño apropiado. El fondo de la cápsula debe ser plano y suficientemente grande para que la almohadilla absorbente para el nutriente del cultivo permanezca plana. Envolver las placas de cultivo de vidrio limpios antes de la esterilización, individualmente o en números convenientes, en papel aluminio si se esteriliza por calor seco, o un sustituto de papel adecuado cuando se usa autoclave. Porque el vidrio y algunas placas de cultivo plásticas desechables tienen cubiertas flojas, tomar precauciones durante la incubación para prevenir la pérdida posible del medio por evaporación con el resultante secamiento del medio, y para mantener un ambiente húmedo para el desarrollo óptimo de las colonias.

Placas de plástico desechables que tienen acoplamiento apretado y

Llenan las especificaciones anotadas arriba también pueden ser usados. Placas plásticas estériles adecuadas están disponibles comercialmente. Para volver a usar estas placas de cultivo, tratarlas sumergiendo las placas limpias abiertas en etanol al 70% por 30 minutos y secándolas al aire en una toalla estéril, protegidas del polvo. Volver a armarlas cuando estén secas. Para métodos alternos de esterilización usar radiación ultravioleta u otros agentes químicos ó físicos apropiados; probar la efectividad de dichos métodos, comprobando que los recipientes de cultivos estén libres de efectos supresivos de crecimiento residuales. Después de desinfectarlas y remover el agente desinfectante, cerrar las placas usando técnicas asépticas y almacenar en un recipiente a prueba de polvo hasta que sean necesitadas.

- 4.7.1.1.6 Unidades de filtración: El soporte del filtro (construido de vidrio, plástico autoclavable, porcelana ó acero inoxidable) consiste de un embudo sin uniones adherido a una base por medio de un aparato de enllavado o mantenido en su lugar por medio de fuerza magnética ó gravedad. El diseño debe permitir al filtro de membrana estar seguro en el plano poroso del receptáculo sin daños mecánicos y que permita que todo el fluido pase a través de la membrana durante la filtración.

Separadamente envolver las dos partes del soporte en papel pesado para envolver, esterilizar en el autoclave y almacenarlos hasta que se usen. Alternativamente tratar las partes no envueltas con radiación ultravioleta antes de usarlas. Las unidades de campo pueden ser desinfectadas encendiendo alcohol metílico ó sumergiéndolas en agua hirviendo por 5 minutos. No someter al fuego las partes plásticas.

Para la filtración, montar el receptáculo del soporte del filtro en un frasco de filtración de un litro con un tubo en el lado u otro instrumento adecuado de tal forma que se pueda ejercer una diferencia de presión en el filtro de membrana. Conectar el frasco a una bomba de vacío eléctrica, una bomba de filtro que opere con la presión del agua, una aspiradora de mano, u otra manera de asegurar una diferencia de presión. Conectar un frasco adicional entre el frasco de filtración y la fuente de vacío para atrapar el agua filtrada.

- 4.7.1.1.7 Filtro de membrana: Usar filtros de membrana con un diámetro de poro medido de tal manera que haya retención completa de las bacterias coliformes. Usar solamente los filtros de membrana que se cumplen a través de pruebas adecuadas de control de calidad por el fabricante, los siguientes requisitos: capaces de retención completa de los organismos que serán cultivados, exhiban estabilidad en el uso, libertad de extractables químicos que puedan inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias, una tasa satisfactoria de filtración, ninguna influencia significativa en el pH del medio, y que no haya incremento en el número de colonias confluentes ó esparcidos comparada a los filtros de membrana de control. Preferiblemente usar membranas con marcas de cuadrícula de una forma tal que el crecimiento bacteriano no sea ni inhibido ni estimulado a lo

largo de las líneas de la cuadrícula cuando las membranas y las bacterias atrapadas sean incubadas en un medio adecuado. Almacenar los filtros de membrana que hay en existencia en un ambiente sin extremos de temperatura y humedad. No obtener más que el abascimiento para un año en ningún momento.

Si se usarán filtros de membrana preesterilizados, usar solamente aquellos para los cuales el fabricante haya certificado que la técnica de esterilización no ha inducido toxicidad ó alterado las propiedades químicas ó físicas de la membrana. Si las membranas son esterilizadas en el laboratorio, usar el autoclave por 10 minutos a 121°C. Al final del período de esterilización dejar que el vapor escape rápidamente para minimizar la acumulación de agua de condensación a los filtros.

- 4.7.1.1.8 Almohadillas absorbentes: Consisten de discos de papel de filtro u otro material de alta calidad y libre de sulfitos u otras sustancias que podrían inhibir el crecimiento bacteriano. Usar almohadillas de aproximadamente 48 mm en diámetro y de suficiente grosor para absorber 1.8 a 2.2 mL de medio. Las almohadillas absorbentes preesterilizadas ó almohadillas que han sido esterilizadas posteriormente en el laboratorio deben liberar menos de 1 mg de acidez total (calculada como CaCO₃) cuando sea titulada al punto final de fenolftaleina, pH 8.3, usando 0.02N NaOH. Donde haya evidencia de toxicidad de la almohadilla absorbente, preremover las almohadillas en agua destilada a 121°C (en un autoclave) por 15 minutos, decantar el agua y reempaquetar las almohadillas en una cápsula de petri grande para la esterilización y el uso subsiguiente. Esterilizar las almohadillas simultáneamente con los filtros de membrana disponibles en sobres "Kraft" resellables ó separadamente en otros recipientes apropiados. Secar las almohadillas para que estén libres de humedad visible antes del uso. Ver el procedimiento de esterilización para los filtros de membrana en la Sección anterior.
- Como una substitución de substrato para las almohadillas absorbentes saturadas de nutrientes, se puede agregar agar al 1.5% a cualquier medio de caldo "MF".
- 4.7.1.1.9 Pinzas: De puntos redondos, sin corrugaciones en los lados interiores de los puntos. Esterilizarlas antes del uso sambuyéndolas en alcohol etílico al 95% ó alcohol metílico absoluto y flameándolas (esterilizándolas con fuego).
- 4.7.1.1.10 Incubadores: Usar incubadores que provean una temperatura de 35 ± 0.05°C y que mantengan un nivel alto de humedad (aproximadamente 90% humedad relativa).
- 4.7.1.1.11 Microscopio y fuente de luz: Contar las colonias en los filtros de membrana usando una magnificación de 10 a 15 diámetros y una fuente de luz ajustada para dar máximo discernimiento del brillo. Optimamente usar un microscopio de disección binocular de campo amplio (estereoscópico binocular).

Sin embargo una lámpara pequeña fluorescente con un magnificador es aceptable. Usar lámparas fluorescentes de luz blanca. No usar un iluminador de microscopio con sistema óptico para la concentración de luz de una fuente de luz incandescente para la identificación de colonias de coliformes en un medio de tipo Endo.

4.7.1.2 Materiales y medios de cultivo

La necesidad de uniformidad obliga al uso de un medio deshidratado. Nunca preparar el medio a partir de ingredientes básicos cuando hay un medio deshidratado adecuado disponible. Seguir las indicaciones del fabricante, para la rehidratación y la esterilización. Un medio preparado comercialmente en forma líquida (ampolla estéril u otro) también puede ser usado si se sabe que dará resultados equivalentes. Probar cada lote nuevo de medios para asegurar que hay productividad satisfactoria, preparando diluciones de un cultivo de Enterobacter aerogenes y diluyendo volúmenes apropiados para dar 20 a 80 colonias por filtro. Con cada nuevo lote de medio de tipo-Endo, verificar suficientes colonias, obtenidas de fuentes naturales, para establecer la exactitud de diferencia del lote del medio.

Se incluyen a continuación los ingredientes de reactivos necesarios para la preparación de los medios de cultivo si no hay medios deshidratados adecuados disponibles.

4.7.1.2.1 Agar m-HPC (m-SPC):

Peptona	2.0 g
Gelatina	2.5 g
Glicerol	1.0 mL
Agar	1.5 g
Agua destilada	100 mL

Mezclar todos los ingredientes excepto el glicerol. Ajustar el pH a 7.1 si es necesario, con 1 N NaOH, calentar para disolver, agregar glicerol y autoclavar a 121°C por 5 minutos.

4.7.1.2.2 Agar Endo LES:

Extracto de levadura	1.2 g
Casitona ó tripticasa	3.7 g
Tiopeptona ó Tiotona	3.7 g
Triptosa	7.5 g
Lactosa	9.4 g
Fosfato hidrógeno de di potasio, K_2HPO_4	3.3 g
Fosfato hidrógeno de po tasio, KH_2PO_4	1.0 g
Cloruro de sodio, NaCl	3.7 g
Desoxicolato de sodio	0.1 g
Lauril sulfato de sodio	0.05 g
Sulfito de sodio, Na_2SO_3	1.6 g

Fuccina básica	0.8 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 L

Rehidratar en 1 L de agua destilada que contenga 20 mL de etanol al 95%. Hacerlo hervir, enfriar a 45 a 50°C, y distribuir en cantidades de 4 mL en la sección inferior de las cápsulas de petri de 60 mm de vidrio ó plásticas. Si se usan cápsulas de cualquier otro tamaño, ajustar la cantidad para dar una profundidad equivalente. No exponer las cápsulas a la luz solar directa; almacenarlas en la oscuridad de 2 a 10°C y descartar el medio que no se ha usado después de 2 semanas.

4.7.1.2.3 Medio M-Endo:

Triptosa ó polipeptona	10.0 g
Tiopeptona ó Tiotona	5.0 g
Casitona ó tripticasa	5.0 g
Extracto de levadura	1.5 g
Lactosa	12.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato hidrógeno de dipotasio, K ₂ HPO ₄	4.375 g
Fosfato dihidrógeno Potásico, KH ₂ PO ₄	1.375 g
Lauril sulfato de sodio	0.050 g
Desoxicolato de sodio	0.10 g
Fuccina básica	1.05 g
Agua destilada	1 L

Rehidratar en 1 L de agua destilada que contenga 20 mL de etanol al 95%. Hacerlo hervir, prontamente removerlo del calor y enfriarlo a menos de 45°C. No esterizarlo por medio de autoclave. El pH final deberá estar entre 7.1 y 7.3.

Almacenar el medio terminado en la oscuridad de 2 a 10°C y descartar cualquier medio que no ha sido usado después de 96 h.

Nota: Este medio puede ser solidificado agregándole 1.2 a 1.5% de agar antes de hervir.

4.7.1.2.4 Caldo lauril triptosa:

Triptosa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Fosfato hidrógeno de dipotasio, K ₂ HPO ₄	2.75 g
Fosfato dihidrógeno de potasio, KH ₂ PO ₄	2.75 g
Cloruro de sodio, NaCl	5.0 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g
Agua destilada	1 L

El pH debe ser 6.8 ± 0.2 después de esterilizar. Es optativo agregar 0.01 g/L de morado bromocresol al medio presuntivo como una guía para determinar la productividad de ácido y crecimiento (sin formación de gas) que tienen que comprobarse. Antes de esterilizar, distribuir, en tubos de fermentación con frasco invertido, suficiente medio para que cubra por lo menos parcialmente, el frasco invertido después de la esterilización.

Preparar el caldo lauril triptosa de tal concentración que al agregar porciones de 100 mL ó 10 mL de la muestra al medio, las concentraciones de los ingredientes de este último no disminuirán debajo de las del medio estándar. Preparar de acuerdo al Cuadro 4.11.

Cuadro 4.11. Preparación del Caldo Lauril Triptosa

Inoculum, ml	Cantidad de medio en tubo, mL	Volumen de medio + inoculum, mL	Caldo lauril triptosa deshidratado requerido, g/L
1	10 ó más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
100	50	150	106.8
100	55	135	137.1
100	20	120	213.6

4.7.1.2.5 Caldo de bilis de lactosa verde brillante:

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
"Oxgall"	20.0 g
Verde brillante	0.0133 g
Agua destilada	1 L

El pH debe ser 7.2 ± 0.2 después de esterilizar. Antes de esterilizar, distribuir, en tubos de fermentación con frasco invertido, suficiente medio para que cubra, por lo menos parcialmente, el frasco invertido después de la esterilización.

4.7:1.3 Definición de Coliforme

Todos los organismos que produzcan una colonia con un brillo metálico verde-dorado dentro de 24 horas de incubación en un medio adecuado son considerados miembros del grupo coliforme. El brillo puede cubrir todas las colonias ó puede aparecer solo en una forma central ó en la periferia.

El grupo coliforme así descrito está basado en la producción de aldehído de la fermentación de lactosa. Mientras que esta característica bioquímica es parte del sendero metabólico de la producción de gas en el examen de tubo múltiple, algunas variaciones

pueden ser observadas entre las clases de coliformes. Sin embargo, esta pequeña diferencia en la definición de indicador no cambia su significancia sanitaria, particularmente si estudios adecuados han sido realizados para establecer la relación entre los resultados por el filtro de membrana y los obtenidos por el procedimiento de dilución de tubo estándar.

Verificar las colonias de brillo para evitar resultados positivos falsos, especialmente para las muestras de agua potable. Es preferible la verificación de todas las colonias. Para los conteos de coliformes de más de 5/100 mL, verificar un mínimo de 5 colonias incluidas en el conteo directo. Los coliformes ocasionalmente pueden producir colonias atípicas. Se puede ganar experiencia para reconocer dicho crecimiento verificando todos los tipos de brillo y colonias sin brillo.

4.7.1.4 Procedimientos

Generalmente un procedimiento de enriquecimiento puede mejorar la determinación de la calidad del agua potable. Sin embargo este paso puede ser eliminado en el examen de rutina del agua potable cuando determinaciones repetidas han demostrado que resultados adecuados se obtienen por la técnica de filtro de membrana de un solo paso. El enriquecimiento normalmente no es necesario en el examen de agua no potable o de aguas fecales. Verificar todas las muestras del agua potable dando resultados positivos de la manera descrita arriba.

En las secciones siguientes, se ofrecen métodos con o sin enriquecimiento que proveen para el uso de medios con base de agar o medio M-Endo sin agar. Cuando se reporten los resultados, explicar el método seguido.

4.7.1.4.1 Selección del tamaño de la muestra: El tamaño de la muestra estará gobernado por la densidad bacteriana esperada, la cual en las muestras deberá estar limitada solamente por el grado de turbidez o por el crecimiento que no sea coliforme en el medio (ver Cuadro 4.12).

Un volumen de muestra ideal producirá el crecimiento de aproximadamente 50 colonias y no más de 200 colonias de todos tipos. Analizar las muestras de agua potable filtrando porciones adecuadas del mismo volumen, tales como 100 a 500 mL o más, o filtrando 2 volúmenes diferentes (diluídos o no diluídos), dependiendo de la densidad bacteriana esperada. Cuando se filtrara menos de 20 mL de muestra (diluída o no) agregar aproximadamente 10 mL de agua de dilución estéril al embudo antes de la filtración. Este incremento en el volumen del agua ayuda en la dispersión uniforme de la suspensión bacteriana sobre la superficie de filtrado efectiva.

Cuadro 4.12. Volúmenes de Muestras para el Examen de Coliformes Totales - Método de Filtro de Membrana

Fuente de Agua	Volumen (X) que se filtrará (mL)							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Agua Potable	x							
Piscinas	x							
Pozos, Manantiales	x	x	x					
Lagos, embalses	x	x	x					
Toma de agua para abastecimiento			x	x	x			
Playas para bañar			x	x	x			
Agua de Río				x	x	x	x	
Aguas negras clo rinadas				x	x	x		
Aguas negras cru das					x	x	x	x

4.7.1.4.2 Dilución de la muestra: Seleccionar la(s) dilución(es) para que el número total de colonias en una placa será entre 30 y 300. Por ejemplo, cuando se sospecha un conteo tan alto como 3000, preparar las placas con una dilución de 10^{-2} .

Usar una pipeta estéril para trasladar la porción de muestra de cada recipiente. Si se contamina la pipeta antes de terminar a trasladar todas las porciones reemplazarla con otra pipeta estéril. Usar una pipeta estéril distinta para cada dilución diferente. Cuando se saca una porción de muestra, no meter la pipeta más que 2.5 cm debajo de la superficie de la muestra ó dilución.

4.7.1.4.3 Filtración de la muestra: Usando pinzas estériles, poner un filtro de membrana estéril (con el lado de la cuadrícula hacia arriba) sobre la placa porosa del receptáculo. Cuidadosamente poner la unidad del embudo "apareada" sobre el receptáculo y asegurarla bien. Filtrar la muestra al vacío parcial. Con el filtro aún en su lugar, enjuagar el embudo filtrando tres porciones de 20 a 30 mL de agua de dilución estéril. Al terminar el enjuague final y el proceso de filtración, desconectar y quitar el embudo, remover inmediatamente el filtro de membrana con las pinzas estériles, y ponerlo en una almohadilla ó agar estéril con un movimiento rotatorio para evitar atrapar aire. Realizar una muestra de agua de enjuague estéril (100 mL) después de la filtración de una serie de 10 muestras para revisar la posible contaminación cruzada ó agua de enjuague contaminada.

Usar unidades de filtración estériles al inicio de cada serie de filtraciones como una precaución mínima para evitar contaminación accidental. Una serie de filtraciones se considera interrumpida cuando ha pasado un intervalo de 30 minutos ó más entre filtraciones de muestras. Después de dicha interrupción, considerar cualquier filtración subsiguiente como una serie de filtraciones nuevas y esterilizar a todos los soportes de filtros de membrana en uso. Descontaminar este equipo entre filtraciones sucesivas usando un esterilizador ultravioleta (UV), flujo de vapor ó agua hirviendo. En el proceso de esterilización UV, una exposición de 2 minutos a radiación UV es suficiente. No exponer las preparaciones de cultivo de filtro de membrana a fugas de radiación UV casuales que pueden emanar del gabinete de esterilización. Se recomienda la protección de los ojos; los anteojos de seguridad u otros, dan adecuada protección de los ojos contra radiación extrañada de un gabinete de esterilización UV que no es a prueba de fuga de luz durante el intervalo de exposición. Limpiar el tubo UV regularmente y revisar regularmente la efectividad para asegurar que producirá un aniquilamiento bacteriano de 99.9% en una exposición de 2 minutos.

4.7.1.4.4 Técnica de enriquecimiento: Poner una almohadilla absorbente estéril en la parte superior de una placa de cultivo estéril y succionar con pipeta suficiente medio de enriquecimiento (1.8 a 2.0 mL de caldo lauril triptosa) para saturar la almohadilla. Cuidadosamente remover cualquier líquido excesivo de la almohadilla absorbente. Asépticamente poner en la almohadilla el filtro a través del cual se ha pasado la muestra. Incubar al filtro, sin invertir la placa, por 1.5 a 2 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera de por lo menos 90% de humedad relativa.

Si se usa el medio a base de agar, remover el cultivo de enriquecimiento del incubador, levantar el filtro de la almohadilla de enriquecimiento y rotarla sobre la superficie del agar. La colocación incorrecta del filtro es obvia inmediatamente, porque los parches no manchados de la membrana indican atrapamiento de aire. Donde estos parches ocurran, cuidadosamente volver a sentar el filtro en la superficie del agar. Si se usa el medio líquido, preparar el cultivo final removiendo el cultivo de enriquecimiento del incubador y separando la parte superior de la interior de la placa. Poner una almohadilla estéril fresca en la parte inferior de la placa y saturarla con 1.8 a 2.0 mL del medio M-Endo final. Transferir el filtro con las mismas precauciones de arriba, a la almohadilla nueva. Descartar la almohadilla de enriquecimiento usada.

Con cualquiera, el agar ó el medio líquido, invertir la placa e incubador por 20 a 22 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Proceder a la Sección 4.7.1.4.6 abajo.

4.7.1.4.5 Técnica directa de un solo paso (alternativa): Si se usa el medio a base de agar, poner el filtro preparado directamente en el agar como fue descrito en la Sección anterior e incubar por 22 a 24 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Si se usa el medio líquido, poner una almohadilla en la placa de cultivo y saturar con 1.8 a 2.0 mL de medio M-Endo. Poner el filtro preparado directamente en la almohadilla, invertir la placa, e incubar por 22 a 24 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

4.7.1.4.6

Conteo: Contar las colonias en los filtros de membrana utilizando un estereoscopio de magnificación de 10 a 15 X. Es preferible colocar la cápsula de Petri en el portaobjeto del microscopio a una inclinación de 45° y ajustar la fuente de luz en un sentido vertical a las colonias. La densidad de colonias óptima es 20 a 200 por filtro. Si las colonias son pequeñas y no están muy juntas, un límite mayor es aceptable.

Contar todas las colonias en la membrana cuando hay 1 ó 2, ó menos, colonias por cuadrícula. Para 3 a 10 colonias por cuadrícula, contar 10 cuadrículas y obtener el conteo promedio por cuadrícula. Para 10 a 20 colonias por cuadrícula, contar 5 cuadrículas y obtener el conteo promedio por cuadrícula. Multiplicar el conteo promedio por cuadrícula por 100 veces el recíproco de la dilución para obtener el número de colonias por mililitro. Si hay más que 20 colonias por cuadrícula; reportar el conteo como >2000 veces el recíproco de la dilución. Reportar los conteos promediados como el estimado de unidades que forman colonias. Hacer conteos estimados solamente cuando hay colonias discretas y separadas.

La colonia de coliformes típica tiene un color rosado a rojo oscuro con un brillo de superficie metálico (verde-dorado). El área de brillo puede variar en tamaño desde la cabeza de un pequeño alfiler a cubrir completamente la superficie de la colonia. Contar las colonias de brillo con la ayuda de un microscopio binocular de campo amplio de poca fuerza (10 a 15 magnificaciones) o un microscopio estereoscópico binocular u otro instrumento óptico con una fuente de luz fría blanco fluorescente dirigida de arriba y tan perpendicularmente como sea posible al plano del filtro. Las colonias que carecen de brillo pueden ser rosadas, rojas, blancas ó incoloras y no son consideradas como coliformes. El conteo total de las colonias (coliformes y no coliformes) en medio de tipo Endo no tiene relación al número total de bacterias presentes en la muestra original, y, con lo que se sabe hasta el momento, no se puede inferir la significancia ni hacer una correlación con la calidad de la muestra de agua.

Muestras de material desinfectado, pueden incluir organismos bajo tensión que crecen relativamente despacio y producen brillo máximo en 22 a 24 horas. Los organismos de materiales que no han sido desinfectados pueden producir brillo antes, 16 a 18 horas, y el brillo se puede apagar subsiguientemente. Es deseable contar las colonias de brillo en ambas, 16 a 18 horas y 22 a 24 horas; reportar el conteo más alto de colonias de brillo.

4.7.1.4.7

Verificación de coliformes: Colonias de brillo típicas pueden ser producidas ocasionalmente por organismos que no son coliforme. Ve-

rificar por medio de un examen de fermentación de lactosa ó usando procedimientos alternativos involucrando una prueba rápida (4 horas) de dos reacciones bioquímicas claves ó un sistema de prueba múltiple para especiación.

Fermentación de lactosa. Verificar todas las colonias de brillo incluidas en el conteo directo ó un mínimo de cinco de estas colonias de las muestras de agua potable, transfiriendo crecimiento de cada una de las colonias a tubos paralelos de caldo lauril triptosa y caldo de bilis de lactosa verde brillante; incubar a ambos a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. La formación de gas en el caldo de bilis de lactosa verde brillante dentro de 48 horas verifica que la colonia es un coliforme. Si sólo un tubo inoculado de caldo lauril triptosa produce gas, transferir a un segundo tubo de caldo de bilis de lactosa verde brillante. La verificación requiere que este tubo produzca gas dentro de 48 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

4.7.1.5 Cálculo de la densidad de coliformes

Reportar la densidad de coliformes como coliformes totales/100 mL. Computar el conteo usando filtros de membrana con 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de todos los tipos por cada membrana a través de la siguiente ecuación:

Colonias de coliformes (total)/100 mL

$$= \frac{\text{Colonias de coliformes contadas} \times 100}{\text{Volumen de la muestra filtrada, mL}}$$

Para los conteos de coliformes verificados, ajustar el conteo inicial basado en el porcentaje de verificación positivo y reportarlo como "conteo de coliformes verificado por 100 mL".

4.7.1.5.1 Agua de la calidad del agua potable: Con el agua de buena calidad la ocurrencia de coliformes generalmente será mínima. Por eso contar todas las colonias de coliform (descartando el límite inferior de 20 descrito arriba) y usar la fórmula dada arriba para obtener la densidad de coliformes.

Si ocurre crecimiento confluyente, es decir, crecimiento que cubre el área de filtración entera de la membrana ó una porción de ella, y las colonias no son discretas, reportar los resultados como "crecimiento confluyente con (ó sin) coliformes". Si el número total de colonias bacterianas, coliformes más las no coliformes excede 200 por membrana, ó si las colonias no son suficientemente distintas para el conteo exacto, reportar los resultados como "demasiado numerosos para contar". La presencia de coliformes en dichos cultivos que no presenten brillo, puede ser indicada poniendo todo el cultivo de filtro de membrana en un tubo estéril de caldo de bilis de lactosa verde brillante. Como una alternativa, cepillar la superficie del filtro entero con una asa estéril ó un palito aplicador e inocular este crecimiento al tubo de caldo de bilis de lactosa verde brillante. Si se produce gas de este cultivo den

tro de 48 horas a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$, se concluye que hay coliformes presentes. En cualquier caso, solicitar una nueva muestra y seleccionar volúmenes más apropiados para ser filtrados por membrana, recordando que la porción estándar de agua potable es 100 mL. Así que en vez de filtrar 100 mL por membrana, porciones de 50 mL pueden ser filtradas a través de cada una de dos membranas, porciones de 25 mL pueden ser filtradas a través de cada una de cuatro membranas, etc. Totalizar los conteos de coliforme observados en todas las membranas y reportarlos como número por 100 mL.

- 4.7.1.5.2 Agua que no es la calidad del agua potable: Como con las muestras de agua potable, si ningún filtro tiene un conteo de coliformes que caiga dentro del rango ideal, totalizar los conteos de coliformes en todos los filtros y reportarlos como un número por 100 mL. Por ejemplo, si se examinaran porciones duplicadas de 50 mL y las 2 membranas tuvieran 5 y 3 colonias de coliformes, respectivamente, reportar el conteo como ocho (8) colonias coliformes por 100 mL, i.e.,

$$\frac{(5 + 3) \times 100}{(50 + 50)}$$

Similarmente, si se examinaran porciones de 50, 25 y 10 mL y los conteos fueran 15, 6 y 1 colonias coliformes, respectivamente, reportar el conteo como 25/100 mL, i.e.,

$$\frac{(15 + 6 + 0) \times 100}{(50 + 25 + 10)}$$

Por otro lado, si se examinaran porciones de 10, 1.0 y 0.1 mL con conteos de 40, 9 y 1 colonias de coliformes, respectivamente, seleccionar la porción de 10 mL sólo para calcular la densidad de coliformes, ya que este filtro tuvo un conteo de coliformes que caía en el rango ideal. El resultado es 400/100 mL, i.e., $\frac{(40 \times 100)}{(10)}$.

En este último ejemplo la membrana con 40 colonias de coliformes también tenía un conteo de colonia bacteriana total mayor de 200, reportar el conteo de coliformes como $\geq 400/100$ mL.

Reportar el crecimiento confluyente ó membranas con colonias demasiado numerosas para ser contadas como se describe en la Sección 4.7.1.5.1. Solicitar una nueva muestra y seleccionar volúmenes más apropiados para la filtración.

4.7.2 Procedimiento de Filtro de Membrana de Coliforme Fecal

Las densidades bacterianas de coliformes fecales también pueden ser determinadas por la técnica de filtro de membrana. Cuando se usa este método demostrar que la información es comparable a la

que se obtiene por el procedimiento de tubo múltiple antes de aceptarlo como una alternativa. El procedimiento de filtro de membrana utiliza un medio de lactosa enriquecido y temperatura de incubación de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ para la selectividad y produce una exactitud de 93% al diferenciar entre animales de sangre caliente y esos de otras fuentes. Debido a que la temperatura de incubación es crítica, sumergir los cultivos de filtro de membrana en un baño tibio para la incubación a la temperatura elevada ó usar un incubador de paila ó lavabo de calor exacto apropiado.

4.7.2.1 Materiales y medios del cultivo

4.7.2.1.1 Medio M-FC: La necesidad de uniformidad obliga el uso de un medio deshidratado. Nunca preparar el medio a partir de ingredientes básicos cuando hay un medio deshidratado adecuado disponible. Seguir las direcciones del fabricante para la rehidratación y esterilización. Un medio preparado comercialmente en forma líquida (ampolla estéril u otra) también puede ser usado si se sabe que dará resultados equivalentes.

Caldo M-FC:

Triptosa ó (biosota).....	10.0 g
Proteosa peptona No.3 ó polipeptona.....	5.0 g
Extracto de levadura.....	3.0 g
Cloruro de sodio, NaCl.....	5.0 g
Lactosa.....	12.5 g
Sales biliares No. 3 ó mezcla de sales biliares.....	1.5 g
Azúl de añilina.....	0.1 g
Agua destilada.....	1 L

Rehidratar en agua destilada que contenga 10 mL al 1% en ácido rosólico en NaOH 0.2N*. Calentarlo hasta hervir, rápidamente removerlo del calor, y enfriarlo a menos de 45°C . No esterizarlo por medio de autoclave. El pH final deberá ser 7.4.

Almacenar el medio terminado de 2 a 10°C y descartar medio no usado después de 96 horas.

NOTA: Este medio se pueda solidificar agregando agar al 1.2 a 1.5% antes de hervir.

*El reactivo de ácido rosólico se descompone si se esteriliza en el autoclave. Almacenar la solución existente en la oscuridad a 2 a 10°C y descartar después de dos semanas o antes si el color cambia de rojo oscuro a un café oscuro. Se puede omitir el ácido rosólico del medio si ocurre una cantidad mínima de conteos de colonias de fondo y se obtienen resultados equivalentes sin usarlo.

Probar cada lote de medio para ver si hay productividad satisfactoria preparando diluciones de un cultivo de Escherichia coli y filtrando volúmenes apropiados para producir 20 a 80 colonias por filtro. Con cada nuevo lote de medios verificar 10 ó más colonias obtenidas de varias muestras naturales, para establecer la ausencia de positivos falsos. El medio M-FC puede ser usado sin agregar el ácido rosólico al 1% con tal de que no haya interferencia con el crecimiento de fondo. Tal interferencia puede ser esperada en muestras de agua de escorrentía colectadas durante el primer chubasco después de un largo período seco.

- 4.7.2.1.2 Placas de cultivo: Usar placas plásticas bien ajustadas porque los cultivos MF son sumergidos en un baño María durante la incubación. Encerrar grupos de cultivos de coliformes fecales en bolsas plásticas ó sellar las placas individuales con cinta a prueba de agua para prevenir que haya fugas durante la sumersión.
- 4.7.2.1.3 Incubador: La especificidad del examen de coliformes fecales está relacionada directamente a la temperatura de incubación. La incubación al aire no es deseable porque se forman capas de calor dentro de la cámara y la lenta recuperación de la temperatura cada vez que se abre la incubadora durante las operaciones diarias. Para alcanzar la necesidad de un mayor control de temperatura usar un baño maría ó un incubador de paila de calor. Una tolerancia de temperatura de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ puede ser obtenida con la mayoría de los tipos de baños maría que también están equipados con una cubierta para reducir las pérdidas de agua y calor. Un baño maría circulante es excelente pero puede que no sea esencial a este examen si la variación permisible máxima de $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en la temperatura puede ser mantenida con otro equipo.
- 4.7.2.2 Procedimiento
- 4.7.2.2.1 Selección del tamaño de la muestra: Seleccionar el volumen de la muestra de agua que se examinará de acuerdo con la información en el Cuadro 4.13.
- Quando la densidad bacteriana de la muestra es desconocida, filtrar varios volúmenes decimales para establecer la densidad de coliformes fecales. Estimar el volumen que se espera que producirá una membrana contable y seleccionar dos cantidades adicionales que representen un décimo y diez veces este volumen respectivamente. Usar volúmenes de muestra que producirán conteos entre 20 y 60 colonias de coliforme fecal por membrana.
- 4.7.2.2.2 Dilución de la muestra: Seguir el mismo procedimiento y precauciones descritas en la Sección 4.7.1.4.2.
- 4.7.2.2.3 Filtración de la muestra: Seguir el mismo procedimiento y precauciones descritas en la Sección 4.7.1.4.3.
- 4.7.2.2.4 Preparación de la placa de cultivo: Preparar una almohadilla absor

bente estéril en cada placa de cultivo y succionar con pipeta aproximadamente 2 mL de medio M-FC, preparado como fue descrito arriba para saturar a la almohadilla.

Como una sustitución de sustrato para la almohadilla absorbente saturada de nutrientes, se puede agregar agar al 1.5% al caldo M-FC.

- 4.7.2.2.5 Incubación: Poner los cultivos preparados en bolsas plásticas a prueba de agua ó cápsulas de Petri sellados, sumergidos en el baño maría e incubarlos por 24 ± 2 horas a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Anclar las placas abajo de la superficie del agua para mantener los requisitos de temperatura crítica. Poner todos los cultivos preparados en el baño maría dentro de 30 minutos después de la filtración. Alternativamente usar un incubador de paila de calor exacto apropiado.

Cuadro 4.13. Volúmenes de Muestras para el Examen de Coliformes Fecales - Método de Filtro de Membrana.

Fuente de agua	Volumen (X) que se filtrará (mL)						
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001
Lagos, embalses	x	x					
Pozos, mantiales	x	x					
Toma de agua para abastecimiento		x	x	x			
Aguas naturales para bañar		x	x	x			
Planta de tratamiento de aguas negras, efluente secundario			x	x	x		
Estanques de finca, ríos				x	x	x	
Escorrentía directa				x	x	x	
Aguas negras municipales crudas					x	x	x
Escorrentía de corral					x	x	x

- 4.7.2.2.6 Conteo: Las colonias producidas por bacterias coliformes fecales en el medio M-FC son de varios tonos de azul. Las colonias de coliformes no fecales son grises a color crema. Normalmente se observan pocas colonias de coliformes no fecales en el medio M-FC por la acción selectiva de la temperatura elevada y adición del reactivo de sal ácida rosólica. Contar las colonias con la ayuda de un microscopio estereoscópico u otro aparato óptico.

4.7.2.3 Cálculo de densidad de coliforme fecal

Computar la densidad de las cantidades de muestra que produjeron conteos dentro del rango deseado de 20 a 60 colonias de coliformes fecales. Este rango de densidad de colonias es más restrictivo que el rango de 20 a 80 de coliformes totales por el tamaño más grande de la colonia en el medio M-FC. Calcular la densidad de coliformes fecales como se indica en la Sección 4.7.1.5. Reportar las densidades como coliformes fecales por 100 mL.

Figura 4.2.

Hoja de Laboratorio
Para Análisis
de Bacterias del
Grupo Coliforme

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA
DE LA CUENCA GUACERIQUE.

PLAN MAESTRO—DEPTO DE LIMNOLOGIA—SANAA

COLIFORMES TOTALES

SITIOS	Vol. de muestra filtrado, mL	Temperatura de incubación, °C	Tiempo de incubación, horas	Clase de medio usado	No. total de colonias de coliformes f./100mL
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

COLIFORMES FECALES

SITIOS	Vol. de muestra filtrado, mL	Temperatura de incubación, °C	Tiempo de incubación, horas	Clase de medio usado	No. total de colonias de coliformes f./100mL
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

FECHA DE MUESTREO : _____

FECHA DE ANALISIS : _____

NOMBRE DEL TECNICO DE LABORATORIO : _____

PLAN MAESTRO - DEPARTAMENTO DE LIMNOLOGIA - SANAA

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DE LA CUENCA DEL RIO GUACERIQUE

RESUMEN DE VALORES PROMEDIOS MENSUALES

MES:

AÑO:

PARAMETROS	SITIOS DE MONITOREO											
	1 GUAJIRE	2 MATED	3 GUARA- LALAO	4 HAC- IENDA	5 EL ROBLE	6 NUEVA ALDEA	7 LAS TAPIAS	8 EL BAT- ALLON	9 ESTA- CION	10 SEMI- MARIO (EMBAL)	11 EN MEDIO (EMBAL)	12 BRAZO NORTE (EMBAL)
MUESTRAS RUTINARIAS												
NO. DE MUESTRAS/MES:												
Calidad Fisica:												
Conductividad, uohm/cm												
pH												
Solidos:												
Totales, mg/L												
Totales disueltos, mg/L												
Totales suspendidos, mg/L												
Temperatura, C												
Turbidez, NTU												
Calidad Quimicas:												
DBO, mg/L												
Dureza, mg/L												
Fosfato, mg/L												
Nitrogeno (Amoniac), mg/L												
Nitrogeno (Nitrato), mg/L												
Carbono disuelto, mg/L												
Calidad Microbiologica:												
Coliformes totales/100 mL												
Coliformes fecales/100 mL												
MUESTRAS NO RUTINARIAS												
NO. DE MUESTRAS/MES:												
Calidad Fisica:												
Color												
Calidad Quimica:												
Alcalinidad, mg CaCO3/L												
Hierro, ug/L												
Sulfato, mg/L												

PLAN MAESTRO - DEPARTAMENTO DE LIMNOLOGIA - SANAA

PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DE LA CUENCA DEL RIO GUACERIQUE - HOJA DE MUESTREO

FECHA DE MUESTREO:

FECHA DE ANALISIS:

NOMBRE DEL TECNICO DE LABORATORIO:

PARAMETROS	SITIOS DE MONITOREO											
	1 GUAJIRE	2 MATED	3 GUARA- LALAO	4 HAC- IENDA	5 EL ROBLE	6 NUEVA ALDEA	7 LAS TAPIAS	8 EL BAT- ALLON	9 ESTA- CION	10 SEMI- MARIO (EMBAL)	11 EN MEDIO (EMBAL)	12 BRAZO NORTE (EMBAL)
MUESTRAS RUTINARIAS												
Calidad Fisica:												
Conductividad, uohm/cm												
pH												
Solidos:												
Totales, mg/L												
Totales disueltos, mg/L												
Totales suspendidos, mg/L												
Temperatura, C												
Turbidez, NTU												
Calidad Quimicas:												
DBO, mg/L												
-Tiempo de almacenamiento, d												
-Temperatura de almacenamiento, C												
Dureza, mg/L												
Fosfato, mg/L												
Nitrogeno (Amoniac), mg/L												
Nitrogeno (Nitrato), mg/L												
Oxigeno disuelto, mg/L												
Calidad Microbiologica:												
Coliformes totales/100 mL												
Coliformes fecales/100 mL												
-Tiempo de incubacion, h												
-Temperatura de incubacion, C												
-Clase de agar usado												
MUESTRAS NO RUTINARIAS												
Calidad Fisica:												
Color												
Calidad Quimicas:												
Alcalinidad, mg CaCO3/L												
Hierro, ug/L												
Sulfato, mg/L												
MEDIDAS HIDROMETEOROLOGICAS												
Caudal, m3/s												
Precipitacion, mm												
-Estacion/hora notada												

REFERENCIAS

- American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th ed. Washington, D.C.: APHA, WPCF, 1985.
- Sawyer, Clair N., and McCarty, Perry L. Chemistry for Environmental Engineering. 3rd. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1978.

Toda la información recopilada para este manual proviene de las dos referencias arriba mencionadas. A continuación se presentan las secciones especificadas de cada una que fueron traducidas del inglés al español.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition

Part 102	Laboratory Apparatus, Reagents, and Techniques	Pages 3-16
Part 103	Expression of Results	Pages 17-19
Part 104A	Precision and Accuracy	Pages 20-21 23-25
Part 105	Collection and Preservation of Samples	Pages 37-44
Part 209	Solids	Pages 92-97
Part 212	Temperature	Page 126
Part 214	Turbidity	Pages 133-136
Part 315	Iron	Page 214
Part 402	Acidity	Pages 267-268
Part 403	Alkalinity	Pages 269-273
Part 416	Nitrogen	Page 373
Part 417	Nitrogen (Ammonia)	Pages 374-384
Part 418	Nitrogen (Nitrate)	Pages 391-392 394-399
Part 421	Dissolved Oxygen	Page 413
Part 424	Phosphorus	Page 437
Part 426	Sulfate	Pages 464-468
Part 507	Oxygen Demand (Biochemical)	Pages 525-531
Part 901	Introduction (Microbiological Examination)	Pages 827-828
Part 901B	Regulations for Drinking Water Quality	Page 829
Part 902	Laboratory Quality Assurance	Pages 830-847
Part 903	Laboratory Apparatus	Pages 849-852
Part 904	Washing and Sterilization	Page 853
Part 905	Preparation of Culture Media	Pages 853-855
Part 906	Samples	Pages 856-859
Part 907	Heterotrophic Plate Count	Pages 861, 863
Part 908A	Standard Total Coliform Multiple-Tube Test	Pages 872-873

126

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition

Part 909	Membrane Filter Technique for Members of the Coliform Group	Pages 886-887
Part 909A	Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure	Pages 887-894
Part 909C	Fecal Coliform Membrane Filter Technique	Pages 896-898

Chemistry for Environmental Engineering, Third Edition

Chapter 3	Basic Concepts from Physical Chemistry	Pages 66-69
Chapter 18	Hardness	Pages 377-380
Chapter 21	Dissolved Oxygen	Pages 405-408
Chapter 24	Nitrogen	Pages 439-440 443-444 452
Chapter 28	Sulfate	Pages 476-477

