

Fundación Nacional de Salud

MANUAL PRÁCTICO DE ANÁLISIS DE AGUA

Cuarta edición



Fundación
Nacional
de Salud

Fundación Nacional de Salud

**Manual Práctico de
Análisis de Agua
4ª edición**

Brasilia, 2013

Copyright © 2004 Fundación Nacional de Salud.

Todos los derechos reservados. Se permite la reproducción parcial o total de esta obra, siempre y cuando sea citada la fuente y no sea para venta o cualquier fin comercial.

La responsabilidad por los derechos autorales de textos e imágenes de esta obra es del área técnica. Se puede acceder a la colección institucional del Ministerio de Salud, en su totalidad, en la Biblioteca

Virtual en Salud del Ministerio de Salud: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Se puede acceder al contenido de esta y de otras obras del Editorial del Ministerio de Salud en la dirección electrónica: <http://saude.gov.br/editora>

Tiraje: 4ª edición – 2013 – 3.000 ejemplares

Elaboración, distribución e informaciones:

MINISTERIO DE SALUD

Fundação Nacional de Saúde

Departamento de Salud Ambiental

Coordinación de Control de la Calidad del Agua

Setor de Autarquias Sul, Quadra 4, Bloco N, 9º andar, Ala Sul

CEP: 70070-040, Brasília – DF

Tel.: (61) 3314-6670/6396

Página web: <http://www.funasa.gov.br>

Editor:

Coordinación de Comunicación Social

Repartición de Edición y Medios de Red

Setor de Autarquias Sul, Quadra 4, Bloco N, 2º andar, Ala Norte

CEP: 70070-040, Brasília – DF

Página web: <http://www.funasa.gov.br>

Impreso en Brasil/*Printed in Brazil*

Ficha Catalográfica

Brasil. Fundación Nacional de Salud.

Manual práctico de análisis de agua/Fundación Nacional de Salud – 4. ed. – Brasília : Funasa, 2013.

150 p. ISBN

1. Análisis del agua. 2. Control de la calidad del agua. 3. Consumo de agua (Salud ambiental) I. Título. II. Serie.

CDU 628

Títulos para indexación:

En inglés: Practical manual on water analysis

En portugués: Manual prático de análise de água

Tabla de Contenido

Presentación.....	5
Prueba bacteriológica del agua	7
– Introducción.....	9
– Bacterias del grupo coliforme.....	11
– Material utilizado en bacteriología.....	13
– Preparación del material de vidrio	14
– Preparación de los medios de cultivo	15
– Modo de usar el agua de dilución al momento de determinar el NMP de coliformes.....	17
– Procedimientos para la prueba.....	21
- Coliformes totales	21
- Coliformes termotolerantes	26
- Recuento de bacterias heterotróficas	28
- Coliformes totales	29
- Coliformes termotolerantes	32
- Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> – sustrato....	36
– Esterilización.....	38
Análisis fisicoquímicos del agua.....	41
– Análisis Titulométricas.....	43
- Alcalinidad total.....	43
- Gas carbónico libre.....	46
- Cloruros	48
- Dureza total	51
- pH.....	54
– Análisis colorimétricas	56
- Cloro residual libre	56
- Color.....	57
- Aluminio.....	59
- Turbidez	63
- Temperatura	67
- Fluoruros.....	68

- Recolectas y preservación de muestras para análisis fisicoquímicos73
- Ensayo de coagulación (*Jar-test*)74
- Corrección del pH del agua tratada.....78
- Determinación de la concentración de cloro activo en una solución de cloro (hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio).....80

Preparación de los Reactivos Utilizados en Análisis

Constantes en este Manual	83
– Reactivos para alcalinidad	85
– Reactivos para CO ₂	87
– Reactivos para análisis de cloruros.....	89
– Reactivos para análisis de dureza	91
– Reactivos para análisis de aluminio.....	94
– Reactivos para análisis de fluoruros.....	96
– Reglas generales para corregir las soluciones tituladas	99
– Limpieza de material de vidrio en el laboratorio ..	100
– Relación de materiales de laboratorio de análisis de agua	102
– Bioseguridad en laboratorio	107

Apéndice A – Recolección y preservación de muestras para recuento de células de cianobacterias y cianotoxinas.....	111
--	-----

Apéndice B – Determinación de <i>Giardia sp</i> y <i>Cryptosporidium sp</i> en agua por la técnica de filtración, separación inmunomagnética y microscopía de inmunofluorescencia.....	119
--	-----

Bibliografía.....	143
Elaboración	147

Presentación

Este manual, elaborado en formato y lenguaje sencillos, tiene por objetivo auxiliar a personas que trabajan en los laboratorios de control de la calidad del agua de estaciones de tratamiento de pequeño y mediano porte, en el desarrollo de sus actividades diarias.

La idea nació de la necesidad de tener en el laboratorio un instrumento de consulta que pudiera acompañar los pasos del técnico a todo momento y en cualquier lugar.

En él está la descripción de los procedimientos más comunes que se llevan a cabo cotidianamente en el laboratorio de una Estación de Tratamiento de Agua (ETA). Todas las técnicas adoptadas en este manual atienden al Artículo 22 de la Portaria nº 2.914/2011 del Ministerio de Salud, estando en conformidad con las normas nacionales e internacionales más recientes, como lo son: I) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de autoría de las instituciones American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) y Water Environment Federation (WEF); II) United States Environmental Protection Agency (USEPA); III) Normas publicadas por la International Standardization Organization (ISO); y Metodologías propuestas por la Organización Mundial de Salud (OMS). En caso del procedimiento aquí mencionado que demande un conocimiento más profundo, se debe consultar los grandes compendios que tratan del tema.

La primera parte del manual aborda las pruebas bacteriológicas involucrando la investigación de coliformes totales y termotolerantes, incluso *Escherichia coli* y el recuento estandar de bacterias heterotróficas, desde el preparo del material a ser utilizado, pasando por la realización de ensayos, hasta la emisión de resultados. En la segunda parte

se describen las técnicas de los análisis fisicoquímicos y pruebas de rutina de una ETA y, finalmente, la preparación de todos los reactivos utilizados. Han sido agregados también algunos procedimientos de bioseguridad en laboratorio, así como una relación de equipos y materiales de laboratorio.

En el Apéndice A se presentan las técnicas de recolección y preservación de muestras para recuento de células de cianobacterias y cianotoxinas. En el Apéndice B la técnica de determinación de *Giardia sp* y *Cryptosporidium sp* en agua por la técnica de filtración, separación inmunomagnética y microscopía de inmunofluorescencia.

Se cree que los parámetros aquí descritos sean suficientes para monitoreo y control de la calidad del agua distribuida para consumo humano.

La prueba del agua destinada al consumo humano es de fundamental importancia, ya que permite aferir la ausencia o presencia de microorganismos o sustancias químicas presentes en ella, los cuales pueden ser perjudiciales a la salud de las personas.

Prueba bacteriológica del agua

Coliformes totales

Coliformes termotolerantes

Bacterias heterotróficas



Introducción

La detección y cuantificación de todos los microorganismos patogénicos potencialmente presentes en el agua demanda tiempo, los costos son elevados y no siempre se obtienen resultados positivos o que confirmen la presencia de los microorganismos.

El objetivo de la prueba microbiológica del agua es proveer subsidio acerca de su potabilidad, es decir, ausencia de riesgo de ingestión de microorganismos causadores de enfermedades, mayormente provenientes de la contaminación por excrementos humanos y de otros animales de sangre caliente. Vale resaltar que los microorganismos presentes en aguas naturales son, en su mayoría, inofensivos a la salud humana. Pero en la contaminación por desecho sanitario están presentes microorganismos que podrán perjudicar la salud humana.

Los microorganismos patogénicos incluyen virus, bacterias, protozoarios y helmintos.

En la tabla se relacionan algunas enfermedades vehiculadas por el agua y sus agentes.

Enfermedades	Agentes patogénicos
Origen bacteriana Fiebre tifoidea y paratifoidea Disentería bacilar Cólera Gastroenteritis agudas y Diarreas	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi A y B</i> <i>Shigella sp</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Escherichia coli enterotóxica</i> <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella sp</i> <i>Shigella sp</i>
Origen viral Hepatitis A y E Poliomielitis Gastroenteritis agudas y crónicas	Virus de la hepatitis A y E Virus de la poliomielitis Virus Norwalk Rotavirus Enterovirus Adenovirus
Origen parasitaria Disentería amebiana Gastroenteritis	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i>

Fuente: OPAS, 1999

El agua potable no debe contener microorganismos patogénicos y debe estar libre de bacterias indicadoras de contaminación fecal. Como indicadores de contaminación fecal, las bacterias de referencia elegidas son las del grupo coliforme. El principal representante de ese grupo de bacterias es llamado *Escherichia coli*.

Ese grupo de bacterias ha sido elegido como indicador de contaminación del agua debido a los siguientes factores:

- a. Están presentes en el excremento de animales de sangre caliente, incluso de los seres humanos;
- b. Son de fácil detección y cuantificación por medio de técnicas sencillas y económicamente viables, en cualquier tipo de agua;
- c. Su concentración en el agua contaminada está directamente relacionada al gradiente de contaminación fecal;
- d. El tiempo de sobrevivencia en el agua es mayor que las bacterias patogénicas intestinales, por ser menos exigentes en términos nutricionales, además de ser incapaces de multiplicarse en ambiente acuático o multiplicarse menos que las bacterias entéricas;
- y. Son más resistentes a los agentes tensoactivos y agentes desinfectantes que a las bacterias patogénicas.

La Portaria nº 2.914/2011 del Ministerio de Salud (Resolución de Potabilidad) establece que se verifique en el agua para consumo humano a fin de asegurar su potabilidad, la ausencia de coliformes totales y *Escherichia coli* y determinado el recuento de bacterias heterotróficas.

La misma Resolución establece que el recuento de bacterias heterotróficas deba ser llevado a cabo como uno de los parámetros para evaluar la integridad del sistema de distribución (reservatorio y red), y se debe hacerse en 20% de las muestras mensuales de coliformes totales en el sistema de distribución, recomendando que no debe exceder a 500 Unidades Formadoras de Colonias por 1 mililitro de muestra (500 UFC/ml).

Para la conformidad del patrón microbiológico de potabilidad es obligatoria la ausencia de coliformes totales en 100 ml de muestra en la salida del tratamiento. Sin embargo, de acuerdo al Anexo I de la Portaria MS nº 2.914/2011, se admite la presencia de coliformes totales en tan solo 1 muestra mensual para sistemas o soluciones colectivas que abastecen menos de 20.000 habitantes y en 5% de las muestras mensuales en sistemas o soluciones colectivas que abastecen más de 20.000 habitantes. Se recalca que en ambas las situaciones no se permite la presencia de *Escherichia coli* en el agua para consumo humano.

Bacterias del grupo coliforme

Conceptos:

- **Coliformes totales** (bacterias del grupo coliforme) – bacilos gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no formadores de esporos, oxidase-negativos, capaces de desarrollarse en presencia de sales biliares o agentes pensativos que fermentan la lactosa con producción de ácido, gas y aldehído a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en 24-48 horas, e que pueden presentar actividad de la enzima β – galactosa. La mayoría de las bacterias del grupo coliforme pertenece a los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, aunque varios otros géneros y especies pertenezcan al grupo;

- **Coliformes termotolerantes** – subgrupo de las bacterias del grupo coliforme que fermentan la lactosa a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en 24 horas; teniendo por principal representante la *Escherichia coli*, de origen exclusivamente fecal;

- ***Escherichia coli*** – bacteria del grupo coliforme que fermenta la lactosa y manitol, con producción de ácido y gas a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en 24 horas, produce indo a partir del triptófano, oxidase negativa, no hidroliza la urea y presenta actividad de las enzimas β galactosa y β glucuronidase, que es considerado el más específico indicador de contaminación fecal reciente y de eventual presencia de organismos patogénicos.

El origen fecal de la *E. coli* es incuestionable y su naturaleza ubicua poco probable, lo que valida su papel más específico de organismo indicador de contaminación, tanto en aguas naturales como tratadas.

El Recuento Estándar de Bacterias es muy importante durante el proceso de tratamiento del agua, ya que permite evaluar la eficiencia de varias etapas del tratamiento.

Es importante también conocer la densidad de bacterias, haya visto que un aumento considerable de la población bacteriana puede comprometer la detección de organismos coliformes. Aunque la mayoría de esas bacterias no sea patogénica, puede representar riesgos a la salud, como también, deteriorar la calidad del agua, provocando olores y sabores desagradables.

Material utilizado en bacteriología

- a) autoclave;
- b) estufa bacteriológica;
- c) estufa de esterilización e secamiento;
- d) balanza;
- e) destilador;
- f) baño maría;
- g) contador de colonias;
- h) asa de platina con cable;
- i) tubo de Durham;
- j) tubo de ensayo;
- k) algodón en rama;
- l) medios de cultivo;
- m) frascos recolectores;
- n) pipetas graduadas;
- o) pipeteador;
- p) papel aluminio;
- q) lamparilla de alcohol o pico de Bunsen;
- r) placas de Petri;
- s) pinza de acero inoxidable;
- t) membranas filtrantes;
- u) porta filtro de vidrio o acero inoxidable;
- v) lámpara ultravioleta

Preparación del material de vidrio

Tubos de ensayo

- a) poner el tubo de Durham en posición invertida dentro del tubo de ensayo;
- b) tapar el tubo de ensayo con una guata de algodón en rama.

Frascos recolectores

- a) poner dos gotas (0,1 ml) de Tiosulfato de Sodio a 10% dentro del frasco;
- b) poner un tirante de papel aluminio entre la boca y el tapón del frasco;
- c) involucrar la boca y tapón del frasco en papel aluminio.

Pipetas

- a) poner una pequeña guata de algodón en la boca de la pipeta;
- b) involucrarla en papel aluminio o papel madera (Kraft).

Placas de Petri de vidrio

- a) involucrarlas en papel aluminio o papel madera.

Nota: Frascos recolectores, pipetas y placas de Petri deben ser esterilizados y antes del preparo deben estar limpios y secos (ver esterilización pág. 38).

Medios de cultivo

- a) caldo lactosa;
- b) caldo lactosa verde brillante Bilis a razón de 2%;

- c) caldo EC;
- d) Plate Count Agar

Preparación de los medios de cultivo

Caldo lactosa doble concentración

- a) pesar 26 gramos del medio de cultivo y disolver en 1.000 ml de agua destilada;
- b) distribuir en tubos de ensayo (10ml en cada tubo), tapar los tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de presión) en autoclave durante 15 minutos;
- d) dejar enfriar;
- e) guardar en refrigeración (válido por una semana).

Caldo lactosa simple concentración

- a) pesar 13 gramos del medio de cultivo deshidratado y disolver en 1.000 ml de agua destilada;
- b) distribuir en tubos de ensayo (10ml en cada tubo), tapar los tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de presión) en autoclave durante 15 minutos;
- d) dejar enfriar;
- e) guardar en refrigeración (válido por una semana).

Caldo lactosa verde brillante bilis a 2%

- a) pesar 40 gramos del medio de cultivo deshidratado y disolver en 1.000 ml de agua destilada;

- b) distribuir en tubos de ensayo (10ml en cada tubo), tapan los tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de presión) en autoclave durante 15 minutos;
- d) dejar enfriar;
- e) guardar en refrigeración (válido por una semana).

Medio EC

- a) pesar 37,0 gramos del medio deshidratado y disolver en 1000 ml de agua destilada;
- b) distribuir en tubos de ensayo en campana Durham invertida, a razón de 10 ml en cada tubo, tapan los tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1Kg/cm² de presión) en autoclave durante 15 minutos;
- d) guardar en refrigeración (válido por 96 horas).

Plate Count Agar

- a) pesar 20,5 gramos del medio de cultivo deshidratado y disolver en 1000 ml de agua destilada fría;
- b) dejar descansar por 5 minutos;
- c) calentar, moviendo a menudo con bastón de vidrio, hasta la total disolución del medio (durante el calentamiento, no dejar que entre en ebullición);
- d) de ser necesario, ajustar el pH para 7,0 con Hidróxido de Sodio solución normal (NaOH 1N);
- e) distribuir en tubos de ensayo con tapón a rosca (12 ml en cada tubo);
- f) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de presión) en autoclave durante 15 minutos.

- Notas:** 1. Este medio, luego que se enfría, se solidifica. Fundir al baño maría antes de usarlo.
2. Debido a la variedad de medios de cultivo existentes en el mercado, seguir siempre las instrucciones del fabricante, que aparecen en el rótulo del frasco.

Agua de dilución

Solución 1

- pesar 34 gramos de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y disolver en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH para 7,2 con solución hidróxidos de sodio, solución 1N y diluir a 1 litro con agua destilada. Normalmente se demanda 175 ml de NaOH para elevar el pH.

Solución 2

- pesar 81,1 gramos de cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y disolver en 1 litro de agua destilada.

Solución 3

- adicionar 1,25 ml de la **solución 1** y 5 ml de la **solución 2** a 1 litro de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo en cantidad que, luego de la autoclave, puedan asegurar un volumen de $9 \pm 0,2$ ml.
- esterilizar en autoclave a 121°C ($1\text{Kg}/\text{cm}^2$ de presión) durante 15 minutos.

Modo de usar el agua de dilución al momento de determinar el NMP de coliformes

- a) tomar 1 tubo de ensayo con $9 \pm 0,2$ ml de agua de dilución esterilizada;
- b) adicionar 1 ml de la muestra de agua a ser probada;
- c) mezclar bien. Está lista a dilución 1:10;

- d) tomar de la referida dilución, con pipeta esterilizada, 1 ml e inocular en el tubo con caldo lactosa simple concentración. (dilución 1:100).

Recolección de muestras de agua para pruebas bacteriológicas

La recolección de muestra es uno de los pasos más importantes para la evaluación de la calidad del agua. Por lo tanto, es esencial que se lleve a cabo el muestreo con precaución y técnica para evitar todas las fuentes de posible contaminación.

Las muestras deben ser recolectadas en frascos de vidrio blanco, boca ancha, con tapón de vidrio esmerilado, bien ajustado, con capacidad de 125 ml, previamente esterilizados o bolsa de plástico estéril, desechable, conteniendo pastilla de tiosulfato de sodio.

Los frascos para la recolección de aguas cloradas deben recibir, antes de ser esterilizados, 0,1 ml (2 gotas) de bisulfato de sodio a 10%.

Procedimientos para recolección en casa

- a) lavar las manos con agua y jabón;
- b) limpiar el grifo del usuario con un trozo de algodón en alcohol, 70% y/o hipoclorito de sodio 100mg/l;
- c) abrir el grifo y dejar correr el agua durante 1 o 2 minutos;
- d) recolectar muestra de agua;
- e) llenar al menos 3/4 de su volumen;
- f) tapar el frasco, identificarlo, apuntando dirección, hora y nombre del colector, etc.;

- g) marcar el frasco con el número de la muestra, correspondiente al punto de recolección;
- h) rellenar la ficha de identificación de la muestra de agua;
- i) poner el frasco de la muestra en la caja de poliestireno con hielo;
- j) lacrar, identificar y enviar la caja para el laboratorio.

El tiempo entre la recolección y la prueba no debe exceder a 24 horas;

Nota: Además de las casas, las muestras pueden ser recolectadas en hospitales, escuelas, grifos públicos y locales considerados vulnerables. En caso de utilización del hipoclorito de sodio para desinfección del grifo, se debe removerlo completamente antes de la recolección.

Fases del procedimiento



Fuente: OMS, 1998 (adaptado)

Otros locales de recolección

En las estaciones de tratamiento, las muestras pueden ser recolectadas en la captación, llegada del agua bruta antes del canal de la Parshall, en los decantadores, en la salida de los filtros y en los reservorios de agua tratada.

Procedimientos para la prueba

Coliformes totales

Método de los tubos múltiples (TM)

Material necesario:

- a) tubo de ensayo.
- b) estante para tubo de ensayo.
- c) tubo de Durham.
- d) pipeta graduada de 10 ml. e) pipeta graduada de 1 ml.
- f) pico de Bunsen o lamparilla de alcohol.
- g) caldo Lactosa doble concentración.
- h) caldo Lactosa simple concentración.
- i) caldo Lactosa Verde Brillante Bilis a 2%.
- j) agua de dilución.
- k) asa de platina con cable de Kolle.
- l) estufa bacteriológica.

Ejecución de la prueba

Prueba presuntiva

- a) tomar una batería con 15 tubos de ensayo distribuidos de 5 en 5;
- b) en los primeros 5 tubos, (los que contienen caldo lactosa doble concentración) inocular con pipeta esterilizada, 10 ml de la muestra de agua a ser probada, en cada tubo. (Dilución 1:1);

- c) en los 10 tubos restantes (los que contienen caldo lactosa simple concentración), inocular en los 5 primeros, 1 ml de la muestra (Dilución 1:10) y en los 5 últimos tubos, inocular 0,1 ml de la muestra, en cada tubo. (Dilución 1:100). Ver página 15;
- d) mezclar;
- e) incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24/48 horas;
- f) si al cabo de 24/48 horas, haya la formación de gas dentro del tubo de Durham, significa que la prueba presuntiva ha sido positiva. En este caso, hacer prueba confirmativa. Si no hay la formación de gas durante el período de incubación, la prueba termina en esta fase y se considera el resultado de la prueba negativo.

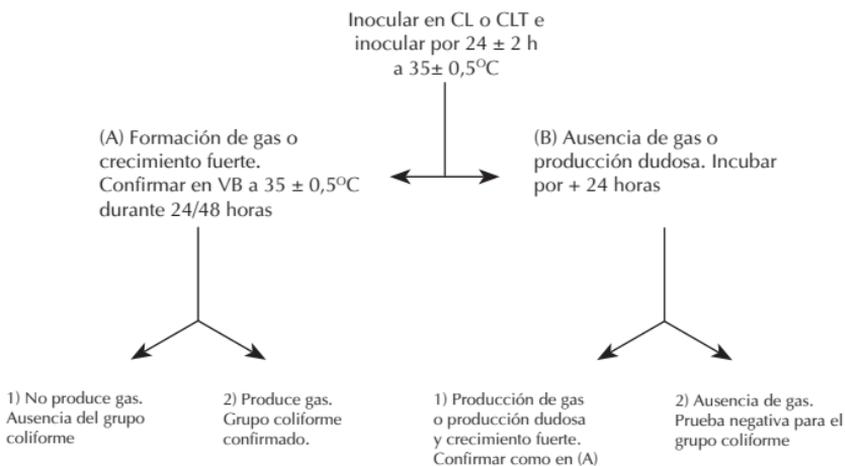
Observación: En lugar de caldo lactosa se puede utilizar el caldo Lauril Triptosa.

Prueba confirmativa

- a) tomar el número de tubos de Prueba Presuntiva que resultaron Positivos (formación de gas) en las 3 diluciones 1:1; 1:10 y 1:100;
- b) tomar igual número de tubos conteniendo el medio de cultivo verde brillante bilis a 2%;
- c) con el asa de platina, previamente flameada y fría, retirar de cada tubo positivo una porción de muestra e inocular en el tubo correspondiente conteniendo el medio verde brillante. A este procedimiento se da el nombre de transplante;
- d) identificar los tubos;
- e) incubar durante 24/48 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- f) si al final del período de 24/48 horas haya la formación de gas dentro del tubo de Durham, la prueba es

considerada positiva. Caso no haya formación de gas, la prueba es considerada negativa.

Fases de prueba



Nota: CL = caldo lactosa
CLT = caldo lauril triptosa
VB = verde brillante bilis a 2%

Expresión de los resultados

- a) los resultados se expresan en N.M.P (Número Más Probable)/100 ml de muestra.
- b) para determinar el N.M.P, se verifica la combinación formada por el número de tubos positivos que presentaron las diluciones 1:1; 1:10; y 1:100 en la Prueba Confirmativa.

Ejemplo:

- a) en los 5 tubos de la dilución 1:1, se obtuvo 3 tubos positivos;
- b) en los 5 tubos de la dilución 1:10, se obtuvo 2 tubos positivos;
- c) en los 5 tubos de la dilución 1:100, se obtuvo 1 tubo positivo;
- d) se formó, por lo tanto, la combinación 3-2-1;
- e) se determina el N.M.P consultándose la tabla 1.

Si no desea trabajar con 15 tubos para determinar el N.M.P., hacer tan solo 5 tubos en la dilución 1:1 (10 ml del medio de cultivo + 10 ml de la muestra) y calcular el N.M.P. consultándose la tabla 2.

Tabla 1 – N.M.P. con límite de confiabilidad de 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan 5 tubos para cada dilución (10 ml, 1,0 ml y 0,1 ml)

Combinación de positivos	N.M.P./100 mL	Límites	
		Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	22	12	63
4-2-0	26	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	560
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820

Combinación de positivos	N.M.P./100 mL	Límites	
		Inferior	Superior
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	1600	-	-

Source: APHA, 1985

Tabla 1 – N.M.P. con límite de confianza de 95% para los resultados positivos cuando se examinan 5 porciones de 10 ml

Combinación de positivos	N.M.P./100 mL	Límites	
		Inferior	Superior
0	< 2,2	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	>16,0	8,0	Infinito

Source: APHA, 1985

Coliformes termotolerantes

Método de los tubos múltiples (TM)

Material necesario:

- tubos de ensayo con Medio EC;
- pico de Bunsen o lamparilla a alcohol;
- asa de platina;
- baño maría.

Ejecución del ensayo

- a) tomar todos los tubos de la Prueba Presuntiva que resultaron Positivos (Formación de gas) y todos los tubos negativos en que hubo crecimiento luego de 48 horas, en las diluciones (1:1; 1:10 y 1:100);
- b) transferir, con asa de platina flameada y fría, una porción para los tubos de ensayo conteniendo el medio EC;
- c) mezclar y dejar todos los tubos en baño de agua durante 30 minutos;
- d) incubar en baño maría a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas;
- e) si al fin de 24 horas o menos haya la formación de gas, hay indicación de la presencia de coliformes termotolerantes;
- f) calcular el N.M.P. consultando la tabla 1.

Nota: Este ensayo debe ser llevado a cabo simultáneamente a la Prueba Confirmativa para Coliformes Totales.

Observación: Siempre hacer esta prueba toda vez que se lleve a cabo pruebas confirmativas para coliformes totales.

Recuento de bacterias heterotróficas

Material necesario

- a) placa de Petri;
- b) pipeta graduada;
- c) pico de Bunsen o lamparilla de alcohol;
- d) plate Count Agar;
- e) estufa bacteriológica;
- f) contador de colonias.

Ejecución del ensayo

- a) transferir, con pipeta estéril, 1 ml de la muestra para una placa de Petri previamente esterilizada;
- b) entreabrir la placa y adicionar el medio de cultivo previamente fundido y estabilizado en baño maría a 44-46°C, contenido en el tubo de ensayo;
- c) homogeneizar al contenido de la placa en movimientos circulares moderados en forma de (∞), alrededor de 10 veces consecutivas;
- d) cuando el medio de cultivo se solidifique, incubar la placa en posición invertida a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas;
- e) al final del período de incubación, hacer el recuento de las colonias con el auxilio de un contador de colonias.

Expresión de los resultados

Los resultados se presentan como número de colonias de bacterias/ml o Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml.

Notas:

- a) antes de iniciar las pruebas, desinfectar la bancada del laboratorio utilizando solución de alcohol etílico a 70% u otro desinfectante que no deje residuo;
- b) todas las muestras a ser probadas deben ser homogeneizadas al menos 25 veces;
- c) no olvidar flamear la boca de los tubos de ensayo conteniendo medios de cultivo, antes de utilizarlos;
- d) el bisulfato de sodio a 10% puesto en los frascos de recolección es para neutralizar la acción del cloro;
- e) las placas de Petri deben ser puestas en posición invertida para evitar la condensación de agua en la superficie del agar;
- f) hacer el recuento estándar de bacterias heterotróficas, siempre en duplicata.

Coliformes totales

Método de la membrana filtrante (MF)

Material necesario:

- a) equipo de filtración con porta filtro;
- b) placa de Petri esterilizada de \varnothing 47 mm;
- c) filtros de membrana de \varnothing 47 mm y porosidad de 0,45 μ m, con tarjeta absorbente;

- d) medio de cultivo (m Endo Broth MF);
- e) agua de dilución estéril;
- f) pinza de acero inoxidable;
- g) vaso de acero inoxidable;
- h) pico de Bunsen o lamparilla de alcohol;
- i) bomba de vacío (jeringa);
- j) estufa bacteriológica.

Ejecución del ensayo

- a) con la pinza, poner cuidadosamente en la placa de Petri una tarjeta absorbente;
- b) con pipeta esterilizada, poner 1,8 ml del medio de cultivo en la tarjeta absorbente y cubrir la placa;
- c) poner la membrana filtrante en el porta filtro, con la pinza previamente flameada y fría;
- d) mover el frasco con la muestra, por lo menos 25 veces;
- e) destapar y flamear la boca del frasco;
- f) verter, cuidadosamente, 100 ml de muestra en el porta filtro, evitando esparcimiento del agua sobre los bordes superiores;
- g) prender la bomba de vacío (jeringa) y succionar;
- h) después de filtrada la muestra, lavar 3 veces las paredes del embudo con agua de dilución estéril con porciones de 20 ml aplicando vacío;
- i) luego del lavado y filtrado, aliviar el vacío y remover el embudo del soporte;

- j) con la pinza flameada y fría, remover el filtro del soporte y ponerlo en la placa de Petri, previamente preparada, con el lado cuadrículado hacia arriba;
- k) tapar la placa de Petri e incubarla invertida a 35°C durante 24 ± 2 horas;
- l) luego del período de incubación, probar el filtro con el recuento de las colonias.

Lectura de los resultados

Las colonias indicativas de coliformes totales típicas tienen un color rosa a rojo oscuro, con brillo metálico.

El brillo puede aparecer en el centro o en la periferia de la colonia. Las no coliformes aparecen con color rojo claro o oscuro sin el brillo metálico característico.

Observación: A veces, cuando el disco está muy húmedo y la fuente de luz es muy intensa, las colonias de no coliformes pueden aparecer con un brillo falso, causando errores. Esto podrá ser contornado usándose fuente de luz más difusa o secándose el filtro antes de ser probado.

Preparación del medio de cultivo

Material necesario:

- a) medio de cultivo deshidratado (m Endo Broth MF);
- b) agua destilada;
- c) alcohol etílico a 95%;
- d) frasco *Erlenmeyer* de 125 ml;
- e) vidrio de reloj;
- f) pico de Bunsen o lamparilla a alcohol.

Técnica

- a) pesar 4,8 gramos del medio deshidratado;
- b) transferir para el *Erlenmeyer*;
- c) adicionar poco a poco 100 ml de agua destilada con 2 ml de alcohol etílico a 95%;
- d) calentar en baño maría o en el pico de Bunsen hasta el inicio de ebullición (no dejar hervir);
- e) dejar enfriar;
- f) distribuir 1,8 ml en cada placa.

Observación: 1. Preparar únicamente la cantidad necesaria para uso. Se puede adquirir este medio en ampollas de 2 ml, pero el costo es muy elevado. Es más económico prepararlo en laboratorio.

2. En sustitución al medio m Endo Broth MF podrá ser utilizado el medio sólido (LES Endo agar).

Coliformes termotolerantes

Método de la membrana filtrante (MF)

Material necesario

- a) equipo de filtración con porta filtro;
- b) placa esterilizada de Ø 47 mm;
- c) filtros de membrana de Ø 47 mm y porosidad de 0,45µm, con tarjeta absorbente;
- d) medio de cultivo (m FC Broth Base);
- e) agua de dilución estéril;
- f) pinza de acero inoxidable;
- g) vaso de acero inoxidable;

- h) pico de Bunsen o lamparilla de alcohol;
- i) bomba de vacío (jeringa);
- j) estufa bacteriológica o baño maría. Preparación del medio de cultivo

Material necesario:

- a) medio de cultivo deshidratado (m FC Broth Base);
- b) agua destilada;
- c) ácido rosólico a 1% en NaOH 0,2 N;
- d) frasco *Erlenmeyer* de 125 ml;
- e) vidrio de reloj;
- f) pico de Bunsen o lamparilla de alcohol.

Técnica

- a) pesar 3,7 gramos del medio deshidratado;
- b) transferir para el *Erlenmeyer*;
- c) disolver el medio pesado, en 100 ml de agua destilada;
- d) adicionar 1 ml de la solución de ácido rosólico a 1%;
- e) calentar hasta la ebullición;
- f) dejar enfriar;
- g) distribuir 2,0 ml en cada placa.

Observación: 1. Preparar únicamente la cantidad necesaria para uso;
2. Este medio puede ser adquirido en ampollas de 2 ml, pero el costo es muy elevado. Es más económico prepararlo en el laboratorio;

3. Para preparar el ácido rosólico a 1%, disolver 1 gramo del ácido en 100 ml de NaOH 0,2 N;
4. Para preparar el NaOH 0,2 N diluir 20 ml de la solución 1N para 100 ml de agua destilada;
5. El ácido rosólico dura 2 semanas o menos, cuando acondicionado en refrigeración. (2 a 10°C).
Deséchalo cuando el color cambiar de rojo oscuro a marrón;
6. Este medio puede ser solidificado adicionando 1,2 a 1,5% de agar antes de la ebullición.

Ejecución del ensayo

- a) con la pinza, poner cuidadosamente una tarjeta absorbente en la placa de Petri;
- b) con pipeta esterilizada, poner 2,0 ml del medio de cultivo en la tarjeta absorbente y tapar la placa;
- c) poner la membrana filtrante en el porta filtro, con la pinza previamente flameada y fría;
- d) mover el frasco con la muestra, por lo menos 25 veces;
- e) destapar y flamear la boca del frasco;
- f) verter, cuidadosamente, 100 ml de muestra en el porta filtro, evitando el esparcimiento del agua sobre los bordes superiores;
- g) prender la bomba de vacío (jeringa) y succionar;
- h) después de filtrada la muestra, lavar 3 veces las paredes del embudo con agua de dilución estéril con porciones de 20 ml aplicando vacío;
- i) luego del lavado y filtrado, aliviar el vacío y remover el embudo del soporte;

- j) con el asa flameada y fría, remover el filtro del soporte y ponerlo dentro de la placa de Petri, con el lado cuadrículado hacia arriba;
- k) tapar la placa de Petri e incubarla invertida a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas;
- l) finalizado el período de incubación, probar el filtro haciendo el recuento de las colonias;
- m) las colonias indicativas de coliformes termotolerantes aparecen en color azul. Las no coliformes aparecen en color clara o rosada.

Esterilización del conjunto de filtración en campo

- a) humidificar cuidadosamente el anillo de asbesto localizado en la base del soporte, con media tapa de alcohol metílico (tapa del frasco de alcohol);
- b) atear fuego;
- c) poner la cuba de acero por encima del embudo casi cubriéndolo;
- d) luego de calentar la cuba hasta lo soportable por la mano, tapar el soporte;
- e) esperar alrededor de 15 minutos y luego remover la cuba y lavar el embudo con agua de dilución estéril a fin de remover todo residuo tóxico.

Observaciones:

1. La quema incompleta del metanol provoca la formación de aldehído fórmico que es el agente esterilizante;
2. El soporte del filtro debe estar estéril al comienzo de cada serie de filtración y esa serie debe ultrapasar más de 30 muestras. En cada serie de filtración, hacer la prueba de 100 ml del agua de dilución para control de la esterilidad del porta filtro;

3. Los medios de cultivo preparados para uso con membrana filtrante valen por 96 horas cuando acondicionados en refrigeración a temperatura entre 2 a 10°C;
4. El conjunto de filtración también puede ser esterilizado en autoclave.

Coliformes totales y Escherichia coli

Prueba de presencia/ausencia

Método del sustrato cromogénico

La opción de la metodología para la realización de las pruebas bacteriológicas del agua recae en el procedimiento que mejor se adapte a las condiciones del laboratorio. Sin embargo, se debe adoptar como patrón a las metodologías, frecuencia e interpretación de resultados establecidos y recomendados por la legislación vigente.

Los métodos de Tubos Múltiples (TM) y Membrana Filtrante (MF) aún son utilizados ampliamente. Sin embargo, la opción por el método de Sustrato Cromogénico Fluorogénico Definido es comúnmente adoptado por la facilidad de manejo, como también por su relativo costo/beneficio ya comprobado.

El método se basa en las actividades enzimáticas específicas de los coliformes (β galactosidase) y *E. coli* (β glucuronidase). Los medios de cultivo contienen nutrientes indicadores (sustrato cromogénico) que, hidrolizados por las enzimas específicas de los coliformes y/o *E. coli*, provocan un cambio de color en el medio. Luego del período de incubación, si se observa el color amarillo, coliformes totales están presentes. Si se observa la fluorescencia azul bajo luz ultravioleta (UV) 365 nm, *E. coli* está presente.

Además de ser más exacto, ese método tiene como ventaja el tiempo de respuesta, ya que se hace la determinación simultánea de coliformes (totales) y E. coli luego de la incubación de las muestras a 35°C por 24 horas, sin la necesidad de ensayos confirmativos.

Material necesario:

- a) recipiente de recolección de vidrio o de plástico;
- b) sustrato cromogénico (ONPG)/fluorogénico (MUG);
- c) estufa bacteriológica;
- d) lámpara ultravioleta de 365 nm.

Ejecución del ensayo

- a) recolectar la muestra (100 ml) en un frasco estéril o bolsa de recolección conteniendo bisulfato de sodio a 10% para agua tratada;
- b) en el mismo frasco o bolsa, adicionar el contenido de 1 (un) pequeño frasco con el sustrato cromogénico;
- c) cerrar el frasco o la bolsa y moverlo levemente. No es necesario disolver totalmente, ya que esa disolución sucederá de forma natural;
- d) incubar a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Interpretación y expresión de los resultados

Transcurridas 24 horas de incubación, retirar de la estufa el material y observar visualmente el frasco o bolsa. Si se presenta el color amarilloso, el resultado es presencia de Coliformes Totales en la muestra.

Con el auxilio de una lámpara ultravioleta 365 nm, observar si existe fluorescencia azul en las muestras que desarrollan color amarilloso acercando la lámpara al frasco. Si la muestra presentar color amarilloso y fluorescencia con luz UV-365 nm, significa que hay presencia de *Escherichia coli* en la muestra probada.

Caos la muestra permanezca transparente, el resultado es negativo, tanto para Coliformes Totales como para *E. coli*.

Expresar el resultado como: Presencia o Ausencia de Coliformes Totales o *Escherichia coli*.

Nota: La fluorescencia azul ocurre únicamente en presencia de luz ultravioleta, al sacar el frasco del contacto con la luz él regresa a ponerse amarillo.

Esterilización

Los siguientes materiales deben ser esterilizados: frascos de recolección de muestra, pipetas, placas de Petri de vidrio, frascos y tubos con agua de dilución y medios de cultivo.

Procedimientos para la esterilización

- a) preparar todo el material;
- b) verificar si el nivel de agua dentro del autoclave está por encima de las resistencias. Rellenar si necesario;
- c) poner todo el material dentro del depósito metálico y tapar el autoclave;
- d) apretar las trabas de la tapa, dos a dos, para no permitir la salida de vapor por el borde del equipo. Conectar el equipo en corriente;
- e) prender la llave selectora de temperatura en posición "Máximo";

- f) abrir inmediatamente la válvula de escape de vapor;
- g) cuando empezar a salir vapor por esa válvula, esperar tres minutos y cerrarla.
- h) en ese momento, el puntero del manómetro comenzará a subir;
- i) cuando el puntero alcanzar la marca de 1Kg/cm^2 de presión, la temperatura deberá estar en 121°C . Dejar en esta posición durante 20 minutos;
- j) si la presión seguir subiendo, ponga la llave selectora de temperatura del autoclave en la posición "mediana" y observe;
- k) transcurridos 20 minutos, el material ya estará esterilizado;

Observación: Normalmente las autoclaves tienen una llave selectora de temperatura que indica tres posiciones "Mínima, Media y Máxima", justo para mantener la presión y temperatura dentro de la franja utilizada. Sirve también para conectar y desconectar el equipo. Actualmente existen autoclaves microprocesadas que llevan a cabo las etapas, es decir, el ciclo de esterilización y descontaminación automáticamente, bajo la programación del usuario.

- l) desconectar el equipo y esperar que el puntero del manómetro alcance la posición "0". Se puede acelerar este procedimiento abriéndose lentamente la válvula de escape del vapor;

Atención: No abrir dicha válvula de un solo jalón!

- m) cuando el puntero del manómetro alcanzar la posición "0" y no salga más vapor por la válvula, abrir el tapón del equipo y sacar el material.

Nota: Hay varios modelos de autoclaves en el mercado. Es importante seguir siempre las instrucciones del fabricante.



Análisis fisicoquímicos del agua

Titulométricas Colorimétricas



Análisis Titulométricas

Alcalinidad total

Alcalinidad total de un agua es dada por la suma de diferentes formas de alcalinidad existentes, es decir, es la concentración de hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos, expresada en términos del carbonato de calcio. Se puede decir que la alcalinidad mide la capacidad del agua en neutralizar los ácidos.

La medida de la alcalinidad es de fundamental importancia durante el proceso de tratamiento del agua, ya que es en función de su concentración que se establece la dosificación de los productos químicos utilizados.

Normalmente las aguas superficiales tienen alcalinidad natural en concentración suficiente para reaccionar con el sulfato de aluminio en los procesos de tratamiento. Cuando la alcalinidad es muy baja o inexistente, hay la necesidad de que se provoque una alcalinidad artificial con aplicación de sustancias alcalinas, como la cal hidratada o barrilla (carbonato de sodio) para que se alcance ese objetivo.

Cuando la alcalinidad es muy elevada, se hace al revés, acidificándose el agua hasta que se obtenga una concentración de alcalinidad suficiente para reaccionar con el sulfato de aluminio u otro producto utilizado en el tratamiento del agua.

Método de determinación

Titulación con Ácido Sulfúrico

Material necesario:

- a) pipeta volumétrica de 50 ml;

- b) frasco *Erlenmeyer* de 250 ml;
- c) bureta de 50 ml;
- d) fenolftaleína;
- e) indicador metil-orange;
- f) mezcla indicadora de verde de bromocresol/rojo de metila;
- g) solución de ácido sulfúrico 0,02 N;
- h) solución de bisulfato de sodio 0,1 N.

Técnica

- a) tomar 50 ml de la muestra y ponerla en el *Erlenmeyer*;
- b) adicionar 3 gotas de la solución indicadora de verde de bromocresol/rojo de metila;
- c) titular con la solución de ácido sulfúrico 0,02 N hasta el cambio de color azul verdoso para rosado;
- d) anotar el volumen total de H_2SO_4 gasto (V) en ml.

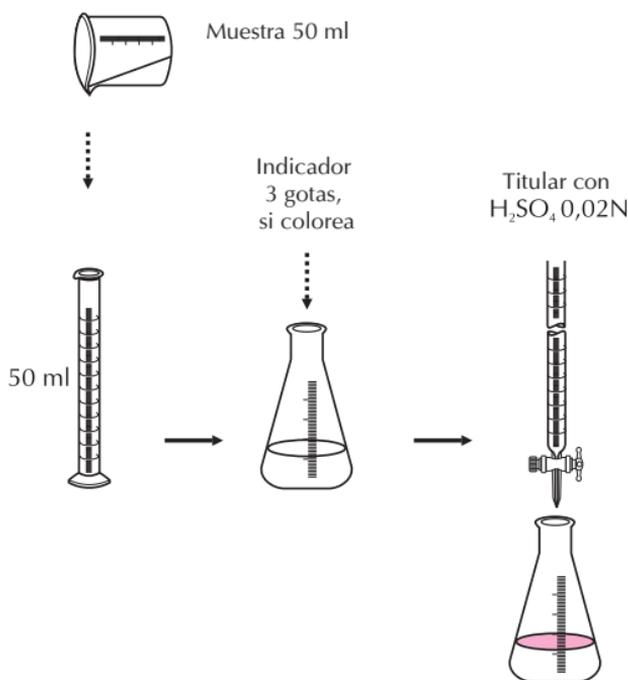
Cálculo:

Alcalinidad total en mg/L de $\text{CaCO}_3 = V \times 20$
--

- Notas:**
1. Usar 0,05 ml (1 gota) de la solución de tiosulfato de sodio 0,1 N, caso la muestra presente cloro residual libre;
 2. Utilizar esta técnica en la ausencia de alcalinidad a la fenolftaleína;
 3. Caso haya alcalinidad a la fenolftaleína, adicionar, antes de la mezcla indicadora de verde de bromocresol/rojo de metila 3 gotas de fenolftaleína y titule con H_2SO_4 0,02N hasta desaparecer el color rosado que se formó. Enseguida, seguir el paso b) de la técnica;

4. La alcalinidad a la fenolftaleína solo podrá ocurrir si el pH de la muestra es mayor que 8,2;
5. En la imposibilidad de lograr la mezcla indicadora de verde de bromocresol/rojo de metila, utilizar el indicador de metil-orange. En ese caso, el punto de viraje al paso 3 de la técnica será de amarillo para naranja;
6. El punto de viraje cuando se utiliza el indicador verde de bromocresol/rojo de metila es más nítido que cuando se utiliza metil-orange;
7. La fórmula anterior es para ser utilizada con una muestra de 50 ml. Cuando se utiliza 100 ml de muestra, el volumen (V) pasará a ser multiplicado por 10;
8. Fc – Factor de corrección de la solución titulante.

Diagrama de flujo del análisis



Gas carbónico libre

El gas carbónico libre existente en aguas superficiales normalmente está en concentración menor que 10 mg/l, mientras que las aguas subterráneas pueden existir en mayor concentración.

El gas carbónico contenido en el agua puede contribuir significativamente para la corrosión de las estructuras metálicas y de materiales a base de cemento (tubos de fibrocemento) de un sistema de suministro de agua. Por esa razón, su concentración debe ser conocida y controlada.

Método de determinación

Titulación con Hidróxido de Sodio

Material necesario:

- a) bureta de 50 ml;
- b) frasco *Erlenmeyer* de 250 ml; c) pipeta volumétrica de 100 ml; d) tapón de goma;
- e) hidróxido de sodio 0,02N;
- f) fenolftaleína.

Técnica

- a) tomar 100 ml de muestra (sin agitar) en un *Erlenmeyer*;
- b) adicionar 10 gotas de fenolftaleína, si colorea, no contiene CO₂, si no colorea, proseguir;
- c) titular con la solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,02 N gota a gota que aparezca leve color rosado persistente al menos por 30 segundos;

d) tomar nota del volumen (ml) de NaOH gasto (V).

Cálculo

$$V \times 10 \times Fc = \text{mg/L de CO}_2 \text{ libre}$$

Dónde:

Fc = factor de corrección.

Para calcular el CO₂ total, aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{mg/l CO}_2 \text{ total} = A + 0,44(2B + C)$$

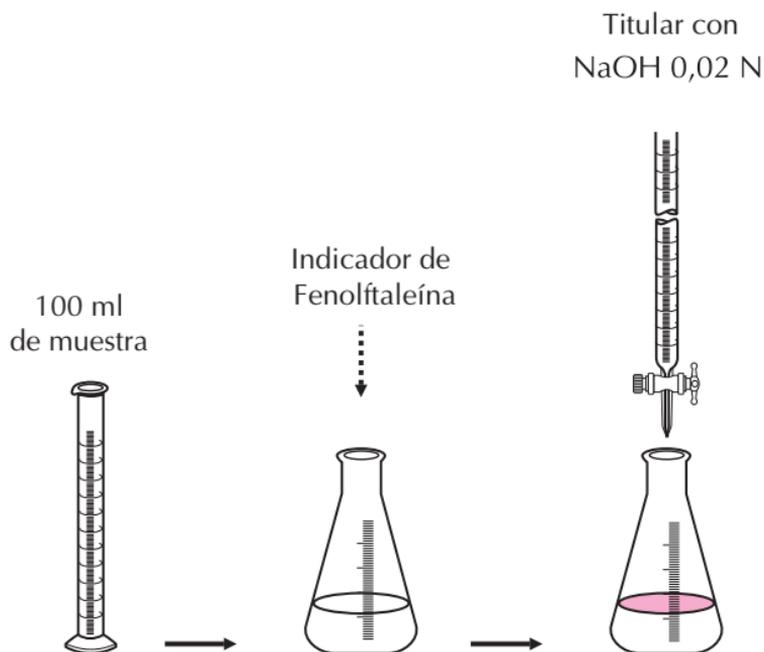
Donde:

A = mg/L CO₂ libre

B = Alcalinidad debido a bicarbonato

C = Alcalinidad debido a carbonato.

Diagrama de flujo del análisis de CO₂



Cloruros

Generalmente los cloruros están presentes en aguas brutas y tratadas en concentraciones que pueden variar de pequeños trazos hasta centenas de mg/l. Están presentes en forma de cloruro de sodio, calcio y magnesio. El agua del mar tiene elevada concentración de cloruros que está alrededor de 26.000 mg/l. Altas concentraciones de cloruros pueden restringir el uso del agua en razón del sabor que le confieren y por el efecto laxativo que pueden provocar. La Portaria nº 2.914/2011 del Ministerio de Salud establece la concentración de 250 mg/l como el valor máximo permitido para el agua potable. Los métodos convencionales de tratamiento de agua no remueven cloruros. Se puede hacer su remoción por ósmosis inversa o electrólisis (intercambio de iones).

Método de determinación

Titulación con Nitrato de Plata.

Material necesario:

- a) bureta de 50 ml;
- b) Becker de 250 ml;
- c) frasco *Erlenmeyer* de 250 ml;
- d) medidor de pH;
- e) probeta de 100 ml;
- f) solución estándar de nitrato de plata 0,0141N;
- g) solución indicadora de cromato de potasio K_2CrO_4 ;
- h) hidróxido de sodio 1N;
- i) ácido sulfúrico 1N;
- j) cloruro de sodio 0,0141 N.

Técnica

- a) poner 100 ml de muestra en el *Erlenmeyer*;
- b) ajustar el pH entre 7 y 10, si necesario, con NaOH o H_2SO_4 ;
- c) adicionar 1 ml de la solución indicadora de K_2CrO_4 ;
- d) titular con la solución estándar de nitrato de plata 0,0141 N hasta el viraje para amarillo rojizo, que es el punto final de la titulación;
- e) hacer un blanco como la muestra.

Cálculo:

$$\text{mg/L Cl} = \frac{(A - B) \times N \times 35.45}{\text{mL de la muestra}}$$

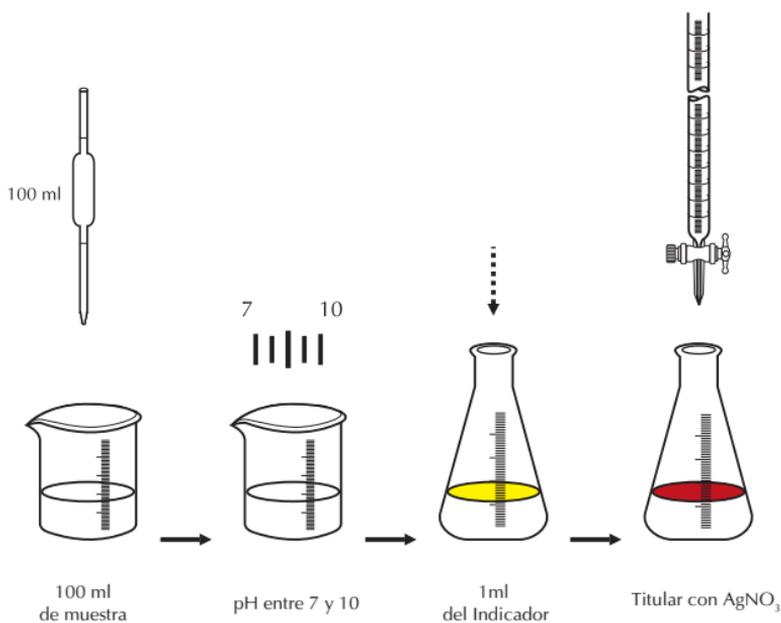
Dónde:

A = ml del titulante gasto en la muestra;

B = ml del titulante gasto en el blanco;

N = normalidad del titulante;

Diagrama de flujo del análisis de cloruros



Dureza total

La dureza total es calculada como siendo la suma de las concentraciones de iones calcio y magnesio en el agua, expresados como carbonato de calcio.

La dureza de un agua puede ser temporal o permanente.

La dureza temporal, también llamada dureza de carbonatos, es producida por la presencia de bicarbonatos de calcio y magnesio. Ese tipo de dureza resiste a la acción de los jabones y genera incrustaciones. Se denomina temporal porque los bicarbonatos, por la acción del calor, se descomponen en gas carbónico, agua y carbonatos insolubles que se precipitan.

La dureza permanente, también llamada dureza de no carbonatos, se debe a la presencia de sulfatos, cloruros y nitratos de calcio y magnesio, resiste también a la acción de los jabones, pero no genera incrustaciones por ser sus sales muy solubles en el agua. No se descompone por la acción del calor.

La portaría MS nº 2.914/2011 establece para dureza total la concentración de 500 mg/l en términos de CaCO_3 como el valor máximo permitido para agua potable.

Método de determinación

Titulación con EDTA

Material necesario:

- a) bureta de 50 ml;
- b) pipeta volumétrica de 25 ml;
- c) balón volumétrico de 50 ml;
- d) Becker de 100 ml;

- e) frasco *Erlenmeyer* de 250 ml;
- f) solución estándar de EDTA 0,01 M;
- g) solución tampón;
- h) indicador eriochrome black T;
- i) inhibidor I – cianuro de sodio P.A en polvo;
- j) inhibidor II – sulfuro de sodio.

Técnica

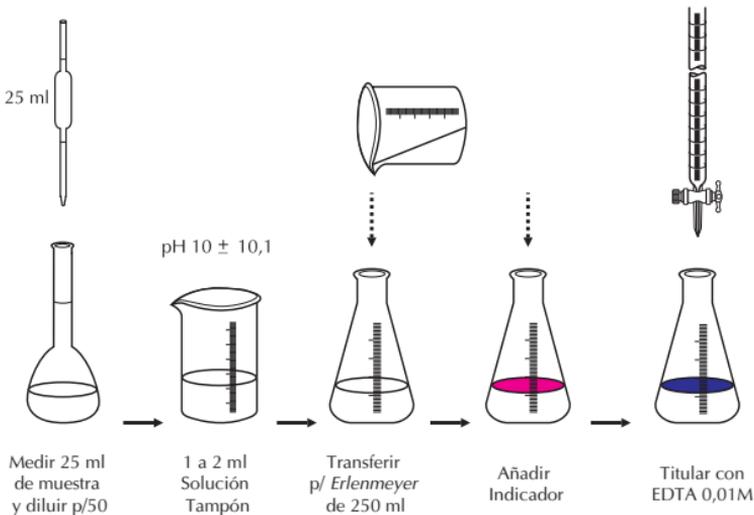
- a) tomar 25 ml de la muestra y diluir para 50 ml con agua destilada en balón volumétrico;
- b) transferir para un becker de 100 ml y adicionar 1 a 2 ml de la solución tampón para elevar el pH a $10 \pm 0,1$;
- c) transferir para un frasco *Erlenmeyer* de 250 ml y adicionar alrededor de 0,05 gramos del Indicador negro de eriocromo T;
- d) titular con EDTA 0,01M agitando continuamente hasta el desaparecimiento del color purpuro rojizo y la aparición del color azul (final de la titulación);
- e) anotar el volumen de EDTA gasto (ml);
- f) hacer un blanco con agua destilada;
- g) sustraer el volumen de EDTA gasto en la titulación del blanco del volumen de EDTA gasto en la titulación de la muestra. La diferencia es el volumen que será aplicado en el cálculo abajo.

Cálculo

$$\text{Dureza Total en mg/l CaCO}_3 = \frac{\text{ml de EDTA} \times 1000 \times F_c}{\text{ml de la muestra}}$$

- Notas:**
1. La ausencia de un punto de viraje definido, por lo general, indica la necesidad de adición de un inhibidor o que el indicador esté determinado;
 2. No tome más de 5 minutos para la titulación, medido luego de la adición de la solución tampón;
 3. Caso la dureza del agua sea muy baja, use muestra mayor, 50 a 250 ml, adicionando proporcionalmente mayor cantidad de solución tampón, del inhibidor e indicador;
 4. Caso necesite usar el inhibidor, adicionar 20 gotas del inhibidor II.
 5. Fc = Factor de corrección del EDTA cuando haya y sea diferente de 1.

Diagrama de flujo del análisis



pH

El término pH representa la concentración de iones de hidrógeno en una solución. En el agua, este factor es de excepcional importancia, principalmente en los procesos de tratamiento. En la rutina de los laboratorios de las estaciones de tratamiento él es medido y ajustado siempre que necesario para mejorar el proceso de coagulación/floculación del agua y también el control de la desinfección. El valor del pH varía de 0 a 14. Bajo 7 el agua es considerada ácida y sobre 7, alcalina. Agua con pH 7 es neutra.

La Portaria nº 2.914/2011 del Ministerio de Salud recomienda que se mantenga el pH del agua entre 6,0 y 9,5 en el sistema de distribución.

Existen en el mercado varios equipos para determinación del pH. Se denominan potenciómetros o colorímetros. En este manual, se describe el funcionamiento básico de un potenciómetro, aunque las instrucciones de los fabricantes deban ser seguidas.

Material necesario:

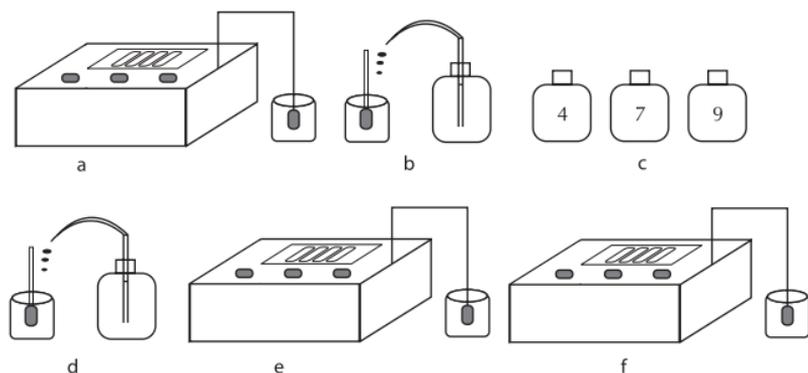
- a) potenciómetro;
- b) cubetas;
- c) frasco lavador;
- d) papel absorbente;
- e) solución tampón de pH conocido;

Técnica

- a) conectar el equipo y esperar su estabilización;

- b) lavar los electrodos con agua destilada y secarlos con papel absorbente;
- c) calibrar el equipo con las soluciones estándares (pH 4 – 7 o 10);
- d) lavar otra vez los electrodos con agua destilada y secarlos;
- e) introducir los electrodos en la muestra a ser probada y hacer la lectura;
- f) lavar una vez más y dejarlos inmersos en agua destilada;
- g) desconectar el equipo.

Diagrama de flujo de la prueba



Análisis colorimétricas

Cloro residual libre

El cloro es un producto químico utilizado en la desinfección del agua. Su medida es importante y sirve para controlar la dosificación que se está aplicando y también para seguir su evolución durante el tratamiento.

La Portaria nº 2.914/2011 del Ministerio de Salud determina la obligatoriedad de mantenerse, al menos, 0,2 mg/l de cloro residual libre o 2 mg/l de cloro residual combinado en toda la extensión del sistema de distribución (reservatorio y red). También recomienda que la concentración máxima de cloro residual libre en cualquier punto del sistema de abastecimiento sea de 2 mg/l. Los principales productos utilizados son: hipoclorito de sodio y cloro gaseoso.

Método de determinación

Comparación visual

Material necesario:

- a) comparador colorimétrico;
- b) cubetas de vidrio o de acrílico;
- c) DPD para cloro libre en cápsula;

Técnica

- a) llenar la cubeta con agua de la muestra hasta la marca de 5,0 ml;
- b) ponerla en la apertura del lado izquierdo del equipo;

- c) llenar otra cubeta hasta la marca de 5,0 ml con la muestra a ser sometida a prueba;
- d) adicionar una cápsula del reactivo DPD en la segunda muestra y mezclar;
- e) poner la cubeta con la muestra en el compartimiento del lado derecho del equipo;
- f) hacer la lectura de la concentración de cloro antes de 1 minuto.

Nota: Cuando se haga la lectura, posicionar el comparador (equipo) contra una fuente de luz como, por ejemplo, una ventana, o cielo o una lámpara. Gire el disco hasta obtener un mismo tono en los dos tubos.

Resultado

El resultado se expresa en mg/l de Cloro Residual Libre.

Observación: Existen, en el mercado, diferentes tipos de comparadores colorimétricos para medir el cloro residual, tanto con el uso de ortotolidina como el DPD. En caso de duda, consultar siempre las instrucciones del fabricante. Se está evitando el uso de la ortotolidina por tratarse de sustancia cancerígena y no ser más recomendado por el *Standard Methods*.

Color

El color del agua proviene de la materia orgánica como, por ejemplo, sustancias húmicas, taninos y también por metales como hierro y manganeso y residuos industriales fuertemente coloridos. El color, en sistemas públicos de abastecimiento de agua, es estéticamente indeseable. Su medida es de fundamental importancia, ya que agua de color elevado provoca su rechazo por parte del consumidor y lleva a buscar otras fuentes de suministro muchas veces inseguras.

La Portaria MS nº 2.914/2011 establece para color aparente el Valor Máximo Permitido de 15 (quince) uH como patrón organoléptico para consumo humano.

Método de determinación

Método de Comparación visual

Material necesario:

- a) tubos de Nessler forma alta de 50 ml;
- b) soporte de madera;
- c) solución estándar de Cloroplatinato de Potasio (500 Unidades de Color);

Técnica

- a) preparar estándares de color en la franja de 5 a 50 unidades de color, con medidas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0 y 7,0 ml de la solución estándar (500 unidades de color) y poner en tubos de Nessler de 50 ml;
- b) diluir con agua destilada hasta la marca de 50 ml;
- c) medir 50 ml de muestra en otro tubo de Nessler y comparar con los estándares.

Resultado

Se expresa el resultado en unidades de color o unidad Hazen (uH).

- Notas:**
1. Se debe hacer la comparación mirando a los tubos verticalmente contra un fondo blanco;
 2. Proteger los estándares contra la evaporación y polvo;

3. Cuando el color de la muestra sea mayor que 70 unidades, hacer dilución hasta obtener resultado dentro de la franja cubierta por los estándares. En este caso, el resultado debe ser multiplicador por el factor de dilución;
4. uH es la unidad de escala de Hazen (platina-cobalto, mgPt-Co/l).

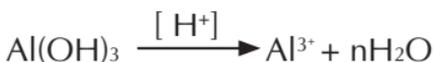
Aluminio

La prueba de aluminio es indicada para estaciones de tratamiento donde se usa el sulfato de aluminio como coagulante.

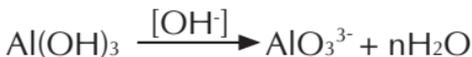
La dosificación incorrecta de ese coagulante es revelada por la cantidad significativa de aluminio que persiste en el agua tratada.

El hidróxido de aluminio – $\text{Al}(\text{OH})_3$ – que se forma en la reacción es anfótero. Su ionización se procesa en pH ácido o básico, segundo las ecuaciones:

En pH ácido:



En pH básico:



En las dos formas él puede hacerse soluble y atravesar los decantadores y filtros. La solubilidad transcurre de la corrección del pH.

Cuando el pH óptimo de floculación no está correcto, la concentración de aluminio del agua tratada aumenta.

La Portaria nº 2.914/2011 del Ministerio de Salud establece que el patrón organoléptico para consumo humano es de 0,2 mg/l.

Método de determinación

Se puede hacer la determinación del aluminio por medio de los métodos de Absorción Atómica, Eriocromo Cianina – R utilizándose un fotómetro de filtro o espectrofotómetro y también por el método de Comparación Visual, utilizándose tubos de Nessler.

En este manual, se describe el método de Comparación Visual, considerándose que la mayoría de los laboratorios de los servicios de suministro de agua no siempre poseen equipos como Espectrofotómetro de Absorción Atómica u otro.

Método de Comparación Visual

Material necesario

- a) tubo de Nessler forma alta de 50 ml;
- b) pipeta graduada de 1 ml.
- c) pipeta graduada de 5 ml;
- d) pipeta graduada de 10 ml;
- e) soporte para tubos de Nessler.

Reactivos

- a) ácido sulfúrico 0,02N;
- b) reactivo tampón de acetato de sodio;
- c) eriocromo cianina-R – (colorante);
- d) solución de trabajo del colorante.

Técnica

- a) medir 25 ml de muestra o una porción diluida para 25 ml en un frasco *Erlenmeyer* de 125 ml;
- b) adicionar 3 gotas de metil-orange y titular con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,02N hasta breve coloración rosa pálido;
- c) tomar nota del volumen gasto de ácido y descartar la muestra;
- d) medir otra vez 25 ml de la muestra o una alícuota diluida a 25 ml y transferirla para un tubo de Nessler de 50 ml;
- e) adicionar a la muestra el mismo volumen de ácido sulfúrico gasto en el paso 2, acrecido por 1 ml en exceso;
- f) adicionar 1,0 ml de ácido ascórbico y mezclar;
- g) adicionar 10,0 ml del reactivo tampón y mezclar;
- h) adicionar 5,0 ml de la solución de trabajo del colorante y mezclar;
- i) inmediatamente, diluir hasta la marca de 50 ml, con agua destilada;
- j) mezclar y dejar en reposo por 5 a 10 minutos y comparar el color desarrollado por la muestra con los estándares preparados de la misma manera y al mismo tiempo.

Resultado

El resultado se expresa en mg/l de aluminio.

Observación: En este método no se necesita preparar el blanco de la muestra. Él también no es recomendado para muestra que contiene color y turbidez porque puede llevar a errores considerables.

Preparación de los Estándares

Material necesario

- a) tubo de Nessler forma alta de 50 ml;
- b) pipeta graduada de 1 ml.
- c) pipeta graduada de 5 ml;
- d) pipeta graduada de 10 ml;
- e) soporte para tubos de Nessler.

Reactivos:

- a) ácido sulfúrico 0,02N;
- b) reactivo tampón de acetato de sodio;
- c) eriocromo cianina-R – (colorante);
- d) solución de trabajo del colorante;
- e) solución estándar de aluminio (1 ml = 5 µg Al).

Técnica

Preparar los patrones en el margen de 0 a 0,5 mg/l, pipeteando:

0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 y 2,5 ml de la solución estándar (1 ml = 5 µg) y diluyendo para 25 ml con agua destilada en tubos de Nessler (ver cuadro a seguir).

Tratar esos patrones del siguiente modo:

- a) adicionar 1,0 ml de ácido sulfúrico 0,02N y mezclar;
- b) adicionar 1,0 ml de ácido ascórbico y mezclar;
- c) adicionar 10,0 ml del reactivo tampón y mezclar;
- d) adicionar 5,0 ml de la solución de trabajo del colorante y mezclar;

- e) juntar el volumen con 50 ml de agua destilada y mezclar;
- f) dejar reposar por 5 a 10 minutos.

ml de la solución estándar	$\mu\text{g Al/mL}$	Volumen de muestra	mg/L Al
0,0	0,0	25	0,0
0,5	2,5	25	0,1
1,0	5,0	25	0,2
1,5	7,5	25	0,3
2,0	10,0	25	0,4
2,5	12,5	25	0,5

- Notas:** 1. Para el estándar 0,0 mg/l, tomar 25 ml de agua destilada y proceder igual a los demás;
2. Preparar los estándares toda vez que vaya a examinar la muestra;
3. Caso el laboratorio disponga de espectrofotómetro, hacer la lectura de dos estándares a 535 nm y trazar la curva de calibración en papel semilogarítmico (% de transmitancia X concentración). En ese caso, no es necesaria la preparación de todos los estándares cuando probar la muestra. Hacer tan solo uno o dos para checar la curva de calibración del equipo.

Turbidez

La turbidez del agua se debe a la presencia de materiales sólidos en suspensión, que reducen su transparencia. Puede ser provocada también por la presencia de algas, plancton, materia orgánica y muchas otras sustancias como el cinc, hierro, manganeso y arena, resultantes del proceso natural de erosión o de desechos domésticos e industriales.

La turbidez tiene su importancia en el proceso de tratamiento del agua. Agua con turbidez elevada y dependiendo de su naturaleza, forma flocos pesados que decantan más rápidamente que el agua con baja turbidez. También hay desventajas, como en el caso de la desinfección que puede ser dificultada por la protección que puede dar a los microor-

ganismos en el contacto directo con los desinfectantes. Es un indicador sanitario y patrón organoléptico del agua de consumo humano.

En Brasil, la recientemente revisada norma de potabilidad del agua, Portaria MS nº 2.914/2011, incorpora las preocupaciones internacionales relacionadas a la transmisión de protozoarios vía suministro de agua. El patrón de turbidez del agua resultante de rápido filtraje (tratamiento completo o filtraje directo) ha sido reducido para 0,5 uT y para agua resultado de lento filtraje reducido para 1,0 uT. Sin embargo, la atención al valor máximo permitido de 0,5 y 1,0 uT deberá ser cumplida en metas progresivas a lo largo de cuatro años: en 25% de las muestras analizadas mensualmente en el primer año, hasta en 95% en el cuarto año (siempre con VMP de 1 uT en las muestras mensuales remanentes).

La Portaria nº 2.914/2011 del Ministerio de Salud establece aún el Valor Máximo Permitido de 1,0 uT para agua subterránea post-filtraje o pre-desinfección. Y en cualquier punto de la red de distribución, 5,0 uT como patrón organoléptico de potabilidad.

Hay equipos específicos para determinación de la turbidez en el agua. En este manual, se presenta la técnica de determinación de la turbidez utilizando la metodología nefelométrica.

Método Nefelométrico

Material necesario:

- a) turbidímetro con nefelómetro;
- b) células de muestras de vidrio incoloro (cuarzo),
- c) balón volumétrico de 100 ml;
- d) pipeta volumétrica de 5 ml;

- e) conjunto de filtraje
- f) filtros de membrana de 0,2 μm .

Reactivos:

Agua libre de turbidez:

- a) pasar agua destilada a través de un filtro de membrana de 0,02 μm de porosidad. Enjuagar el frasco de recolección al menos dos veces con agua filtrada y desechar los primeros 200 ml;

Suspensión stock de turbidez – patrón primario.

Solución I

- Disolver 1,0 g de sulfato de hidrazina (NH_2). H_2SO_4 en agua destilada y diluir a 100 ml en balón volumétrico;

Advertencia: sulfato de hidrazina es carcinogénico. Evitar inhalación, ingesta y contacto con la piel.

Solución II

- disolver 10,0g de hexametenotetramina (CH_2) $_6\text{N}_4$ en agua destilada e diluir a 100 ml en balón volumétrico;
- mezclar 5,0 ml de la solución I y 5,0 ml de la solución II. Dejar descansar por 24 horas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. La turbidez de esta suspensión es de 4000 UT.
- transferir la solución stock para un frasco de color ámbar u otro frasco protegido de la luz ultravioleta, para almacenaje. Diluir esta suspensión stock. La suspensión stock es estable por un año cuando correctamente almacenada;

Suspensión estándar de turbidez:

- a) diluir 1,0 ml de la solución stock para 100 ml con agua libre de turbidez. La turbidez de esta suspensión es de 40 UT. Preparar diariamente.

Estándares de turbidez diluidos:

- a) diluir porciones de la suspensión estándar de turbidez con agua libre de turbidez de acuerdo al margen de interés. Preparar diariamente.

Procedimiento:

- a) calibrar el turbidímetro de acuerdo a las instrucciones del fabricante;
- b) medida de turbidez inferior a 40 uT: agitar la muestra suavemente y esperar hasta que las burbujas de aire desaparezcan y ponerla en la célula de muestra del turbidímetro; hacer la lectura de la turbidez directamente en la escala del instrumento o en la curva de calibración apropiada.
- c) medida de turbidez sobre 40 uT: diluir la muestra con uno o más volúmenes de agua libre de turbidez hasta que la turbidez de la muestra diluida esté entre 30 y 40 UT. Hacer la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

Cálculo:

$$uT = \frac{A \times (B + C)}{C}$$

Dónde:

UT = UTN = Unidad de Turbidez Nefelométrica;

A = Turbidez de la muestra diluida;

B = Volumen de la dilución (ml);

C = Volumen de la muestra tomado para la dilución.

Ejemplo: Una porción de 10 ml de la muestra ha sido diluida para 50 ml con agua libre de turbidez. Hecha la lectura de esa muestra diluida se obtuvo 20

$$UT = \frac{20 \times (40 + 10)}{10} \therefore UT = 100$$

Temperatura

La temperatura tiene que ver con el aumento del consumo de agua, con la fluoruración, con la solubilidad e ionización de las sustancias coagulantes, con el cambio del pH, con la desinfección, etc.

Procedimiento para determinación en el agua

Material necesario:

- a) termómetro;
- b) becker de 250 ml.

Técnica

- a) recolectar un poco de agua en un becker de 250 ml;
- b) sumergir el termómetro en el agua;
- c) esperar hasta que el material dilatante (mercurio) se estabilice;
- d) hacer la lectura con el bulbo del termómetro aun dentro del agua.

Fluoruros

La aplicación de flúor en el agua para consumo humano tiene por finalidad prevenir la caries dental. Hoy, ese procedimiento es considerado un proceso normal de tratamiento de agua y la concentración óptima de flúor es parte esencial de su calidad. En razón de estos y otros factores es que se hace necesario su control en la estación de tratamiento de agua (ETA).

Hay varios métodos para determinación de flúor en el agua. Los tres más conocidos son: el método *Spadns*, el *Scott-Sanchis* y el método del electrodo específico para iones fluoruros.

En este manual se describe únicamente el método *Scott-Sanchis* que, aunque no sea el de mayor grado de exactitud, atiende a las expectativas y es el más económico. Es un método de comparación visual de color hecho en tubos de Nessler.

Procedimientos para análisis de fluoruros

Método *Scott-Sanchis*

Material necesario

- a) tubo de Nessler de 100 ml;
- b) soporte para tubo de Nessler;
- c) termómetro;
- d) pipeta volumétrica de 5 ml;
- e) pipeta graduada de 10 ml.

Reactivos:

- a) solución estándar de fluoruros (1 ml = 10 µgF);

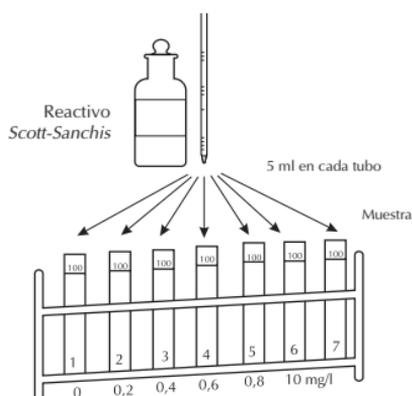
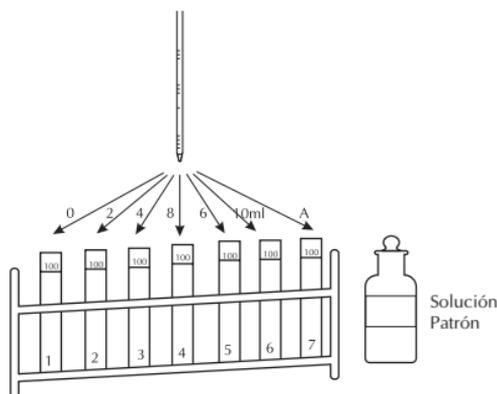
- b) reactivo *Scott-Sanchis*;
- c) arsenito de sodio (0,5%).

Preparación de los estándares y de la muestra:

- a) tomar 7 tubos de Nessler de 100 ml;
- b) llenar el 1er. tubo con agua destilada (blanco);
- c) pipetear en el 2º tubo 2 ml de la solución estándar,
- d) pipetear en el 3er. tubo 4 ml de la solución estándar,
- e) pipetear en el 4º tubo 6 ml de la solución estándar,
- f) pipetear en el 5º tubo 8 ml de la solución estándar,
- g) pipetear en el 6º tubo 10 ml de la solución estándar,
- h) llenar el 7º tubo con 100 ml de muestra o una alícuota diluida a 100 ml. Caso haya cloro en la muestra, removerlo por la adición de 0,1 ml (2 gotas) de la solución de arsenito de sodio para cada mg/l de cloro;
- i) diluir los estándares de 2 a 6 a 100 ml con agua destilada;
- j) ajustar la temperatura de los estándares y de la muestra;
- k) adicionar a cada tubo, incluso en el blanco (1o tubo) 5 ml del reactivo *Scott-Sanchis*;
- l) mezclar y dejar en reposo por una hora;
- m) transcurrido una hora de la adición del reactivo *Scott-Sanchis*, comparar la muestra con los patrones y expresar el resultado en mg F/l.

Ejemplo: Si la coloración desarrollada por la muestra es semejante al patrón del tubo nº 5, esa muestra tendrá 0,8 mg/l de ion fluoruro. Caso la muestra desarrolla una coloración que esté entre dos patrones se puede hacer la interpolación de los resultados. Ej.: lectura entre 0,6 e 0,8 expresar como 0,7 mg/l.

Diagrama de flujo de la prueba



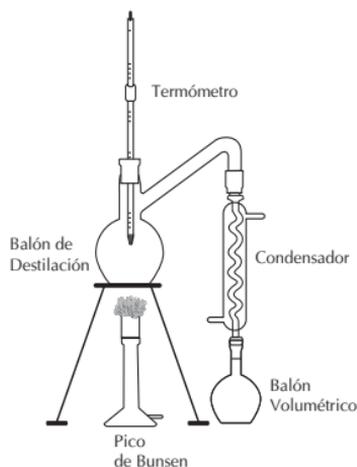
- Notas:**
1. La concentración de los patrones preparados (tubos de 2 a 6) corresponden a 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,0 mg/l de ion fluoruro, respectivamente;
 2. Podrán ser analizadas diferentes muestras en simultáneo con los patrones;
 3. Caso haya intervinientes en las muestras en concentraciones que puedan alterar los resultados, dichas muestras deberán ser destiladas;

Tabla de intervinientes

Sustancias intervinientes	Método Scott-Sanchis	Tipo de error
Alcalinidad (CaCO_3)	400 mg/L	-
Aluminio (Al^{3+})	0,25 mg/L	--
Cloreto (Cl^-)	2000 mg/L	-
Hierro (Fe^{3+})	2,0 mg/L	+
Hexametáfosfato ($\text{NaPO}_3)_6$	1,0 mg/L	+
Fosfato (PO_4^{-3})	5,0 mg/L	+
Sulfato (SO_4^{-2})	300 mg/L	+

Fuente: Adaptado de Mayer, 1971

Equipos para destilación:



Hacer primero una destilación preliminar para remover cualquier contaminación de fluoruro y ajustar la reacción ácido/agua para las destilaciones subsecuentes, de la siguiente manera:

- a) poner 400 ml de agua destilada en el balón de destilación;
- b) adicionar lentamente y con agitación 200 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4);
- c) adicionar algunas perlas de vidrio;
- d) conectar el balón al condensador y comenzar la destilación;
- e) cuando la temperatura alcanzar 180°C , parar la destilación y eliminar el destilado. El conjunto está listo para la destilación de la muestra.

Destilación de la muestra

Adicionar a la mezcla de ácido que haya quedado de la destilación preliminar 300 ml de muestra, mezclar cuidadosamente y destilar como anteriormente, hasta que la temperatura alcance 180°C . En ese momento el destilado será igual a 300 ml.

- Notas:**
1. No dejar que la temperatura ultrapase 180°C . Así se evita que haya arrastre de sulfato para el destilado.
 2. Cuando se analicen muestras de alto contenido de cloruros, adicionar al balón de destilación 5 mg de sulfato de plata para cada mg de cloruro presente en la muestra.
 3. Usar la solución de ácido sulfúrico varias veces hasta que los contaminantes de las muestras de agua acumulados en el frasco de destilación comiencen a interferir en el destilado. Cuando pase eso, lo mejor es desechar el ácido y comenzar todo otra vez.

Importante: La dosificación de flúor en el agua para consumo humano es establecida en función de la media de las temperaturas máximas diarias de la localidad observadas durante un determinado período.

Recolectas y preservación de muestras para análisis fisicoquímicos

Parámetros	Recipientes	Volumen mínimo (mL)	Preservación	Tiempo máximo
Alcalinidad	Vidrio o polietileno	200	Refrigerar	24h/14d
CO ₂	"	100	Análisis inmediato	-
Dureza	"	100	HNO ₃ pH < 2	6 meses
Cloruros	"	100	No requiere	7 días
Aluminio	"	-	HNO ₃ pH < 2	6 meses
Fluoruros	Polietileno	300	No requiere	28 días
Temperatura	-	-	Análisis inmediato	-
Turbidez	Vidrio o polietileno	200	Proteger de la luz	24h
Cloro Residual	Vidrio o polietileno	500	Análisis inmediato	30min/2h
pH	"	200	Análisis inmediato	-
Color	"	500	Refrigerar	24h

Fuente: Adaptado de APHA, 1985

Notas: 1. Los volúmenes aquí descritos son estimados. En la práctica, se debe recolectar el volumen necesario para llevarse a cabo el análisis, aun porque existen repeticiones de análisis muchas veces necesarias.

2. Cuando preservar con ácido nítrico, utilizar 2 ml del ácido para cada litro de la muestra.

3. Normalmente, en las Estaciones de Tratamiento de Agua – ETAs, los análisis deben ser realizados inmediatamente luego de la recolección. No es buena práctica dejar las muestras mucho tiempo sin que sean analizadas.

Ensayo de coagulación (*Jar-test*)

El ensayo de coagulación es un procedimiento de rutina en estaciones de tratamiento de agua para determinar la dosificación de los productos químicos utilizados en el tratamiento.

Podemos decir que es una simulación de lo que ocurre en la ETA.

Para realizarse este ensayo, es necesario conocer previamente las siguientes características del agua bruta: color, turbidez, alcalinidad, pH y temperatura; además de parámetros hidráulicos de la estación de tratamiento, como: vaciamiento, tiempo de detención en el floculador, velocidad de sedimentación en el decantador, etc.

El ensayo de coagulación no es una operación muy sencilla, pues se debe considerar algunas variables del proceso, como el color y turbidez del agua bruta; si la alcalinidad natural del agua es suficiente, si el pH está dentro del margen óptimo de floculación, el tipo de coagulante empleado, etc.

En este ejemplo práctico, son considerados tan solo los parámetros: color, turbidez, pH y alcalinidad total, ya que el objetivo principal del test es la remoción del color y turbidez del agua, aplicándose una menor cantidad de coagulante.

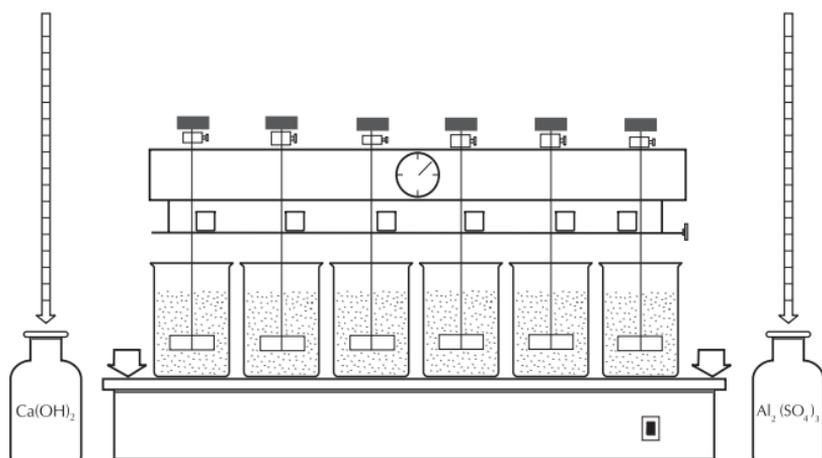
El producto químico utilizado es el sulfato de aluminio, que es el más común.

Etapas de la prueba de coagulación que deben ser observadas

- hacer análisis de la muestra bruta – color, pH, turbidez y alcalinidad total, temperatura;
- identificar el pH óptimo de floculación;
- verificar la dosificación más baja del coagulante en el pH óptimo;
- observar la velocidad de sedimentación de los flecos;
- analizar el sobrenadante, verificando principalmente la remoción de color y turbidez.

Material necesario:

- equipo de *Jar-test* conforme al de la figura;
- becker forma baja de 1000 ml;
- solución de sulfato de aluminio a 1%;
- solución de cal a 0,5%;
- pipetas graduadas de 5 y 10 ml.



Fuente: Adaptado de Cetesb, 1973

Procedimiento 1 (Considerando que el agua bruta tenga alcalinidad natural suficiente y tenga también un pH óptimo de floculación).

- a) poner 6 beakers de 1 litro en la plataforma del equipo de *Jar-Test*;
- b) llenarlos con agua bruta hasta el indicador de 1000 ml;
- c) conectar el equipo en la velocidad máxima 100 r.p.m;
- d) adicionar simultáneamente en los beakers la cantidad de coagulante (sulfato de aluminio) que haya sido calculada para cada becker;
- e) dejar agitar en esa velocidad por 2 a 3 minutos (tiempo de detención en la cámara de mezcla rápida);
- f) reducir la velocidad de agitación para 50 r.p.m por 10 a 30 minutos (tiempo de detención en los floculadores);
- g) dejar las muestras decantar por algún tiempo (ese tiempo sería el correspondiente a la velocidad de sedimentación en el decantador – 10 a 30 minutos);
- h) recolectar el sobrenadante de todos los beakers y analizar los parámetros necesarios para verificar cuál de ellos presentó mejor resultado;
- i) normalmente el mejor resultado es el que haya presentado mayor reducción de color y turbidez y se debe elegir esa dosificación.

Procedimiento 2 (Cuando el agua no tiene alcalinidad natural suficiente y el pH óptimo de floculación es desconocido).

- a) poner 6 beakers de 1 litro en la plataforma del equipo de *Jar-Test*;
- b) llenarlos con agua bruta hasta el indicador de 1000 ml;
- c) conectar el equipo en la velocidad máxima 100 r.p.m;

- d) establecer diferentes pH en los beakers utilizándose álcali (cal hidratada);
- e) aplicar una cantidad fija de sulfato de aluminio en todos los beakers y proceder de acuerdo a los pasos e) a i) del procedimiento 1;
- f) medir el pH del frasco que haya presentado mejor resultado;
- g) llevar a cabo nuevo ensayo, fijando en todos los beakers el pH óptimo encontrado en el ítem anterior;
- h) adicionar sulfato de aluminio en cada becker, variando la concentración en valores cercanos (menor y mayor) de la dosificación utilizada en la letra e);
- i) proceder de acuerdo a los pasos de e) a i) del procedimiento 1.

Notas: 1. Dependiendo de las alteraciones que el agua bruta pueda sufrir, consecuencias de inundaciones, sequías, alteraciones climáticas, etc., se recomienda siempre hacer nuevas pruebas para ajustar las dosificaciones de los coagulantes.

2. Cuando el agua bruta no tenga alcalinidad natural suficiente para reaccionar con el sulfato de aluminio, usar cal hidratada u otro álcali para promover una alcalinidad artificial.

3. Cuando el agua bruta no tenga un pH óptimo de floculación, crear esa condición, utilizándose ácidos o bases (álcalis).

4. El álcali más utilizado es la cal hidratada.

5. Normalmente se utiliza sulfato de aluminio a 1% y cal a 0,5% para los ensayos, ya que facilita la medición de volúmenes utilizados en el proceso.

6. Para dosificaciones de sulfato de aluminio de 10 – 15 – 20 – 25 – 30 y 35 mg/l de una solución a 1% se necesitan los siguientes volúmenes: 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml, 3,0 ml e 3,5 ml, respectivamente. Para dosificación de cal, utilizase la mitad de dichos volúmenes en ml.

7. Las velocidades de agitación, los tiempos de agitación y el tiempo de decantación dependen de las dimensiones de las unidades de tratamiento y del vaciamiento de operación.

8. Consultar la tabla que sigue para establecer la cantidad de cal necesaria en función del consumo de sulfato de aluminio.

Consumo de Sulfato de Aluminio mg/l $Al_2(SO_4)_3$	Alcalinidad teóricamente necesaria mg/L ($CaCO_3$)	Alcalinidad natural deseada ($CaCO_3$)	Cantidad teórica de cal mg/L *	Cantidad de cal deseable mg/L *
10	5	7	3	4
15	7	10	4	6
20	9	14	5	8
25	12	17	7	10
30	14	20	8	12
40	18	27	10	15
50	25	34	13	19

Fuente: Técnicas de Suministro y Tratamiento de Agua – vol. II/Cetesb – SP

* caso no haya alcalinidad natural.

Teóricamente, cada mg/l de sulfato de aluminio requiere:

0,45 mg/l de alcalinidad natural;

0,25 mg/l de cal (CaO);

0,33 mg/l de cal como $Ca(OH)_2$;

0,48 mg/l de carbonato de sodio – Na_2CO_3 (barrilla).

Corrección del pH del agua tratada

La corrección del pH del agua tratada es un procedimiento utilizado en las ETAs con el fin de prevenir el proceso de corrosión de las estructuras metálicas del sistema de distribución que es generado por la acidez del agua, consecuencia de la presencia de gas carbónico disuelto.

En las aguas superficiales hay gas carbónico disuelto. Ese gas carbónico puede venir de la atmósfera, de la respiración de los seres acuáticos y aún de la reacción del sulfato de aluminio cuando reacciona con la alcalinidad natural del agua.

La corrección del pH significa elevar el pH del agua tratada hasta el pH de saturación, que es el punto en el que el proceso de corrosión ya no tiene lugar. Ese pH no es igual para todas las aguas y su determinación puede darse en el laboratorio.

Método de determinación

Ensayo del mármol

Material necesario:

- a) balón volumétrico de 1000 ml;
- b) medidor de pH;
- c) balanza;

Reactivo

Carbonato de calcio

Técnica

- a) poner 750 ml de agua filtrada en un balón volumétrico de 1.000 ml;
- b) determinar el pH y la alcalinidad (l) del agua;
- c) adicionar 10 gramos de carbonato de calcio al balón;
- d) agitar por 1/2 hora y dejar decantar y filtrar.
- e) determinar el pH;

- f) agitar otra vez el balón por 1/2 hora más;
- g) dejar decantar y filtrar;
- h) determinar de nuevo el pH.

Repetir los procedimientos "e", "f" y "g" hasta pH constante. El pH de saturación será el pH constante encontrado. Determinar en la última operación la alcalinidad (II).

Conclusión

Si la alcalinidad II > alcalinidad I => agua corrosiva.

Si la alcalinidad II = alcalinidad I => agua corrosiva.

Si la alcalinidad II < alcalinidad I => agua incrustante.

Determinación de la concentración de cloro activo en una solución de cloro (hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio)

Material necesario:

- a) frasco *Erlenmeyer* de 250 o 500 ml;
- b) bureta de 50 ml;
- c) pipeta volumétrica de 1, 5 y 10 ml;
- d) balanza de precisión

Reactivos:

- a) tiosulfato de sodio 0,1 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- b) iodeto de potasio (KI)
- c) ácido acético P.A;
- d) indicador de amida.

Técnica

- a) medir 1,0 ml de la solución;
- b) disolver en 50 ml de agua destilada;
- c) adicionar 5,0 ml de ácido acético concentrado (glacial);
- d) adicionar 1,0 g de ioduro de potasio;
- e) titular con la solución de bisulfato de sodio 0,1 N;
- f) tomar nota de los ml de tiosulfato utilizados.

Cálculo

$$\% \text{ de cloro} = \frac{(A-B) \times N \times 35,45}{P \times 10}$$

dónde:

A = ml de bisulfato gasto en la titulación de la muestra;

B = ml de bisulfato gasto en el blanco;

N = Normalidad del bisulfato;

P = Peso o volumen del producto.

Observación: Dependiendo de la concentración de la solución a ser analizada, usar un peso o volumen que no gaste más que la capacidad de la bureta utilizada, de bisulfato de sodio 0,1 N. Hacer un blanco con agua destilada.



**Preparación de los Reactivos
Utilizados en Análisis
Constantes en este Manual**



Reactivos para alcalinidad

Solución de ácido sulfúrico 0,02 N

Para preparar esta solución se necesita primeramente una solución 0,1 N de la siguiente manera:

- a) transferir lentamente, con pipeta, 2,8 ml de ácido sulfúrico concentrado (96% $d=1,84$) para un balón volumétrico de 1000 ml con cerca de 500 ml de agua destilada;
- b) completar el volumen con agua destilada hasta la marca y agitar;
- b) de esta solución, medir 200 ml con pipeta volumétrica y transferir para un balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con agua destilada. Esta solución es alrededor de 0,02 N.

Solución de carbonato de sodio 0,02 N

Para preparar la solución de carbonato de sodio 0,02 N, secar 1,5 a 2,0 gramos de Na_2CO_3 grado estándar primario, a 250°C por cuatro horas. Enfriar en desecador. Enseguida, pesar 1,060 gramos y disolver en 250 ml de agua destilada y completar el volumen para 1000 ml con agua destilada en balón volumétrico.

Estandarización de la solución

Poner 50 ml de una solución de carbonato de sodio 0,02 N en un frasco *Erlenmeyer* de 250 ml y adicionar 4 gotas del indicador metil-orange. Titular con H_2SO_4 0,02N hasta el viraje del indicador para leve coloración rojizo. Tomar nota del volumen de ácido gasto.

Para calcular la normalidad correcta, use la fórmula a seguir:

$$N = \frac{N' \times V'}{V}$$

donde:

N = normalidad del H₂SO₄ deseada;

V = volumen del ácido gasto en la titulación;

N' = normalidad del carbonato de sodio;

V' = volumen del carbonato de sodio que se usó.

1 ml de H₂SO₄ 0,02 N = 1,0 mg de CaCO₃

Solución de bisulfato de sodio 0,1 N

Pesar exactamente 25,0 gramos de Na₂S₂O₃.5H₂O y disolver en un poco de agua destilada y completar el volumen para 1000 ml en balón volumétrico.

Indicador metil-orange

Pesar 0,100 gramos de metil-orange y disolver en 200 ml agua destilada.

Fenolftaleína

- disolver 1 gramo de fenolftaleína en un poco de agua destilada y diluir a 200 ml.
- adicionar gotas de NaOH 0,02 N hasta la aparición de leve coloración rosa.

Mezcla indicadora de verde de bromocresol/rojo de metila

Pesar 20 mg de rojo de metila y 100 mg de verde de bromocresol y disolver en 100 ml de agua destilada o alcohol etílico a 95%.

Reactivos para CO₂

Hidróxido de sodio 0,02 N

- a) para preparar esta solución se necesita primeramente una solución 0,1 N de la siguiente manera:
- b) pesar rápidamente 4,2 gramos de hidróxido de sodio en lentejas y transferir para un becker de 500 ml y disolver en agua destilada libre de gas carbónico;
- c) transferir esta solución para un balón volumétrico de 1 litro y completar el volumen hasta la marca. Esta solución es alrededor de 0,1 Normal.

Estandarizar con una solución de Ácido Sulfúrico 0,1 Normal de la siguiente manera:

- a) tomar 100 ml de agua destilada en un frasco *Erlenmeyer* de 250 ml;
- b) medir, con pipeta volumétrica o bureta 10 ml de la solución de NaOH 0,1 Normal y transferir para el *Erlenmeyer* anteriormente citado;
- c) juntar 3 a 4 gotas del Indicador de metil-orange;
- d) titular con la solución de ácido sulfúrico 0,1 Normal;
- e) tomar nota de los ml de H₂SO₄ gastos que deben ser 10 o alrededor de 10.

Si el volumen de H_2SO_4 0,1 N gasto en la titulación es mayor o menor que 10 ml, calcular el Factor de corrección (Fc) de la solución de NaOH utilizándose la fórmula a seguir:

$$F_c (\text{NaOH}) = \frac{\text{ml } \text{H}_2\text{SO}_4 \times F_c (\text{H}_2\text{SO}_4)}{\text{mL de NaOH}}$$

Tomar nota del Fc en el rótulo del frasco.

Preparación de la solución de hidróxido de sodio N/50:

- transferir 200 ml de la solución stock de NaOH 0,1 N para un balón volumétrico de 1 litro y completar con agua destilada. Esta nueva solución es alrededor de N/50 (0,02 N).

Estandarización de la solución NaOH 0,02 N:

- tomar 100 ml de agua destilada en un frasco *Erlenmeyer* de 250 ml;
- medir, con pipeta volumétrica o bureta 10 ml de la solución de NaOH 0,02 N y transferir para el *Erlenmeyer* anteriormente citado;
- juntar 3 a 4 gotas del Indicador de metil-orange;
- titular con la solución de ácido sulfúrico 0,02 N hasta el viraje del indicador;
- tomar nota del volumen e H_2SO_4 gastos que deben ser alrededor de 10 ml.

Cálculo del factor de corrección del NaOH

$$F_c (\text{NaOH}) 0,02\text{N} = \frac{\text{mL de } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ de } 0,02 \text{ N} \times F_c (\text{H}_2\text{SO}_4)}{\text{mL de NaOH}}$$

- Notas:** 1. No es muy fácil visualizar el viraje del indicador. Hacer un blanco con 100 ml de agua destilada para la comparación de color en el momento del viraje del indicador;
2. Al adicionar el indicador, la solución queda amarillosa y, al final de la titulación, la solución queda levemente rojiza;
3. Se puede obtener agua libre de CO₂ por la ebullición del agua destilada durante 15 minutos y resfriada rápidamente hasta la temperatura ambiente.

Fenolftaleína

- a) disolver 1 gramo de fenolftaleína en un poco de agua destilada y diluir a 200 ml.
- b) adicionar gotas de NaOH 0,02N hasta la aparición de leve coloración rosa.

Reactivos para análisis de cloruros

- a) pesar 2,395 gramos de AgNO₃ y disolver en un poco de agua destilada. Completar para 1 litro el balón volumétrico;
- b) estandarizar contra una solución de cloruro de sodio 0,0141N; 1,00 ml = 500 µg Cl⁻
- c) guardar la solución en frasco oscuro.

Cloreto de sodio 0,0141 N

- a) disolver 824,1 mg de cloreto de sodio seco a 140°C en agua libre de cloruros y diluir para 1000 ml. 1,00 ml = 500 µg Cl⁻.

Estandarización de la Solución de Nitrato de Plata 0,0141 N

- a) usar 100 ml de muestra (NaCl 0,0141 N) o una porción diluida a 100 ml;
- b) ajustar el pH entre 7 y 10 con NaOH o H₂SO₄ 1 N;
- c) adicionar 1 ml de K₂CrO₄ (cromato de potasio);
- d) titular con la solución de nitrato de plata 0,0141 N hasta la aparición del color amarillo rojizo;
- e) tomar nota del volumen de nitrato de plata gasto en la titulación;
- f) calcular el factor de corrección del AgNO₃ 0,0141 N usando la siguiente fórmula:

$$F_c = \frac{100}{V_p}$$

dónde:

F_c = factor de corrección.

V_p = Volumen de AgNO₃ gasto en la titulación.

Solución indicadora de cromato de potasio K₂CrO₄;

- a) pesar 50 gramos de K₂CrO₄ y disolver en un poco de agua destilada;
- b) adicionar solución de AgNO₃ 0,0141 N hasta formar un precipitado rojo;
- c) dejar en reposo por 12 horas;
- d) filtrar y completar el volumen para 1000 ml con agua destilada.

Hidróxido de sodio (NaOH) 1N

- a) pesar 40 gramos de hidróxido de sodio y disolver en un poco de agua destilada y diluir a 1 litro;
- b) guardar en frasco de polietileno o vidrio pyrex.

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N

- a) poner cerca de 500 ml en un becker de 1000 ml de agua destilada;
- b) enseguida medir 28 ml de ácido sulfúrico concentrado y adicionar lentamente en el becker anteriormente citado, con agitación constante;
- c) dejar enfriar;
- d) transferir para un balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con agua destilada, homogeneizándola a seguir;
- e) almacenar en frasco de polietileno o vidrio pyrex.

Notas: 1. Agitar con bastón de vidrio;
2. Nunca adicionar agua al ácido, sino ácido al agua.

Reactivos para análisis de dureza

Solución estándar de EDTA 0,01 M

- a) pesar 3,723 gramos de EDTA (sal de sodio del ácido etilenodiaminotetraacético); disolver en agua destilada y diluir a 1000 ml;
- b) estandarizar contra una solución estándar de carbonato de calcio;
- c) guardar esta solución en frasco de polietileno.

Solución estándar de calcio

- pesar 1,0 gramo de carbonato de calcio anhidro (CaCO_3) estándar primario y poner en un frasco *Erlenmeyer* de 250 ml;
- adicionar poco a poco, con auxilio de un embudo, HCl 1:1 hasta disolver todo el CaCO_3 ;
- adicionar 200 ml de agua destilada y hervir por algunos minutos para eliminar el CO_2 ;
- enfriar y adicionar algunas gotas de rojo de metila y ajustar para el color anaranjado intermediario por adición de NH_4OH 3N o HCl 1:1;
- transferir toda la mezcla para un balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con agua destilada (1 ml de esta solución = 1,0 mg de CaCO_3).

Estandarización de la solución EDTA 0,01 M

- medir 25 ml de la solución estándar de calcio y diluir para 50 ml con agua destilada en frasco *Erlenmeyer* de 125 ml;
- adicionar 1 a 2 ml de la solución tampón para obtener el pH alrededor de $10 \pm 0,1$;
- adicionar 0,05 gramos del indicador eriochrome black T;
- titular con EDTA 0,01 M gota a gota hasta desaparecer la última coloración violácea y aparecer el color azul indicador del punto final de la titulación.

Cálculo:

$$F_c = \frac{25}{V_p}$$

dónde:

Fc = factor de corrección;

Vp = Volumen de EDTA gasto en la titulación.

Solución tampón para dureza

- pesar 16,9 gramos de cloruro de amonio (NH_4Cl) y disolver en 143 ml de hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH);
- adicionar 1,25 gramos de sal de magnesio del EDTA e diluir a 250 ml con agua destilada.

Observación: Caso no disponga de sal de magnesio del EDTA, disolver 1,179 gramos del sal sódico del EDTA y 780 mg del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o 644 mg del $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua destilada y juntar a la solución del ítem 1, completando el volumen para 250 ml con agua destilada.

Indicador negro Eriocromo T

- pesar 0,5 gramos de negro eriocromo T en un vidrio de reloj;
- pesar 100 gramos de cloruro de sodio P.A. en un Becker;
- transferir los dos reactivos para un almirez y triturar la mezcla hasta transformarse en polvo;
- almacenar en frasco de boca ancha, bien cerrado. Inhibidor I – cianeto de sodio P.A.

Usar 250 mg en la solución a ser titulada.

Inibidor II – sulfeto de sodio.

- pesar 5 gramos de sulfeto de sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) o 3,7 gramos de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- disolver en 100 ml de agua destilada;

- c) guardar en frasco de vidrio bien cerrado a fin de evitar su deterioro por contacto con el aire.

Solución estándar de color

- a) pesar 1,246 gramos de cloroplatinato de potasio (K_2PtCl_6) y 1,0 gramo de cloruro cobaltoso cristalizado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$);
- b) disolver en agua destilada;
- c) adicionar 100 ml de ácido clorhídrico concentrado y diluir para 1000 ml con agua destilada. (Esta solución equivale a 500 Unidades de Color).

Reactivos para análisis de aluminio

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,02N

- a) preparar igual al utilizado para alcalinidad total.

Ácido ascórbico

- a) pesar 0,1g de ácido ascórbico y disolver en un poco de agua destilada y completar el volumen para 100 ml. Esta solución deberá ser preparada diariamente.

Reactivo tampón

- a) pesar 136 g de acetato de sodio ($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$) y disolver en agua destilada. Adicionar 40 ml de solución de ácido acético 1N y diluir para 1000 ml con agua destilada.

Solución de ácido acético 1N

- a) medir 58 ml de ácido acético concentrado y diluir para 1000 con agua destilada.

Solución de ericromocianina-R (stock)

- a) pesar y disolver 150 mg del colorante en cerca de 50 ml de agua destilada. Ajustar el pH para 2,9 con ácido acético 1:1 (se necesita alrededor de 2 ml de ácido). Diluir para 100 ml con agua destilada.

Solución de trabajo (ericromocianina-R)

- a) medir 10 ml de la solución stock y diluir para 100 ml con agua destilada. Esta solución es estable por 6 meses.

Solución indicadora de metil-orange.

- a) pesar 100 mg de metil-orange y disolver en 200 ml agua destilada.

Solución Stock de Aluminio (1ml = 500 μg Al)

- a) pesar 8,791 g de doble sulfato de aluminio e potasio ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) y disolver en un poco de agua destilada. Completar el volumen para 1000 ml en balón volumétrico.

Solución Estándar de Aluminio (1 ml = 5 μg)

- a) diluir 10 ml de la solución stock de aluminio para 1000 ml de agua destilada en balón volumétrico. Preparar diariamente.

Observación: 1) todos los reactivos deben ser preparados con agua destilada libre de aluminio.
2) todos los procedimientos que determinan diluir o completar para x ml, hacérselo en balón volumétrico.

Solución de EDTA 0,01M

- a) pesar y disolver 3,7 gramos de EDTA en 1000 ml de agua destilada.

Reactivos para análisis de fluoruros

Solución estándar de fluoruros

- a) preparar una solución de stock, disolviendo 221,0 mg de fluoruro de sodio anhidro (NaF) en agua destilada y diluir a 1000 ml (1 ml de esta solución equivale a 100 μgF);
- b) diluir 100 ml de la solución stock antes mencionada para 1000 ml con agua destilada (1 ml = 10 μgF).

Reactivo zirconio-alizarina

- a) pesar y disolver 300 mg de oxocloruro de zirconio ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), en 50 ml de agua destilada y transferir para un frasco volumétrico de 1000 ml con tapón;
- b) pesar y disolver 70 mg de monosulfato de alizarina en 50 ml de agua destilada;
- c) poner la solución 2 en la solución 1, lentamente y con agitación;
- d) la solución resultante deberá reposar por algunos minutos.

Mezcla ácida

- a) medir 101 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl) y diluir en alrededor de 400 ml con agua destilada;
- b) adicionar cuidadosamente 33,3 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) en alrededor de 400 ml de agua destilada;

- c) a seguir, enfriar y mezclar las dos soluciones ácidas.

Reactivos *Scott-Sanchis*

- a) adicionar la mezcla ácida a la solución reactiva *Zirconil-alizarina*;
- b) completar el volumen hasta 1000 ml con agua destilada y mezclar;
- c) guardar en frasco ámbar y en lugar protegido de la incidencia de luz directa. Este reactivo es estable por 6 meses.

Arsenito de sodio

- a) pesar 5 g de arsenito de sodio (NaAsO_3) y disolver en un poco de agua, diluir para 1 litro con agua destilada (usar 1 gota para cada 0,1mg de cloro existente en la muestra).

Observación: esta solución es tóxica – evitar la ingesta y el contacto con la piel.

Reactivos para análisis de la concentración de cloro activo:

Tiosulfato de sodio 0,1 N – Disolver 25 gramos de tiosulfato de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua destilada hervida recientemente. Almacenar por dos semanas y estandarizar con dicromato de potasio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,1 N.

- Notas:** 1. Usar agua destilada hervida en la preparación del bisulfato.
2. Adicionar algunos mililitros de cloroformo (± 5 ml) para minimizar la descomposición bacteriana de la solución de bisulfato.

Dicromato de potasio 0,1 N – Pesar 4,904 gramos de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), disolver en un poco de agua destilada y, enseguida, diluir para 1 litro. Almacenar en frasco de vidrio con tapa de vidrio.

Solución indicadora de amida – Pesar 5,0 gramos de amida. Adicionar un poco de agua destilada hasta formar una crema. Enseguida disolver esa crema en un litro de agua destilada en ebullición. Dejar en reposo durante una noche. Usar el líquido sobrenadante preservándolo por la adición de 1,25 gramos de ácido salicílico.

Estandarización de la solución de bisulfato de sodio 0,1N.

Material necesario:

- bureta de 50 ml;
- frasco *Erlenmeyer* de 250 ml;
- pipeta graduada de 1 ml.
- pipeta volumétrica de 10 ml.

Procedimiento:

- poner 80 ml de agua destilada en el *Erlenmeyer*;
- adicionar, con agitación constante, 1 ml de H_2SO_4 concentrado y 10 ml de dicromato de potasio 0,1 N;
- adicionar 1,0 gramo de Yoduro de potasio;
- dejar la mezcla reaccionar durante 6 minutos en lugar oscuro;
- titular con la solución de tiosulfato de sodio hasta la aparición de la coloración amarilla clara;

- f) adicione 1,0 ml de la solución de amida y siga la titulación hasta el desaparecimiento del color azul formado.

Cálculo

$$\text{Normalidad} = \frac{1}{\text{ml de tiosulfato consumido}}$$

Reglas generales para corregir las soluciones tituladas

La corrección de las soluciones tituladas es un procedimiento muy utilizado en laboratorio. Sirve para aferir el grado de exactitud de las soluciones estandarizadas. Periódicamente, el técnico debe verificar la exactitud de dichas soluciones para que los resultados de los análisis sean los más correctos posibles.

Regla 1

Cuando el volumen consumido de solución a titular sea igual al volumen de la solución estándar tomada para la titulación, significa que aquella está exacta. Ej.: 10 ml de HCl 0,1N han sido consumidos para titular 10 ml de Na₂CO₃ 0,1N.

Regla 2

Cuando el volumen consumido de la solución a titular sea menor que el volumen del patrón tomado, significa que la solución a titular se encuentra más concentrada. En ese caso, la corrección se hace de la siguiente manera: Ej.: Se gastó en la titulación de 10 ml de Na₂CO₃ 0,1N; 8,3 ml de HCl 0,1 N. Aplicándose la siguiente ecuación, tenemos: 8,3 : 10 :: x : 1000.

Efectuándose los cálculos se tiene:

$$10x = 8,3 \times 1000$$

$$x = 8300/10 \quad \therefore x = 830 \text{ ml}$$

Enseguida, se mide 830 ml de la solución a titular y se completa a 1000 ml con agua destilada. Hacer nueva titulación para verificar el rigor de la dosificación, que no debe quedar por debajo de 9,9 y por encima de 10,1 ml.

Regla 3

En el caso en que el volumen de la solución a titular sea mayor que el de la solución estándar, significa que la solución a titular se encuentra más diluida. En ese caso, calculase el factor de corrección de la siguiente manera:

Ejemplo: 10,5 ml de una solución de HCl 0,1N se ha consumido para titular 10 ml de una solución estándar de Carbonato de Sodio.

Aplicándose la siguiente ecuación, tenemos:

$$10,5 : 10 :: 1 : x$$

Efectuándose los cálculos se tiene:

$$10 = 10,5x \quad x = 10/10,5 \quad x = 0,9524$$

Luego, el Factor de corrección de la solución es 0,9524.

Limpieza de material de vidrio en el laboratorio

La precisión y exactitud de los análisis están también, además de otros factores, asociadas al uso del material de vidrio en el laboratorio.

Por lo tanto, es necesario que toda la vidriería esté perfectamente limpia, libre de impurezas, como jabones, detergentes y otros productos que puedan adherirse a las paredes de los recipientes.

Se puede lavar la vidriería en general con agua, agua y jabón neutro o por medio de soluciones especiales, como la solución sulfocrómica, por ejemplo.

Procedimiento de lavado

Para vidriería nueva:

- a) la mayoría de los materiales de vidrio nuevos es levemente alcalina. Por lo tanto, dichos materiales deben ser puestos en remojo por algunas horas en solución de ácido clorhídrico o nítrico a 1% antes de ser lavados.

Para vidriería usada:

- a) los materiales de vidrio ya utilizados con medio de cultivo (placas de Petri, tubos de cultivo), deben ser esterilizados antes de ser lavados. Enseguida deben ser puestos en un recipiente grande con agua, conteniendo 1 a 2% de jabón o detergente, dejando hervir por 30 minutos. Enseguida, se debe enjuagarlos en agua corriente, fregarlos con detergentes neutros y enjuagarlos otra vez;
- b) en determinadas situaciones en las que los materiales de vidrio no puedan ser limpios con los detergentes comunes u otros productos de limpieza, se requiere el uso de una mezcla constituida de ácido sulfúrico y solución saturada de dicromato de sodio, preparada de la siguiente manera: mezclar 1 litro de ácido sulfúrico concentrado con 35 ml de solución saturada de dicromato de sodio. Esa solución no debe ser usada para lavado de vidrierías utilizadas para análisis de cromo.

- Notas:**
1. la solución mencionada es ácida y agrede a la piel;
 2. no permitir contacto de la mano con la solución;
 3. la solución ataca a los tejidos. Evitar contacto con la ropa;
 4. no lavar con esta solución a vidrios pegados con cubetas utilizadas en espectrofotómetros, cubetas de turbidez, etc.;
 5. después de pasar esta solución en la vidriería, enjuagarla con agua en abundancia y enseguida con agua destilada.

Relación de materiales de laboratorio de análisis de agua

Equipos

- a) autoclave vertical, capacidad para 18, 24, 48 o 72 litros, 110/220 voltios;
- b) estufa para cultivo bacteriológico, con termostato regulable en la franja de 30 a 65°C, tamaño 45X45X40 cm de ancho, profundidad y altura, respectivamente, equipada con bandeja regulable para tres posiciones;
- c) balanza analítica, eléctrica, capacidad para 160 g, sensibilidad de 1/100 mg, cinco casas decimales, 110/220 voltios;
- d) balanza de precisión, con doble escala, pesaje máximo 200 gramos, sensibilidad de 0,1 g;
- e) destilador de agua, capacidad para 2 litros/hora, 110/220 voltios;
- f) baño maría capacidad para 50 tubos de ensayo, con termostato regulable en la franja de 35 a 65°C, 110/220 voltios;
- g) baño de vapor, para 6 pruebas simultáneas, construidas en chapa metálica, con termostato regulable en hasta 6 posiciones, 110/220 voltios;

- h) capilla para agotamiento forzado de gases, con motor eléctrico de 1/3 de HP 110/220 voltios;
- i) chapa calentadora con termostato regulable, tamaño x, 110/220 voltios;
- j) estufa para esterilización y secado, tamaño 50X40X50 cm de ancho, profundidad y altura, respectivamente, con termostato regulable hasta 300°C, y bandeja regulable para 3 posiciones, 110/220 voltios;
- k) equipo de Jar-Test para 6 pruebas simultáneas, con regulador de velocidad de 0 a 100 rpm, con base de vidrio o acrílico iluminado, 110/220 voltios;
- l) medidor de cloro residual, portátil, con disco de color, escala de 0 a 3,5 mg/l, para uso con reactivos DPD;
- m) termómetro bacteriológico, con escala de 0 a 60°C, con divisiones de 1°C;
- n) termómetro químico con escala de 0 a 300°C, con división de 1°C;
- o) turbidímetro completo;
- p) medidor de pH digital de bancada, franja de medición de 0 a 14, con electrodo, 110/220 voltios;
- q) medidor de pH, digital, portátil, franja de medición de 0 a 14, con electrodo, funcionamiento a batería de 9 voltios;
- r) linterna para identificación de E.coli, con lámpara fluorescente ultravioleta, 6 watts, 365 nm, recargable, portátil, 110 voltios;
- s) pico de Bunsen;
- t) deionizador capacidad para 50 litros/hora – 110/220 voltios.

Vidriería

- a) tubo para cultivo, sin borde, tamaño 150 x 16 mm;
- b) tubo para cultivo, sin borde, tamaño 180 x 18 mm;
- c) tubo para cultivo, sin borde, tamaño 125 x 15 mm;
- d) tubo de Nessler, forma alta, capacidad de 50 e 100 ml;
- e) tubo de Durham, tamaño 40 x 5 mm;
- f) balón volumétrico, fondo chato, con tapa de teflón o vidrio esmerilado clase "A", capacidad de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml;
- g) becker forma baja, graduado, capacidad de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml;
- h) bureta con grifo de vidrio o teflón, grabación permanente, clase "A", capacidad de 10, 25 y 50 ml;
- i) pipeta serológica, codificada por colores, con boca para algodón, grabación permanente, capacidad de 1, 2, 5 y 10 ml;
- j) pipeta de MOHR, codificada por colores, boca y pico temperados, grabación permanente, capacidad de 1, 2, 5 y 10 ml;
- j) pipeta volumétrica, codificada por colores, boca y pico temperados, grabación permanente, clase A, capacidad de 10, 25, 50 y 100 ml;
- l) frasco de vidrio para reactivos, boca ancha, color blanco, tapón de vidrio esmerilado intercambiable, capacidad de 125 ml;
- m) probeta graduada a contener, con base hexagonal de vidrio, grabación permanente, clase "A", capacidad de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml;

- n) frasco *Erlenmeyer*, boca ancha reforzada, graduado, capacidad de 125, 250 y 500 ml;
- o) embudo analítico, ángulo de 60°, liso, asta corta, con diámetro de 50, 75 y 100 mm;
- p) embudo analítico, ángulo de 60°, rayado, asta larga, con diámetro de 50, 75 y 100 mm;
- p) embudo analítico, ángulo de 60°, rayado, asta corta, con diámetro de 50, 75 y 100 mm;
- r) Placa de Petri de vidrio, transparente, tamaño 100 x 15 mm;
- s) conjunto de destilación para fluoruros, constituido de balón de fondo chato de 1000 ml con salida lateral para condensador Graham, con juntas esmeriladas;
- t) bastón de vidrio de 30 cm de largo x 5 mm de diámetro;

Materiales diversos

- a) asa de platina calibrada con 3 mm de diámetro;
- b) cable de Kolle para asa de platina;
- c) algodón en rama para bacteriología;
- d) lapis dermatográfico;
- e) caldo lactosa, deshidratado, envase de 100 o 500 gramos;
- f) caldo lactosa, verde brillante bilis a 2%, deshidratado, envase de 100 o 500 gramos;
- g) medio ENDO MF, para coli total, envase de 100 o 500 gramos;
- h) medio EC MF, para coli fecal, envase de 100 o 500 gramos;
- i) púrpura de bromocresol, envase de 5 gramos;

- j) soporte para tubo de ensayo, con capacidad para 15 tubos de 180 x 18 mm, de madera o plástico resistente.
- k) soporte para tubos de ensayo con capacidad para 40 tubos de 180 x 18 mm, en alambre resistente a autoclavación;
- l) caldo lauril triptase, deshidratado, envase de 100 o 500 gramos;
- m) medio EC, deshidratado, envase de 100 o 500 gramos.
- n) Plate count agar, deshidratado, envase de 100 o 500 gramos;
- o) sustrato cromogénico para determinación enzimática cualitativa de coliformes totales y E.coli en muestras de 100 ml de agua, caja con 20 ampollas;
- p) cesto de alambre con capacidad para 50 tubos de ensayo de 180 x 18 mm, resistente a la autoclavación;
- q) soporte para tubo de Nessler de 50 y 100 ml, en madera o aluminio, capacidad para 8 tubos;
- r) papel de aluminio, midiendo 7,5 m de largo x 30 cm de ancho;
- s) algodón hidrófilo, paquete de 500 gramos;
- t) Placa de Petri, de plástico, esterilizada, de 47 mm de diámetro;
- u) filtros estériles de 47 mm de diámetro, 0,45µm de porosidad, con tarjeta absorbente, envase con 100 unidades;
- v) conjunto porta filtro de membrana, construido en acero inoxidable, con dispositivo para esterilización en el campo;
- w) pinza de acero inoxidable, de 10 cm de largo.

Bioseguridad en laboratorio

En este manual constan solamente los principales procedimientos relacionados a la bioseguridad en laboratorio que deberán ser observados por los técnicos que actúan en el área.

Procedimientos de orden personal:

- a) no pipetear ningún tipo de líquido con la boca;
- b) usar gafas de protección en los ambientes del laboratorio donde el uso es obligatorio;
- c) no llevar las manos a la boca o a los ojos cuanto esté manoseando productos químicos;
- d) no guardar alimentos en el refrigerador del laboratorio;
- e) no comer dentro del laboratorio;
- f) no fumar en el interior del laboratorio;
- g) usar delantal/chaleco de mango largo con elástico en los puños, siempre. Y sacarlo al salir del laboratorio;
- h) lavar cuidadosamente las manos con agua y jabón en abundancia, antes de cualquier comida;
- i) no manipular productos tóxicos sin antes certificarse de su toxicidad.

Procedimientos relacionados al laboratorio

- a) mantener las bancadas del laboratorio siempre limpias y libres de materiales extraños al trabajo;
- b) retirar de la bancada los materiales, con muestras y reactivos empleados en el laboratorio, luego de utilizarlos;
- c) limpiar inmediatamente cualquier derramamiento de productos y reactivos con los cuidados necesarios;

- d) al vaciar un frasco de reactivo, hacer la limpieza previa con agua, antes de ponerlo para lavaje;
- e) rotular inmediatamente cualquier reactivo o solución preparada y las muestras recolectadas;
- f) no echar productos corrosivos concentraos en la cuba; desecharlos solamente después de ser diluidos;
- g) en la preparación de soluciones ácidas, nunca adicionar agua en el ácido sino ácido en el agua;
- h) no echar en la cuba líquidos inflamables y/o volátiles, almacenarlos en recipientes adecuados;
- i) disponer los cilindros con gases en ambientes externos al laboratorio, debidamente acondicionados;
- j) usar cámara de flujo laminar (cabina e seguridad biológica) para manipulación de medios de cultivo e investigación microbiológica.
- k) usar cámara de agotamiento (cabina de seguridad química) con lavador de gases cuando manosear líquidos inflamables y/o volátiles.

Procedimientos para el uso de vidrierías:

- a) no utilizar materiales de vidrio rotos;
- b) usar guantes de amianto para manosear piezas de vidrio que estén calientes;
- c) no dejar frascos calientes sin protección sobre las bancadas del laboratorio, ponerlos sobre placas de amianto;
- d) no calentar recipiente de vidrio en llama directa, usar tela de amianto;
- e) no presurizar recipientes de vidrio;

- f) no calentar vidriería en calentamiento – usar despertador, siempre;
- g) no usar frascos para muestras que no estén totalmente limpios y sin certificarse de su adecuación a los servicios a ser ejecutados,
- h) usar guantes de pellica y gafas de seguridad, siempre que cruzar o remover tapón de goma o corcho, de tubos de vidrio o termómetros;
- i) remover tapones de vidrio trabados;
- j) remover trozos de vidrio – usar recogedor y escoba;
- k) usar protector facial y guantes de pellica cuanto agitar solventes volátiles en frascos cerrados.

Procedimiento para uso de equipos en general

- a) antes de utilizar cualquier equipo, leer antes las instrucciones de operación proveído por el fabricante;
- b) nunca conectar equipos eléctricos sin antes verificar el voltaje;
- c) no instalar ni operar equipos eléctricos sobre superficies húmedas;
- d) no dejar equipos eléctricos conectados en el laboratorio fuera del horario, excepto los de energía constante, como neveras, estufas, etc.;
- e) combatir fuego en equipos eléctricos solo con extinguidor de CO₂;
- f) mantener los equipos de seguridad en locales de fácil acceso y al alcance de todos los empleados del laboratorio, tales como:
 - extinguidor de incendio;

- ducha de emergencia;
- lavador de ojos;
- manta de seguridad;
- máscara contra gases;
- máscaras y gafas de seguridad, etc.

Apéndice A
Recolección y preservación de
muestras para recuento de células de
cianobacterias y cianotoxinas



Introducción

Al fin de la elaboración de este manual, ya revisado y adaptado para la actual legislación sobre calidad de agua para consumo humano, han sido incluidos los procedimientos básicos de recolección de muestras de agua para la identificación y recuento de cianobacterias en manantiales de suministro.

Dicha iniciativa se debe a la creciente eutrofización de los ambientes acuáticos que ha sido producida principalmente por actividades humanas, causando un enriquecimiento artificial de esos ecosistemas. Las principales fuentes de ese enriquecimiento han sido identificadas como las descargas de aguas residuales domésticas e industriales de los centros urbanos y la contaminación difusa originada en las regiones agrícolas. Esta eutrofización artificial produce cambios en la calidad del agua, incluso: la reducción de oxígeno disuelto, la pérdida de las calidades escénicas, es decir, de las características estéticas del ambiente y su potencial para el ocio, la muerte extensiva de peces y el aumento de la incidencia de floraciones de microalgas y cianobacterias, con consecuencias negativas sobre la eficiencia y costo de tratamiento del agua, cuando tratarse de manantial de suministro público. Estas floraciones o "blooms" se caracterizan por el intenso crecimiento de dichos microorganismos en la superficie del agua, formando una densa capa de células con varios centímetros de profundidad, con consecuencias relacionadas a la salud pública.

Recolección y preservación de muestras para recuento de células de cianobacterias

Material necesario

- a) Frasco de polietileno o vidrio ámbar, con capacidad para 1000 ml;

- b) Botella de Van Dorn o similar;
- c) Solución de lugol;
- d) Solución de Formaldehído a 40%;
- e) Equipos de protección individual (guantes, botas y máscara).

Definición del punto de recolección de la muestra

- a) cuando haya floración de Cianobacterias, la muestra deberá ser recolectada en su punto de mayor concentración;
- b) cuando no haya floración de Cianobacterias, la muestra deberá ser recolectada en el punto de captación de la ETA, en el manantial.

Identificación de las muestras

- a) todas las muestras deberán ser identificadas por una numeración en el propio frasco de recolección, relativo a las fichas de recolección;
- b) las fichas de recolección acompañarán las muestras y deberán contener los siguientes datos: nombre y dirección del interesado, nombre del manantial, tipo de manantial, fecha y hora de la recolección, descripción del local de recolección – GPS, nombre del colector, ocurrencia de fenómenos.

Procedimiento de recolección – muestra de superficie

- a) hacer ambiente en el frasco de recolección al menos por tres veces;

- b) llenar el envase con la muestra recolectada, dejando un volumen de aire en la parte superior del frasco;
- c) recolectar al menos 1000 ml de la muestra para agua bruta;
- d) recolectar 4.000 ml de la muestra para agua tratada.

Observación: Recolectar solamente en frasco ámbar

Preservación, acondicionamiento y transporte de la muestra

- a) ambientes oligotróficos: preservar las muestras en solución Lugol (adicionar 1 ml/l);
- b) ambientes eutrofizados: preservar las muestras en solución Formaldehído a 40%: (adicionar 2ml/l)
- c) refrigerar la muestra a 4°C;
- d) acondicionar en cajas térmicas y dirigirlas al laboratorio en máximo 8 horas.

Recolección y preservación de muestras para determinación de cianotoxinas.

Material utilizado

- a) Frasco de polietileno o vidrio ámbar, con capacidad para 1000 ml;
- b) Equipos de protección individual (guantes, botas y máscara);

Definición del punto de recolección de la muestra

- a) cuando haya floración de Cianobacterias, la muestra deberá ser recolectada en su punto de mayor concentración;
- b) cuando haya floración de Cianobacterias y el recuento de células sobrepasar a 20.000 células/ml, deberán ser recolectadas muestras en el manantial y en la salida de la ETA, bajo determinación de la Portaria MS nº 2914/2011;
- c) cuando no haya floración de Cianobacterias, la muestra deberá ser recolectada en el punto de captación de la ETA, en el manantial.

Identificación de las muestras

- a) todas las muestras deberán ser identificadas por una numeración en el propio frasco de recolección, relativo a las fichas de recolección;
- b) las fichas de recolección acompañarán las muestras y deberán contener los siguientes datos: nombre y dirección del interesado, nombre del manantial, tipo de manantial, fecha y hora de la recolección, descripción del local de recolección – GPS, nombre del colector y ocurrencia de fenómenos.

Procedimientos de recolección Fracción Particulada

Material necesario

- a) hacer ambiente en el frasco de recolección al menos por tres veces;

- b) llenar el envase con la muestra recolectada, dejando un volumen de aire en la parte superior del frasco;
- c) recolectar al menos 1000 ml de la muestra de agua bruta;
- d) recolectar 4.000 ml de la muestra de agua tratada.

Preservación, acondicionamiento y transporte de la muestra

- a) refrigerar la muestra a 4°C;
- b) acondicionar en cajas térmicas y dirigirlas al laboratorio en máximo 8 horas.

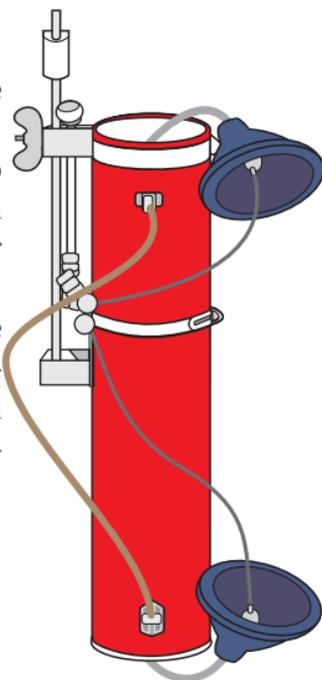
Observación: Caso la muestra no pueda ser enviada al Laboratorio el mismo día de la recolección, ella deberá ser congelada y enviada al laboratorio en plazo máximo de 15 días.

Lavado de los frascos

El siguiente procedimiento es sugerido para lavar los frascos de recolección y acondicionamiento de muestras para análisis de cianotoxinas: dejarlos previamente inmersos en jabón neutro por 12 horas, después lavar con agua en abundancia y poner la solución de HCl a 5% durante 12 horas, lavar otra vez con agua destilada en abundancia y secar. Caso el frasco ya haya sido utilizado anteriormente para recolección de muestras conteniendo cianobacterias, dejarlo en una solución de agua sanitaria por 30 minutos antes de pasar por el jabón neutro.

Botella de van Dorn

La botella de van Dorn (fig.) consiste de un tubo de PVC con volumen de 2, 5 y 7 litros o más. El funcionamiento consiste en sumergir la botella abierta en los dos extremos y luego alcanzar el punto deseado, dejar que caiga el mensajero que cierra herméticamente los dos extremos. La muestra es retirada por la manguera que queda en la parte lateral de la botella, desconectando la parte superior.



Apéndice B
Determinación de *Giardia sp* y
***Cryptosporidium sp* en agua por la técnica**
de filtración, separación inmunomagnética y
microscopía de inmunofluorescencia



Introducción

La transmisión de protozoonosis vía suministro de agua, en particular giardiasis y criptosporidiosis, es un tema que ha despertado creciente preocupación en lo tocante a la salud pública.

Protozoarios son microorganismos eucarióticos, unicelulares, sin pareces celulares, que se alimentan de bacterias y otros organismos. La mayoría de los protozoarios es de vida libre y se pueden ser hallados en aguas superficiales, sin embargo, diferentes especies son parasitas. Los efectos sobre la salud decurrentes de la exposición a protozoarios presentes en el agua de consumo son variados. La manifestación más común son disturbios gastrointestinales, normalmente, de corta duración. Sin embargo, en individuos sensibles, como niños, ancianos e inmunocomprometidos, los efectos pueden ser más graves, crónicos o aún fatales.

Giardia y *Cryptosporidium* son microorganismos de amplia distribución y relevante patogenicidad, que se multiplican solamente en el trato gastrointestinal de seres humanos y otros animales. A pesar de no poder reproducirse en el ambiente, pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo en medio acuático. Quistes de *Giardia* y, principalmente, ooquistes de *Cryptosporidium*, son reconocidamente resistentes a los agentes desinfectantes utilizados en el tratamiento de agua para consumo humano, particularmente cuando el cloro es el agente utilizado.

Frente a ese escenario, la Portaria MS nº 2.914/2011 impone el monitoreo de *Giardia* y *Cryptosporidium* en el local de captación de agua cuando la media geométrica anual de *E. coli* en ese punto sea mayor o igual a 1.000 org/100ml. Adicionalmente, cuando la media aritmética de concentración de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* sea mayor o igual a 3,0

ooquistes/l en los puntos de captación de agua, la Portaría recomienda que la turbidez del efluente filtrado (filtración rápida) sea menor o igual a 0,3 uT, o que, alternativamente, se utilice el proceso de desinfección que comprobadamente alcance la misma eficiencia de remoción de ooquistes de *Cryptosporidium sp.*

Las metodologías utilizadas para detección de (oo)quistes se basan en la concentración de las muestras y de detección. En todos los métodos utilizados en el monitoreo de ooquistes, las etapas de concentración, purificación (que se incorpora para separar (oo)quistes de los residuos remanentes) y detección son consideradas muy importantes. Sin embargo, se destaca que dichas metodologías han sido delineadas y estandarizadas en países como EUA, Australia y Canadá, cuyos programas y legislaciones de control de la contaminación y de degradación de los manantiales son priorizados.

Las diferentes metodologías adoptadas para la investigación de protozoarios patogénicos en agua están bajo las varias limitaciones, como por ejemplo, elevados costes, necesidad de importación de insumos y exigencias de recursos humanos especializados. También hay grande variabilidad de resultados y baja tasa de recuperación de los métodos analíticos, aun cuando empleado el método de referencia – Método 1623/USEPA. Se debe considerar que dichas metodologías no permiten la identificación de especies de protozoario (que puede ser útil indicador de la fuente de contaminación) tampoco proveen informaciones sobre la infectividad de los organismos.

A seguir, se describe una metodología de determinación de *Giardia sp* y *Cryptosporidium sp* en muestras de agua.

Determinación de *Giardia sp* y *Cryptosporidium sp* en agua por la técnica de filtración, separación inmunomagnética y microscopía de inmunofluorescencia.

Método 1623 de la USEPA: Determinación de *Giardia sp* y *Cryptosporidium sp* en agua por la técnica de filtración, separación inmunomagnética y microscopía de inmunofluorescencia (USEPA, 2005).

1. Principio del método

La técnica de detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* descrita en ese procedimiento se basa en las etapas: concentración de la muestra por filtración y centrifugación, purificación por separación inmunomagnética (IMS), coloración y lectura de láminas (microscopía de inmunofluorescencia – FA). *Cryptosporidium* y *Giardia* se identifican por medio del colorante DAPI (del inglés 4'-6-Diamidino-2-phenylindole) y microscopía de Contraste por Interferencia Diferencial. Este método identifica los géneros *Cryptosporidium* o *Giardia*, pero no en nivel de especie. Su aplicación exige el empleo de personal capacitado con entrenamiento y experiencia en la determinación de *Cryptosporidium* y *Giardia* por filtración, IMS y FA.

2. Intervinientes

Turbidez	Influencia en las etapas de concentración y separación, en virtud de la concentración de material particulado y del análisis de la muestra en microscopio, dificultando la identificación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y quistes de <i>Giardia</i> .
Organismos o detritos con autofluorescencia o inmunofluorescencia	Interferencia en la identificación de (oo)quistes, originando falsos positivos

Contaminación	Solventes, reactivos, material de laboratorio y otros hardwares de procesamiento de muestras pueden ser responsables por introducir intervinientes y originar errores de interpretación de las pruebas microscópicas de ooquistes y quistes. Todos los materiales utilizados deben tener constatada la ausencia de interferentes bajo las condiciones de análisis por medio de la ejecución de blanco (control negativo). Material desechable deber ser usado siempre que posible.
Inexperiencia del laboratorista	La identificación de (oo)quistes en microscopio exige capacidad del laboratorista en identificar ambos los géneros en medio a la muestra ambiental (formada por componentes diversos) y capacitación en las diferentes etapas de los métodos y manoseo de los equipos

3. Seguridad

El peligro de contaminación biológica asociada y el riesgo de infección por quistes y ooquistes son elevados en este método, ya que involucra la manipulación de muestras concentradas de organismos patogénicos vivos (activos). Por lo tanto, deben ser manoseadas con guantes;

El laboratorio debe establecer medidas de seguridad y prácticas de salud apropiadas, observando los procedimientos de seguridad típicos de laboratorios de microbiología que lidian con organismos patogénicos, durante la preparación,

uso y eliminación de la muestra concentrada, reactivos y materiales, en la operación y esterilización de equipos;

El conocimiento acerca de la toxicidad o carcinogenicidad de los compuestos o reactivos utilizados no son muy consolidados, de tal modo que, cada compuesto debe ser tratado como potencial peligro a la salud, debiendo su exposición ser reducida al nivel más bajo posible:

El transporte de muestras, conteniendo agentes infecciosos, debe ser llevado con mucha atención, procediéndose preferiblemente a la inactivación de los agentes. Sin embargo, deben ser observadas normas y legislaciones pertinentes al transporte de agentes biológicos inactivados o no.

4. Equipos y materiales

Nota: Marcas o proveedores citados son únicamente para referencias. Desempeño equivalente puede ser logrado utilizando marcas alternativas, sin embargo, se debe observar la adecuación de los insumos utilizados.

4.1 Galones o recipientes plásticos (polietileno) para recolección de muestras con volumen entre 10 y 50 litros. El material de recolección debe ser, preferiblemente, desechable (reciclable);

Nota: Opcionalmente, se puede optar por la esterilización de los galones de recolección por el lavado con 200 ml de solución de hipoclorito de calcio 12,5% (agitar de modo consistente para esparcir la solución), esperar de 8 a 12h (overnight), desechar la solución de hipoclorito de calcio y lavar, primeramente, con 200 ml de solución de tiosulfato de sodio (52%) y enseguida enjaguar con agua destilada (agua reactiva).

4.2 Agitador de tubos (tipo Vortex);

4.3 Agitador magnético;

- 4.4 Barras magnéticas;
- 4.5 Agitador rotatorio con capacidad de 18rpm/min;
- 4.6 Bomba de vacío/presión o línea de presión con capacidad mínima de 5 bar;
- 4.7 Centrífuga capaz de proporcionar fuerza de 1500g equipada con rotores "swinging bucket" que acomoden tubos cónicos de 250 ml y 50 ml;
- 4.8 Concentrador de partículas magnéticas para tudos de 10 ml (MPC®1 o MPC®6);
- 4.9 Concentrador de partículas magnéticas para tubos de microcentrífuga (MPC®-M o MPC®-S);
- 4.10 Homogeneizador (tipo Stomacher) con capacidad de 300-350 golpes/minuto;
- 4.11 Bolsas plásticas compatibles con el homogeneizador;
- 4.12 Micropipetadores con volumen variable de 100-1000 μ L y 10-100 o 20-200 μ L;
- 4.13 Microscopio óptico equipado con contraste interviniente diferencial (DIC) y epifluorescencia con capacidad de proveer aumentos de 200x, 400x y 1000x;
- 4.14 Porta filtro de espuma;
- 4.15 Béqueres de 1000 o 2000 ml;
- 4.16 Filtros de espuma (Filta Max);
- 4.17 Estación de lavado y concentración (Filta Max);

- 4.18 Membrana de policarbonato de 25 mm de diámetro y retención de 1 μ m;
- 4.19 Láminas para microscopía de fluorescencia;
- 4.20 Laminillas (mínimo 24x32 mm);
- 4.21 Pipetas Pasteur;
- 4.22 Pipetas serológicas de 5 y 10 ml;
- 4.23 Conteras de polipropileno con capacidad para 200-300 μ l y 1000 μ l;
- 4.24 Probeta de 500 ml;
- 4.25 Tubos de polipropileno de 1,5 ml (tipo eppendorf);
- 4.26 Tubos cónicos de centrifuga con capacidad de 250 ml y 50 ml;
- 4.27 Tubos de Leighton (lado plano).

5. Reactivos

- 5.1 Hidróxido de sodio;
- 5.2 Ácido clorídrico;
- 5.3 Acetona;
- 5.4 Glicerol;
- 5.5 Etanol;
- 5.6 Metanol;
- 5.7 Agua reactiva (agua ultrapura);

5.8 Tween® 20 (Sigma Chemical);

5.8.1 Tampón fosfato salino – PBS pH 7.4 (Sigma Chemical): 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.15 g Na₂HPO₄ anidro; 0.2 g KH₂PO₄; 1,0 l agua reactivo;

5.8.2 DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma Chemical);

5.9 Soluciones para elución de los filtros;

5.9.1 Tampón fosfato salino/Tween® 20 (PBST): Adicionar 0,10ml (100µl) de Tween® 20 a 1,0l en solución Tampón fosfato salino (PBS);

5.9.2 Solución stock: disolver 2 mg DAPI en 1,0 ml de metanol absoluto;

Nota: Preparar volúmenes mínimos para el uso y ponerlos en frasco o tubo estéril protegido de la luz con tapón roscado. Almacenar entre 1°C y 10°C. No permitir congelamiento. Desechar la solución luego de 2 semanas o cuando el control positivo salga negativo.

5.9.3 DAPI (solución de uso – seguir instrucciones del fabricante del conjunto de anticuerpos): adicionar 0,01 ml de DAPI (solución stock) a 50 ml de PBS;

Nota: Preparar volúmenes mínimos para el uso y ponerlos en frasco o tubo estéril protegido de la luz con tapón roscado. Almacenar entre 1°C y 10°C. Preparar la solución diariamente.

5.10 Soluciones para montaje de las láminas;

5.10.1 Glicerol/PBS: Mezclar 60 ml de Glicerol y 40 ml de PBS.

Nota: Preparar al momento de uso.

5.10.2 Medio de montaje DABCO/Glicerol: pesar 2,0g de DABCO (Sigma Chemical) y poner en un balón volumétrico. Adicionar 95 ml de solución de glicerol/PBS tibia (calentada) y mezclar hasta la completa disolución del reactivo. Completar el volumen para 100 ml y poner en frasco estéril con tapón roscado de capacidad e 100 ml. Mantener refrigerado de 2 a 8°C (validez: 3 meses).

6. Recolección de muestra

6.1 Llenar completamente el envase, asegurando la recolección de 10 l (la versión del método utilizando filtro e espuma Filta Max ® ha sido validada para un volumen de 50 l, sin embargo, volúmenes de muestras alternativos pueden ser usados);

6.2 Las muestras deberán ser recolectadas en volumen único y mantenidas refrigeradas entre 1°C y 10°C, sin congelamiento, hasta su procesamiento;

7. Identificación de la muestra

7.1 Identificar adecuadamente la muestra;

7.1.1 Registrar informaciones de la procedencia de la muestra, fecha y hora de la recolección;

7.1.2 Registrar datos del análisis: fecha del inicio del análisis, volumen analizado y volumen de lo centrifugado;

7.1.3 Registrar lotes de los reactivos y soluciones utilizadas

8. Filtración

8.1 Poner el filtro de espuma en el porta filtro;

- 8.2 Conectar, con el auxilio de un tubo de silicona o porta filtro, al recipiente conteniendo la muestra y a la bomba o línea e presión;
- 8.3 El efluente al proceso de filtración debe ser almacenado en recipiente graduado para medición del volumen;
- 8.4 Terminada la filtración de la muestra, desconectar la presión. Desconectar el porta filtro del tubo y tapar el porta filtro con un tapón de goma en los puntos de entrada y salida;
- 8.5 Si la elución no se hace inmediatamente, almacenar el porta filtro con la espuma bajo refrigeración (1 a 10°C).
Se puede iniciar la elución en 96h luego de la recolección de la muestra o su filtración en campo;

9. Elución

Nota: El proceso de elución, aquí descrito, utiliza estación de lavado Filta-Max®. Se debe consultar las instrucciones del fabricante para dominio de montaje y operación del equipo. Opcionalmente se puede utilizar un Stomacher.

9.1 Procedimiento de elución en la estación Filta-Max®;

9.1.1 Primer lavado;

9.1.1.1 Poner la membrana filtrante plana en la base del concentrador, con la parte rugosa hacia arriba;

9.1.1.2 Usar las trabas de la estación de lavado para atornillar el tubo concentrador (creando una impermeabilización en la membrana);

9.1.1.3 Retirar el tubo concentrador de la estación de lavado;

- 9.1.1.4 Remover el filtro de espuma del porta-filtro;
- 9.1.1.5 Conectar el filtro de espuma a la estación de lavado.
- 9.1.1.6 Verter el exceso de líquido recuperado a partir del módulo de filtración para el tubo concentrador, enseguida, lavarlo con PBST y verter el líquido en el tubo concentrador;
- 9.1.1.7 Adicionar 600 ml de PBST para el tubo concentrador y conectarlo en la base bajo el tubo de elución;
- Nota:** Si se recupera más de 50 ml de líquido a partir del módulo de filtración, reducir el volumen de PBST en conformidad.
- 9.1.1.8 Lavar el filtro de espuma, moviendo el émbolo hacia arriba y hacia abajo 20 veces. Se recomienda movimientos suaves del émbolo para evitar la producción excesiva de espuma.
- 9.1.1.9 Separar el concentrador y purgar el líquido sobrante en el tubo de elución, moviendo el émbolo hacia arriba y hacia abajo 5 veces. Enseguida, para evitar que escurra, poner el tampón proveído en la extremidad del tubo de acero.
- 9.1.1.10 Concentrar la solución eluida del primer lavado utilizando el equipo Filta-Max®. Poner el tubo concentrador sobre una placa de agitación magnética y poner el tapón, con barra agitadora magnética.
- 9.1.1.11 Conecte el equipo de drenaje a la válvula en la base del concentrador. Conecte el agitador y abra la válvula.
- 9.1.1.12 Conecte la bomba a vacío.

9.1.1.13 Permitir que el líquido fluya hasta una altura alrededor del medio de la barra agitadora. Enseguida cerrar la válvula.

9.1.1.14 Remover el agitador magnético y lavarlo con PBST o agua reactiva para recuperar todos los oocistos.

9.1.1.15 Transferir el concentrado para un tubo de 50 ml. Enseguida, lavar los lados del tubo de concentración y transferir el producto del enjuague para el tubo de 50 ml.

9.1.2 Segundo lavado

9.1.2.1 Adicionar un volumen extra de 600 ml de PBST para el módulo concentrador,

9.1.2.2 Repetir el lavado de los filtros de espuma, moviendo el émbolo hacia arriba y hacia abajo 10 veces. Se recomienda movimientos suaves del émbolo para evitar la producción excesiva de espuma.

9.1.2.3 Adicionar el concentrado del primer lavado, almacenado en el tubo de 50 ml, para el aluato (mezcla de eluente y soluto) del segundo lavado y repetir el proceso de concentración de la muestra con aparato Filta-Max®.

Nota: En caso de obstrucción de los poros de la membrana e interrupción de la fluidez antes de finalizarse la concentración, se puede sustituir la membrana filtrante. Desmonte el tubo concentrador y almacene el eluato remanente en un recipiente. Retire la membrana con auxilio de una pinza, poniéndola en la bolsa provista. Ponga una nueva membrana y remonte el tubo concentrador. Remonte el eluato almacenado al tubo concentrador, lave el recipiente con agua reactiva y adicione el líquido al eluato. Pro siga la concentración. Se puede sustituir la membrana cuantas ve-

ces se necesite. Se puede también hacer la concentración por centrifugación a 1500G por 15 minutos.

9.1.2.4 Remover el agitador magnético.

9.1.2.5 La muestra final podrá ser vertida para dentro del mismo tubo de 50 ml. Lavar los lados del tubo concentrador con PBST y verter la solución para el tubo de 50 ml.

9.1.2.6 Insertar el tubo concentrador vacío en la estación de lavado.

9.1.2.7 Retirar la membrana y transferirla para la bolsa provista con el auxilio de una pinza;

9.1.2.8 Lavar la membrana:

9.1.2.8.1 Manualmente – Adicionar 5 ml de PBST para la bolsa con la membrana. Fregar la superficie de la membrana a través de la bolsa hasta que la membrana parezca limpia. Usando una pipeta, transferir el producto de elución a un tubo de 50 ml. Repita el lavado de la membrana con más 5 ml de PBST y transferir el producto de elución para el tubo de 50 ml.

9.1.2.8.2 Lavado con Stomacher – Adicionar 5 ml de PBST para la bolsa con la membrana. Ponga la bolsa con la membrana en un Stomacher y agite durante 3 minutos. Usando una pipeta, transferir el eluato a un tubo de 50 ml. Repita el lavado dos veces utilizando el Stomacher y 5 ml de alícuotas de PBST.

10. Centrifugación

10.1 Centrifugar el tubo de 50 ml a 1500g durante 15 minutos

10.2 Con el auxilio de una pipeta de Pasteur, aspirar cuidadosamente el sobrenadante hasta 5 ml sobre el sedimento.

10.3 Registrar el volumen del sedimento.

Nota: El volumen del sedimento no debe ser superior a 0,5 ml, cantidad máxima recomendada de material particulado para purificación por el método.

11. Separación inmunomagnética

11.1 Agitar con vigor el tubo en vortex para resuspensión del sedimento:

11.1.1 Si el volumen de sedimento es inferior a 0,5 ml, agite el tubo con vigor en vortex hasta el sedimento ser completamente resuspendido. Girar el tubo de centrífuga suavemente para reducir la espuma formada por la homogeneización.

11.1.2 Si el volumen de sedimento es superior a 0,5 ml, el concentrado debe ser separado en varias submuestras (una submuestra no debe tener volumen de sedimento superior a 0,5 ml).

11.1.2.1 Estimar el volumen total requerido usando el volumen del sedimento por la fórmula

$$\text{Volumen total requerido (mL)} = \frac{\text{Volumen de sedimento (ml)}}{0,5 \text{ mL}} \times 5,0 \text{ mL}$$

Por ejemplo, si el volumen del precipitado es 1,2 ml, el volumen total necesario será 12 ml. Adicionar agua purificada al tubo de centrífuga para completar el volumen para 12 ml

- 11.1.3 Si todo el volumen obtenido es sometido al IMS, dividirlo por 5 ml y calcular el número de submuestras a ser analizadas (redondeando para el número entero superior más cercano). En el ejemplo citado, $12/5 \text{ ml} = 2,4$ redondeado, serán 3 muestras.
- 11.1.4 Si el volumen a ser analizado es parcial, agitar con vigor el volumen total en vortex para resuspender completamente el precipitado.
- 11.2 Preparar, para cada concentrado, 1,5ml de una dilución 1X del tampón SL-A 10X. Para cada 1,0 ml requerido de la solución diluida, mixture 100 μ L (0,1ml) y 900 μ L (0,9ml) de agua reactiva.
- 11.3 Transferir, con el auxilio de una pipeta de 10ml, 5ml de la muestra concentrada (o submuestra) para el tubo de Leighton (lado plano) con 1,0 ml de cada tampón, SL-A 10X y SL-B 10X (Dynabeads GC-Combo).
- 11.4 Enjaguar dos veces con agua reactiva al tubo que lleva el concentrado (o submuestra), de modo a que el volumen final en el tubo de Leighton sea de 12 ml.
- 11.5 Adicionar a cada tubo de Leighton (conteniendo muestra y tampones), 100 ml de Dynabeads®Crypto-Combo y 100ml de Dynabeads®Giardia-Combo, previamente homogeneizados en el vortex por 10 segundos. Poner los tubos en el agitador rotatorio al menos por 1 hora, a 18 rpm.
- 11.6 Transferir el tubo de Leighton para el concentrador magnético de partículas (MPC®1 o MPC®6), homogeneizar manual y suavemente, en un ángulo alrededor de 90o por 2 minutos.

- 11.7 Desechar el sobrenadante sin retirar el tubo del concentrador magnético de partículas y sin agitar el material.
- 11.8 Si la muestra está turbia, desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 10 ml de PBS y repetir el procedimiento en el concentrador magnético de partículas.
- 11.9 Remover el concentrador magnético de partículas y resuspender la muestra en 500µL (0,50ml) de tampón SL-A 1X utilizándose pipeta Pasteur y transferir para un tubo eppendorf. Adicionar más 500µL de tampón SL-A 1X al tubo de Leighton, lavar bien y transferir para el tubo eppendorf. Colocar el eppendorf en el concentrador magnético, MPC®-M o MPC®-S, y homogeneizar manualmente en un ángulo de 180°C durante 1 minuto.
- 11.10 Para transferir, cuantitativamente, todo el volumen, esperar por la segunda transferencia, alrededor de un minuto y recoger cualquier volumen residual que haya fluido para la parte inferior del tubo.
- 11.11 Desechar el sobrenadante, sin retirar concentrador magnético.
- 11.12 Disociación del complejo beads/(oo)quiste
- 11.13 Remover el concentrador magnético
- 11.14 Adicionar 50µl de la solución de HCl 0,1N. Enseguida agite en el vortex a alta velocidad por cerca de 50 segundos.
- 11.15 Colocar el tubo en el concentrador magnético (MPC®-M o MPC®-S) sin el tirante magnético en el lugar y dejar descansar en una posición vertical, al menos por 10 minutos, a temperatura ambiente.

- 11.16 Agite en el Vortex durante 30 segundos, aproximadamente.
- 11.17 Asegurar que toda la muestra está en la base del tubo. Poner el tubo de microcentrífuga (eppendorf) en el concentrador magnético (MPC®-M o MPC®-S).
- 11.18 Ponga el tirante magnético en el concentrador magnético (MPC®-M o MPC®-S) y dejar reposar durante mínimo 10 segundos.
- 11.19 Preparar una lámina e identificarla. Adicionar 5 μL de NaOH 1,0 N al pozo de la lámina.
- 11.20 El procedimiento involucra dos disociaciones ácidas, sin embargo, se puede optar por montar dos láminas, cada una con el volumen de cada disociación, o una única lámina. Caso se opte por montar una única lámina, adicionarse 10 μL de NaOH 1,0 N al pozo de la lámina. Se debe medir el volumen del concentrado adicionado a la lámina.
- 11.21 El volumen obtenido de la disociación puede ser almacenado en otro eppendorf con 10 μL de NaOH 1,0 N. De esta manera, se puede hacer la lectura de una menor alícuota del concretado. Se debe, por lo tanto, registrar el volumen concentrado y el volumen de la alícuota.
- 11.22 Sin remover el eppendorf del concentrador magnético (MPC®-M o MPC®-S) transferir toda la muestra para el pozo de la lámina con el NaOH. Evitar tocar las partículas presas a la pared del tubo. Asegurar que se transfiera todo el fluido.

11.23 Remover el eppendorf del concentrador magnético y repetir el procedimiento de lavado con ácido.

11.24 El volumen de la segunda disociación ácida puede ser adicionado a la lámina que lleva el volumen de la primera disociación o se puede montar una segunda lámina.

Nota: Los pozos de la lámina pueden ser pequeños para acomodar los volúmenes de ambas las disociaciones.

Nota 2: Las etapas de elución, concentración y purificación (separación inmunomagnética) deben ser concluidas en un único día de trabajo.

12. Coloración

12.1 Dejar pernoctar las láminas a temperatura ambiente para que se sequen (o hasta que la lámina esté completamente seca). Seguir las instrucciones del fabricante para efectuar a coloración inmunofluorescente.

Nota: La coloración debe ser iniciada en hasta 72h luego de preparada la lámina.

12.2 Poner la lámina en cámara húmeda, en el oscuro y a temperatura ambiente por 30 minutos, aproximadamente. (La cámara húmeda es un recipiente plástico que contiene toallas de papel húmedas sobre las cuales son puestas las láminas).

12.3 Lavar a los pozos, adicionando PBS en cantidad suficiente (100µl, aproximadamente). Aspirar el líquido cuidadosamente, sin tocar el área con el material;

12.4 Adicionar 50µl de DAPI y dejar en reposo durante 5 minutos en la cámara húmeda (La cámara húmeda es un recipiente plástico que contiene toallas de papel húmedas sobre las cuales son puestas las láminas).

- 12.5 Lavar a los pozos, adicionando PBS en cantidad suficiente (100µl, aproximadamente). Aspirar el líquido cuidadosamente, sin tocar el área con el material;
 - 12.6 Colocar una gota del medio de montaje DABCO/glicerol y cubrir con una laminilla, evitando la formación de burbujas entre la lámina y la laminilla;
 - 12.7 Cuidadosamente, sellar los bordes de la laminilla con esmalte transparente.
 - 12.8 Preparar láminas de control positivo y negativo, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
- Nota:** La prueba microscópica debe ser iniciada luego que la coloración haya sido finalizada, pero si los colorantes no pierden la fluorescencia, se puede llevar a cabo hasta en 168h (7 días) con las láminas almacenadas al abrigo de la luz.

13. Lectura microscópica

- 13.1 Probar cada pozo de modo sistemático, estableciendo un patrón de lectura, de arriba hacia abajo o de un lado al otro, asegurando que se evalúe toda el área.
- 13.2 Probar usando inmunofluorescencia (FA), DAPI y microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC).

14. Controles positivo y negativo

- 14.1 Iniciar la prueba por los controles positivo y negativo, identificando en el control positivo al menos tres ooquistes de *Cryptosporidium* y tres quistes de *Giardia*. Probar el control negativo, confirmando la ausencia de quistes y ooquistes.

14.2 Registrar los resultados e iniciar la lectura de las muestras solo si los controles positivo y negativo hayan presentado resultados satisfactorios.

14.3 Oocistos de *Cryptosporidium*

14.3.1 Probar en FITC en aumento de 200X. Son oocistos característicos, formas fluorescentes ovoides o esféricas de 4 a 6 μm de diámetro;

14.3.2 Al visualizar los ooquistes, ampliar para 400X y cambiar el microscopio para filtro bloqueador de UV para DAPI. Los ooquistes característicos presentan coloración interna azul brillante o presencia de hasta 4 núcleos de coloración azul celeste;

14.3.3 Enseguida, probar en contraste de interferencia diferencial y observar la presencia de características morfológicas internas y externas típicas de ooquistes de *Cryptosporidium*, en aumento de 1000X.

14.3.4 Un resultado positivo de ooquiste *Cryptosporidium* exhibe fluorescencia, tamaño y formas típicas y positivo para Fluorescencia-FITC, DAPI; Contraste de interferencia diferencial-DIC

14.4 Quistes de *Giardia*

14.4.1 Probar en FITC en aumento de 200X. Son quistes característicos, formas fluorescentes ovoides o esféricas de 8 a 18 μm de diámetro y 5 a 15 μm de ancho;

14.4.2 Al visualizar los quistes, ampliar para 400X y cambiar el microscopio para filtro bloqueador de UV para DAPI. Los quistes característicos presentan coloración interna azul brillante o presencia de hasta 4 núcleos de coloración azul celeste;

14.4.3 Enseguida, probar en contraste de interferencia diferencial y observar la presencia de características morfológicas internas y externas típicas de quistes de Giardia.

14.4.4 Un resultado positivo para quiste de Giardia fluorescencia típica, tamaño y forma típica y no exhibe características atípicas en FA, DAPI o DIC.

14.5 Cálculo de los resultados

Caso todo el volumen concentrado (final disociación ácida) sea llevado al microscopio.

$$N^{\circ} \text{ de (oo) quistes. } L^{-1} = \frac{N^{\circ} \text{ de (oo) cistos identificados}}{\text{Volumen de la muestra recolectada}}$$

Caso se realice la lectura en microscopio de una alícuota del volumen concentrado obtenido al final de la disociación ácida.

$$N^{\circ} \text{ de (oo) cistos. } L^{-1} = \frac{N^{\circ} \text{ de (oo) cistos identificados} \times \frac{\text{Volumen del concentrado (uL)}}{\text{Alícuota del concentrado analizada (uL)}}}{\text{Volumen de la muestra recolectada}}$$



Bibliografía



Bibliografía

BATALHA, B. H. L.; PARLATORE, A. C. **Controle da qualidade da água para o consumo humano: bases conceituais e operacionais**. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual técnico de análise de água para consumo humano**. Brasília: Funasa, 1999.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Dispõe sobre normas e padrões de potabilidade de água para consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266.

COELHO, L. **Técnicas de laboratório clínico**. São Paulo: Atheneu, 1968.

GUIA de coleta e preservação de amostras de água. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1987.

LIMPEZA de vidraria. Disponível em: <http://www.profcupido.ig.com.br/conserv_e_limpeza_vidrarias.Htm>. Acesso em: 01 mar. 2004.

MAIER, F. J. **Fluoruración del agua potable**. 1. ed. México: Limusa-Wiley, 1971.

MANUAL de tratamiento de aguas. 4. ed. México: Limusa-Wiley, 1974.

OPERAÇÃO e manutenção de E.T.A. São Paulo: Cetesb, 1973. v. 2.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Guías para a calidad del agua potable**. 2. ed. Ginebra, 1995. v.1.

_____. **Guías para a calidad Del agua potable**. 1. ed. Ginebra, 1998. v.3.

_____. **Guías para a calidad Del agua potable**. 3. ed. Ginebra, 2004. v.1.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Fascículo água: a desinfecção da água**. Brasília: OPAS, 1999.

SANTOS FILHO, D. F. **Tecnologia de tratamento de água: água para indústria**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora AN, 1976.

SILVA, M. O. S. A. **Análises físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgotos**. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1977.

STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington: APHA, 1985.

TÉCNICAS de abastecimento e tratamento de água. 2. ed. São Paulo: Cetesb, 1977. v.2.

TÉCNICAS de análises microbiológicas da água: membrana filtrante. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1997.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 1623: Cryptosporium and Gardia in water by filtration/IMS/FA. Washington, 2005. 68 p.

Elaboración



Elaboración

Marinaldo da Silva Valente/Suest/AM/**Funasa**

Colaboradores

Osman de Oliveira Lira/Suest/PE/**Funasa**

Nilce Bazzoli/Suest/MG/**Funasa**

Júlio César Reis da Silva/Suest/MA/**Funasa**

Raimundo Rodrigues dos Santos Filho/Suest/MA/**Funasa**

Miguel Crisóstomo Leite Brito/Densp/**Funasa**

Coordenación

Maria Fernanda Bittencourt/Densp/**Funasa**

Revisión técnica

Felizana M.M. da S. Palhano

Girleene Rodrigues Leite

Vilma Ramos Feitosa/Densp/**Funasa**

Marinaldo da Silva Valente/Suest-Am/**Funasa**

Revisión da 3ª Edición

Ana Maria Moreira Dias – Cocag/Desam/**Funasa**

Aristeu de Oliveira Junior – Cocag/Desam/**Funasa**

Antonio Carlo B. Brandão – Cocag/Desam/**Funasa**

Demétrius Brito Viana – Consultor OPAS/**Funasa**

Osman de Oliveira Lira – URCQA/Sesam/Suest-PE/**Funasa**

Revisión Ortográfica y Gramatical de la 3ª Edición

Leila Santos – Coesc/Gab/Presi/**Funasa**/MS

Revisión de la 4ª Edición y actualización

Ana Maria Moreira Dias – Cocag/Desam/**Funasa**

Aristeu de Oliveira Junior – Cocag/Desam/**Funasa**

Antonio Carlo B. Brandão – Cocag/Desam/**Funasa**
Demétrius Brito Viana – Consultor OPAS/**Funasa**
Osman de Oliveira Lira – URCQA/Sesam/Suest-PE/**Funasa**

Ilustración

Leonardo Ribeiro da Silva Terra/Coesc/Gab/Presi/**Funasa**

Proyecto gráfico y portada

Gláucia Elizabeth de Oliveira – Diedi/Coesc/Gab/**Funasa**

Diagramación

Eduardo dos Santos – Diedi/Coesc/Gab/Funasa

Revisión Ortográfica y Gramatical de la 1ª y 2ª Edición

Olinda Myrtes Bayma S. Melo – Coesc/Gab/Presi/**Funasa**/
MS

Revisión bibliográfica

Raquel Machado Santos –/Coesc/Gab/Presi/**Funasa**
Solange de Oliveira Jacinto –/Coesc/Gab/Presi/**Funasa**

"La publicación de este Manual ha sido financiada por el término de cooperación n° 38, firmado entre la FUNASA y la OPS/OMS".

