



DIRECCIÓN EJECUTIVA DE LA AUTORIDAD PARA EL MANEJO SUSTENTABLE DE LA CUENCA DEL LAGO DE ATITLÁN Y SU ENTORNO –AMSCLAE-, PANAJACHEL, SOLOLÁ 30 DE ENERO DE DOS MIL VEINTICINCO. -----

ASUNTO: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS DE LA AMSCLAE.

RESOLUCIÓN No.DE-08-2025.

CONSIDERANDO:

Que la Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca del Lago de Atitlán y su Entorno, tiene como fin específico planificar, coordinar y ejecutar las medidas y acciones que sean necesarias para conservar, preservar y resguardar el ecosistema del Lago de Atitlán y sus áreas circunvecinas. Que la Subdirección Técnica es el órgano de la Dirección Ejecutiva encargado de la dirección, coordinación y apoyo del equipo técnico, así como de la redacción y desarrollo de proyectos técnicos, responsable de asegurar el resultado económico, calidad y plazo de los proyectos redactados por el equipo a su cargo. Y que el Departamento de Investigación y Calidad Ambiental, es un órgano técnico operativo de la Subdirección Técnica, responsable de la investigación científica institucional del monitoreo permanente del lago, los recursos hídricos de la cuenca y el clima, así como de la calidad ambiental de la cuenca mediante la evaluación permanente del impacto ambiental de las diversas acciones que en ésta se desarrollan y de fomentar la gestión integrada de riesgos.

CONSIDERANDO:

Que mediante oficio identificado como Of. No. 074-2024/SDT-DICA/AMSCLAE/EMFRM/fmbo de fecha 26 de noviembre del año 2024 del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental, suscrito por la Encargada de Laboratorio, licenciada Flor Mayarí Barreno Ortiz; Jefe del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental, licenciada Elsa María de Fátima Reyes Morales, y con visto bueno de la Subdirectora Técnica Luz María Guevara Abauta, quienes trasladan a esta Dirección copia impresa del **“Manual de Procedimientos Analíticos”**, que está compuesto por los siguientes: **a)** Manual de Bioseguridad del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE; **b)** Manual de Calidad del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE; **c)** Manual de Manejo de Vales de Agua Desmineralizada del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE; **d)** Manual de Procedimientos Analíticos (Procedimientos Operacionales Estándares) del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE.

CONSIDERANDO:

Que la Subdirectora Técnica, ingeniera Luz María Guevara Abauta mediante Oficio Interno -17-2025/SDT/AMSCLAE/LMGA/aihu de fecha 28 de enero de 2025 trasladó a esta Dirección el DICTAMEN No. 02-2025/LMGA/lmga de la Subdirección Técnica de fecha 28 de enero de 2025 el cual emite dictamen favorable para la validación y autorización del **“Manual de Procedimientos Analíticos”** elaborado por el Departamento de Investigación y Calidad Ambiental -DICA- de la AMSCLAE.



CONSIDERANDO:

Que la Coordinación Ejecutiva mediante Acuerdo número CE-2-2024 de fecha 06 de diciembre del año 2024, contenido en el punto séptimo del acta de la Coordinación Ejecutiva número 6-2024, acordó: *"1) Aprobar por unanimidad que la Dirección Ejecutiva de la Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca del Lago de Atitlán y su Entorno –AMSCLAE- apruebe los Manuales Administrativos, de procedimientos, de Control Interno y manual de Organización y Funciones de la AMSCLAE..."*.

POR TANTO:

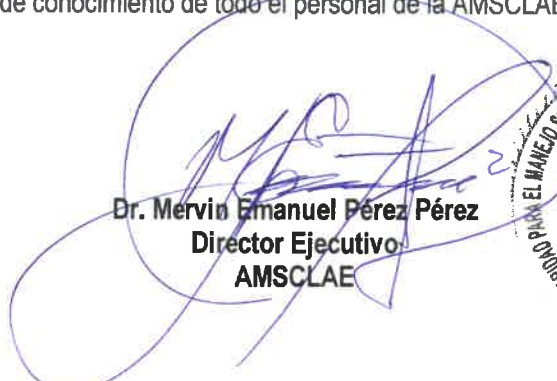
Con base en lo considerado y lo que para el efecto establece el artículo 8 literal c) del Acuerdo Gubernativo número 78-2012, Reglamento de la Ley de Creación de la AMSCLAE, Manual de Organización y Funciones de la AMSCLAE y Acuerdo número CE-2-2024, de fecha 06 de diciembre del año 2024, contenido en el punto séptimo del acta de la Coordinación Ejecutiva número 6-2024.

RESUELVE:

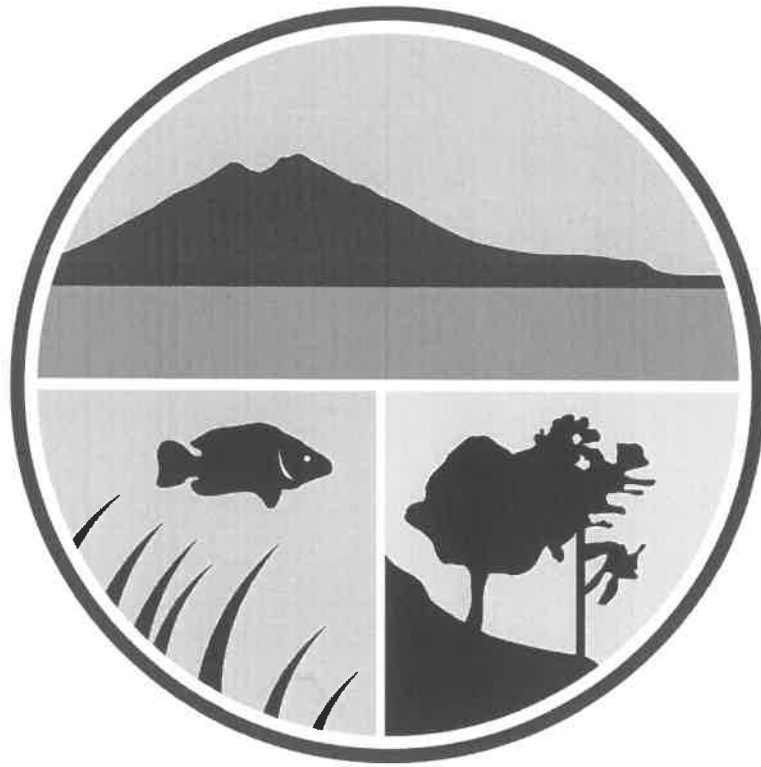
Artículo 1. APROBAR el "MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS", que está compuesto por los siguientes: a) Manual de Bioseguridad del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE; b) Manual de Calidad del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE; c) Manual de Manejo de Vales de Agua Desmineralizada del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE; d) Manual de Procedimientos Analíticos (Procedimientos Operacionales Estándares) del Laboratorio de Calidad de Agua del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental AMSCLAE.

Artículo 2. La presente resolución surte sus efectos inmediatamente.

Artículo 3. Notifíquese a la Subdirección Técnica, al Jefe del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental, y debe hacerse de conocimiento de todo el personal de la AMSCLAE



Dr. Mervin Emanuel Pérez Pérez
Director Ejecutivo
AMSCLAE






MANUAL DE
PROCEDIMIENTOS
ANÁLITICOS


ÍNDICE

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	Índice - 1 Versión: 1 Fecha: 04/02/2020 Página: 1 de 5
	INDICE DE DOCUMENTOS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

ID	NOMBRE	VERSIÓN	FECHA
MANUALES			
M-001	Manual de Bioseguridad	01	30/04/2019
M-002	Manual de Calidad del Laboratorio de Calidad de Agua	01	25/01/2019
M-003	Manual de Manejo de Vales de Agua Desmineralizada	01	26/11/2024
M-004	Manual de Procedimientos Analíticos (Procedimientos Operacionales Estándares (POE))	01	25/01/2019
PROCEDIMIENTOS OPERACIONALES ESTÁNDARES (POE)			
POE - 001	Seguridad de Viajes en Lancha	3	10/10/2016
POE - 002	Recolección y Preservación de Muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de Plancton	3	06/02/2017
POE - 003	Parámetros <i>In Situ</i>	3	08/02/2017
POE - 004	Seguridad en el Laboratorio	4	01/03/2017
POE - 005	Procedimiento de Lavado, Secado y Almacenamiento de Cristalería y Materiales	6	20/11/2018
POE - 006	Procesamiento de Muestras: Nutrientes y Clorofila a	2	09/02/2017
POE - 007	Análisis de Amonio	5	20/11/2018
POE - 008	Análisis de Nitratos y Nitritos	6	11/12/2018
POE - 009	Análisis de Fósforo Reactivo Soluble (Ortofosfatos)	6	20/11/2018
POE - 010	Fósforo Total	6	25/01/2019
POE - 011	Nitrógeno Total	3	21/02/2017
POE - 012	Análisis de Plancton	3	01/03/2017
POE - 013	Clorofila A	4	01/03/2017

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	Índice - 1 Versión: 1 Fecha: 04/02/2020 Página: 2 de 5
	INDICE DE DOCUMENTOS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

POE - 014	Recolección, Procesamiento y Análisis durante un florecimiento	4	14/11/2024
POE - 015	Calidad de Agua Mediante el Índice BMWP/Atitlán (macroinvertebrados Acuáticos)	1	31/03/2017
POE - 016	Análisis Microbiológico de Aguas: Fermentación en Tubos Múltiples	2	31/10/2018
POE - 017	Análisis Microbiológico de Aguas: Método Filtración por Membrana	2	31/10/2018
POE - 018	Recolección de Muestras para Análisis Microbiológico	1	11/12/2018
POE - 019	Registro de Muestras Ingresadas al Laboratorio	1	11/12/2018
POE - 020	Uso y limpieza de Autoclave	1	11/12/2018
POE - 021	Limpieza de Equipo de Filtración	1	11/12/2018
POE - 022	Uso de Baño Ultrasónico	1	11/12/2018
POE - 023	Procedimiento para la recolección y transporte de muestras de agua para consumo humano.	2	02/05/2019
POE - 024	Sólidos Totales, Sólidos totales en Suspensión, Sólidos fijos y volátiles incinerados	4	29/08/2024
POE - 025	Clorofila – a: Extracción con Etanol	2	14/03/2019
POE - 026	Recuento Aeróbico Total, Hongos y Actinomicetos mediante el método de vertido en placa	1	23/06/2019
POE - 027	Control de Calidad de Equipos	1	24/06/2019
POE - 28	Sólidos Sedimentables (SS)	1	11/02/2021
POE - 29	Grasas y aceites	1	25/04/2022
POE - 30	Cuantificación y viabilidad de huevos de helmintos en Lodos y Biosólidos	2	30/08/2024
POE - 31	Anatoxina a	2	11/02/2022

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	Índice - 1 Versión: 1 Fecha: 04/02/2020 Página: 3 de 5
	INDICE DE DOCUMENTOS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

POE - 32	Microcistina	2	24/08/2021
POE - 33	Saxitoxina	1	19/07/2021
POE - 34	Cuantificación y clasificación de microplásticos en agua y sedimentos	1	11/02/2022
POE - 35	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	1	30/11/2022
POE - 36	Identificación y cuantificación de microorganismos en lodos activados	1	04/07/2022

BOLETAS DE CAMPO

B - 1	Monitoreo de Calidad de Agua del Lago Atitlán	5	22/06/2020
B - 2	Monitoreo de Florecimientos de cianobacterias	2	27/09/2019
B - 3	Monitoreo de Calidad de Agua de Ríos	4	22/06/2020
B - 4	Monitoreo de Calidad de Agua de Ríos - dICA	3	24/06/2020
B - 5	Monitoreo de Caudales	2	01/10/2019
B - 6	Monitoreo Climático	2	01/10/2019
B - 7	Monitoreo del Nivel del lago	2	01/10/2019
B - 8	Monitoreo de Salubridad (Uso Recreacional)	2	25/09/2019
B - 9	Monitoreo de Salubridad (Consumo Humano)	2	26/09/2019
B - 10	Monitoreo de Vegetación Acuática	3	26/09/2019
B - 11	Monitoreo de Siembras de Tul	2	26/09/2019
B - 12	Monitoreo de Puntos de Contaminación	2	30/09/2019
B - 13	Muestreo de Planta de Tratamiento	2	27/09/2019
B - 14	Cadena de Custodia	2	07/10/2019



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
CALIDAD AMBIENTAL
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS

Índice - 1
Versión: 1
Fecha: 04/02/2020
Página: 4 de 5

INDICE DE DOCUMENTOS

Preparado por: F. Barreno
Revisado por: F. Reyes
Aprobado por: F. Reyes

FORMULARIOS REGISTRO DE USO DE EQUIPO

FRE - 001	Equipo de laboratorio	2	06/02/2020
FRE - 001B	Equipo de laboratorio	2	05/02/2021
FRE - 002	Equipo de campo	1	13/05/2020
FRE - 003	Otros equipos	1	13/05/2020
FRE - 004	Uso y llenado de tanques de buceo	1	15/04/2020

FORMULARIOS REGISTRO VARIOS

FRV - 001	Uso de reactivos líquidos	3	09/02/2021
FRV-002	Control de Temperatura	4	09/02/2021
FRV-003	Control de Material Autoclaveado	3	09/02/2021
FRV-004	Limpieza de equipos	2	09/02/2021
FRV-005	Cristalería quebrada	3	09/02/2021
FRV-006	Uso de Agua desmineralizada	1	26/11/2024

CUADERNOS DE LABORATORIO

C - RE.1	Registro de Ingreso al Laboratorio	1	05/2017 -
C - L.A.8	Limnológico (Microbiología y DBO)	8	03/2018 -
C - L.B.9	Limnológico (Nutrientes)	9	09/2020 - 05/2023
C - P.5	Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales	5	09/2020 -
C - R.4	Ríos (Ríos - Caudales)	4	02/2020 -
C - S.4	Salubridad (Consumo Humano y Recreacional)	4	03/2018 -
C - O.4	Otras Investigaciones e Inspecciones	4	10/2019 -
C - B.1	Biológico (Vegetación Acuática, Macros y Fitoplancton)	1	01/2016 -



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
CALIDAD AMBIENTAL
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS

Índice - 1
Versión: 1
Fecha: 04/02/2020
Página: 5 de 5

INDICE DE DOCUMENTOS

Preparado por: F. Barreno
Revisado por: F. Reyes
Aprobado por: F. Reyes

PLAN DE MANTENIMIENTO DE EQUIPOS

PM-001	Plan de Mantenimiento de Equipo de Laboratorio	1	31/03/2020
PM-002	Plan de Mantenimiento de Equipo de Campo	1	14/04/2020
PM-003	Plan Mantenimiento de Otros Equipos	1	31/03/2020

FORMULARIO DE REGISTRO MANTENIMIENTO DE EQUIPOS

FRM-001	Equipo de Laboratorio	1	31/03/2020
FRM-002	Equipo de Campo	2	16/01/2024
FRM-003	Otros Equipos	1	14/04/2020

MANUALES

**AUTORIDAD PARA EL MANEJO SUSTANTABLE DE LA CUENCA DEL LAGO
DE ATILÁN Y SU ENTORNO -AMSCLAE-
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL -DICA-
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA**




**MANUAL DE BIOSEGURIDAD DEL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA
DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
AMSCLAE**

AMSCLAE

Guatemala, abril 2019

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	3
2.	GLOSARIO	4
3.	NORMATIVAS APLICABLES	5
4.	BIOSEGURIDAD	5
4.1	Principios de bioseguridad.....	5
5.	LABORATORIO BÁSICO – NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2.....	5
5.1	Uso de barreras en el laboratorio de Calidad del Agua	6
5.1.1	Primarias:.....	6
5.1.2	Secundarias:.....	8
5.2	Manejo de desechos.....	9
5.2.1	Eliminación de desechos biológicos.....	9
5.2.2	Eliminación de desechos químicos.....	10
6.	SEGURIDAD QUÍMICA, ELÉCTRICA Y PROTECCION CONTRA INCENDIOS	11
7.	PLANES DE CONTIGENCIA Y PRODECIMIENTOS DE EMERGENCIA	12
7.1	Heridas punzantes, cortes y abrasiones	12
7.2	Rotura de recipientes y derrame de sustancias infecciosas.....	12
7.3	Derrame de sustancias químicas.....	12
7.4	Incendio	12
7.5	Terremoto	12
7.6	Uso de extintores	13
8.	REFERENCIAS	15

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 3 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. INTRODUCCIÓN


La bioseguridad abarca desde la infraestructura del laboratorio hasta el correcto descarte de la basura, es por ello que se realizó este manual, para saber cómo actuar dentro del laboratorio tomando las medidas de seguridad adecuadas, en diversos procesos.

La bioseguridad es universal, lo que indica que cada persona que ingresa al laboratorio debe cumplir con las normas de protección personal.

Se clasifico al laboratorio de Calidad de Agua de la AMSCLAE, en base a las funciones que cumple y las muestras que trabaja, por ello, el laboratorio de Calidad de Agua es nivel 2, lo que indica que se debe de cumplir con la infraestructura, equipo, protección personal, del nivel indicado para protección del personal que trabaja dentro, fuera del laboratorio y medio ambiente.

Para considerar bioseguridad en todos los aspectos en el laboratorio se debe conocer el correcto manejo de los desechos del laboratorio, para minimizar el impacto que estos puedan tener en el medio ambiente, y dar seguridad a los trabajadores que se encargan de su descarte.

Otro aspecto que se toma en consideración en el manual, son los peligros de incendio y catástrofes naturales o accidentes laborales, donde se indican las medidas que se deben tomar de precaución y como se actuar en cada una de las situaciones.

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 4 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

2. GLOSARIO

Deflagración: Explosión química, y la zona de reacción se propaga en el medio inicial por conductividad térmica ocasionando autoinflamación en sustancias o reactivos vecinos (Carmona, 2002).

Descontaminación: es la acción de esterilizar o destruir completamente los microorganismos incluyendo formas resistentes, como las esporas bacterianas (Fondecyt- CONICYT, 2018).

Campana de seguridad biológica: equipo diseñado para proteger al trabajador, la atmósfera del laboratorio y los materiales de trabajo de la exposición a las salpicaduras y los aerosoles infecciosos que pueden generarse al manipular material que contiene agentes infecciosos (OMS, 2005).

Consecuencia: efecto de un suceso que contempla además la gravedad del mismo (Instituto antártico chileno, 2012).


Evacuación: acción de desalojar una unidad, servicio o lugar donde ha ocurrido una emergencia (Instituto antártico chileno, 2012).

Peligro: fuente potencial de daño (Instituto antártico chileno, 2012).

Probabilidad: factibilidad que ocurra un suceso (Instituto antártico chileno, 2012).

Riesgo: probabilidad de ocurrencia de un suceso en la que interviene un peligro y genera una consecuencia (Instituto antártico chileno, 2012).

Zona de seguridad: lugar de refugio, temporal al aire libre. Debe de cumplir con características de seguridad para la vida de quienes lleguen a ese punto (Instituto antártico chileno, 2012).

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 5 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

3. NORMATIVAS APLICABLES

Acuerdo Gubernativo No. 509-2001. Reglamento para el Manejo de Desechos Sólidos Hospitalarios.

4. BIOSEGURIDAD

Conjunto de principios, normas técnicas y prácticas que deben aplicarse para la protección del individuo, la comunidad y el medio ambiente frente al contacto natural, accidental o deliberado con agentes potencialmente nocivos (Alonso, 2008).

4.1 Principios de bioseguridad

- **Universalidad:** las medidas son aplicables o deben involucrar a todas las áreas del laboratorio, y todo el personal del laboratorio.
- **Uso de barreras:** evita la exposición directa a agentes biológicos y muestras orgánicas potencialmente contaminados o de riesgo a la salud.
- **Medios de eliminación del material contaminado:** Procedimientos para el tratamiento y desecho de material de laboratorio para que se eliminen sin riesgo.
- **Evaluación de riesgos:** proceso en el cual se realiza un análisis de la probabilidad que ocurran daños, heridas o accidentes en el laboratorio, se debe de asociar con un plan de mitigación (Alonso, 2008).
- **Gestión de evaluación de riesgos:** Sistema o conjunto de procesos orientado a controlar los riesgos asociados a la manipulación, almacenamiento de agentes biológicos o reactivos en el laboratorio.

5. LABORATORIO BÁSICO – NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2

Los laboratorios se clasifican según el tipo de servicios que presta o microorganismo que trabaja, en:

Laboratorio básico o nivel de bioseguridad 1


Laboratorio básico o nivel de bioseguridad 2

Laboratorio de contención o nivel de bioseguridad 3

Laboratorio de contención máxima o nivel de bioseguridad 4

(Organización Mundial de la Salud, 2005).

El laboratorio de calidad de Agua, del departamento de Investigación y Calidad Ambiental, se encuentra en el nivel de bioseguridad 2, por lo tanto, se debe de considerar las medidas de bioseguridad para dicho nivel que a continuación se mencionarán.

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 6 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

5.1 Uso de barreras en el laboratorio de Calidad del Agua

5.1.1 Primarias:


Se consideran barreras primarias a los equipos de seguridad como cabina de seguridad biológica, recipientes cerrados, campana de extracción de gases y otros que eliminen o disminuyan las exposiciones a las muestras. También se consideran como barreras primarias a los equipos de protección personales como guantes, batas, zapatos antideslizantes y cerrados, máscaras, lente de protección, entre otras barreras primarias se encuentran los dispositivos de pipeteo automáticos, campana de seguridad biológica, la cual no es indispensable, pero al introducirse puede trabajarse diversas metodologías microbiológicas, diversidad de muestras con mayor seguridad y manipularse microorganismo de nivel II y frascos y tubos con tapón de rosca (Organización Mundial de la Salud, 2005).

En el siguiente cuadro se detallan los niveles de bioseguridad de los laboratorios y las medidas que deben de tomarse tanto de protección personal, como de equipo las cuales son barreras primarias

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas (Véase la parte IV del presente manual). CSB: cámara de seguridad biológica.

Recuperado de: Organización Mundial de la Salud, (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. Ginebra: OMS.

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 7 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Como se mencionó anteriormente, los equipos son barreras primarias, pero pueden llegar a ser considerados como riesgos sino se les manipula de la forma correcta, por lo tanto, se debe de tomar en consideración medidas de bioseguridad para su implementación en el laboratorio y de uso. Las cuales se mencionan a continuación, según el tipo de equipo:

Refrigeradores:

No se deben colocar en el pasillo u obstruyendo el paso

Ubicarse en zonas aisladas o no expuestas a humedad

Se deben de programar el mantenimiento y la limpieza reduciendo los riesgos asociados.

No utilizar un refrigerador para diversos fines, mezclando reactivos con medios de cultivos estériles, o muestras.

No almacenarse reactivos que contengan compuestos volátiles inflamables, que no posean protección antideflagración (Masías, 2013).

Estufa e incubadoras:

No se deben colocar en el pasillo u obstruyendo el paso

Ubicarse en zonas aisladas o no expuestas a humedad

Señalizar para prevenir quemaduras

Realizar limpieza, desinfección y control de forma periódica (Masías, 2013).

Autoclave:

No se deben colocar en el pasillo u obstruyendo el paso.

Ubicarse en zonas aisladas o no expuestas a humedad.

Señalizar para prevenir quemaduras

La liberación de vapor debe realizarse a un recipiente, no realizarse directamente al exterior

Conocer el fundamento del equipo antes de utilizar, para conocer cómo actuar ante algún accidente

Cambiar el agua regularmente

Realizar limpieza y mantenimiento periódicamente (Masías, 2013).

Centrífuga:


No se deben colocar en el pasillo u obstruyendo el paso.

Ubicarse en zonas aisladas o no expuestas a humedad.

El riesgo de contaminación con dicho equipo se debe a la producción de aerosoles que pueden ser potencialmente infeccioso. Por lo tanto, se debe de seguir las siguientes recomendaciones:

Abrir la centrífuga hasta que haya parado.

Se debe de equilibrar las muestras para el correcto funcionamiento

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 8 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

En caso de rotura de tubo dentro de centrífuga, se debe comunicar al encargado del laboratorio, y proceder a la desinfección necesaria. No abrir, dejar transcurrir de 10 a 15min. Proceder con la desinfección utilizando mascarilla, desechar restos punzocortantes en recipiente adecuado (Masías, 2013).

Microscopio:

Ubicarse en zonas aisladas o no expuestas a humedad.

Limpiar con algodón y alcohol etílico al 70% al dejar de utilizar.

No usar con maquillaje

No utilizar con guantes


Limpiar periódicamente los oculares y objetivos

5.1.2 Secundarias:

Las barreras de protección secundarias son las instalaciones, el diseño y la construcción del laboratorio ya que con esto se protege a quienes trabajan dentro de laboratorio como las personas que trabajan fuera del mismo (Centro de Control y Prevención de Enfermedades, s.f.)

Se enlistan algunas características que debe cumplir la infraestructura del laboratorio:

1. Espacio suficiente para realizar el trabajo de laboratorio, considerando siempre la seguridad, limpieza y mantenimiento de las instalaciones.
2. Paredes, techos y suelos, deben ser lisos, fáciles de limpiar, impermeables a los líquidos y resistentes a productos químicos y desinfectantes que se utilizan en el laboratorio. Con pisos antideslizantes.
3. Superficies de laboratorio deben ser impermeables y resistentes a desinfectantes, ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y calor moderado.
4. Poseer iluminación adecuada para todas las actividades.
5. Debe existir espacio entre mesas, armarios y otros muebles, así como por debajo de los mismos para facilitar la limpieza.
6. Estanterías adecuadas para el correcto almacenamiento de cristalería y materiales de uso, evitando la acumulación desordenada de materiales en mesas de trabajo o pasillos. Es conveniente poseer espacio para almacenamiento de equipos, materiales, y otros que sea de uso a largo plazo, situado fuera de las zonas de trabajo.
7. Se debe poseer espacio e instalaciones para la manipulación y el almacenamiento seguro de disolventes, reactivos inflamables.
8. Espacios para guardar ropa de calle, objetos personales, comer, beber y descansar se encontrarán fuera de las zonas de trabajo.
9. Poseer lava manos en el laboratorio.
10. Las puertas deben estar protegidas contra el fuego y cerrarse automáticamente.

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 9 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

11. Debe existir un botiquín de primeros auxilios, contra cualquier accidente que puede existir en el laboratorio.
12. Contar con sistema mecánico de ventilación que introduzca aire del exterior sin recirculación.
13. Disponerse de suministro de electricidad seguro y de suficiente capacidad, y sistema de iluminación de emergencia para alimentar equipo esencial como refrigeradora de reactivos, muestras y medios de cultivo, incubadora.
14. Instalación de suministro de gas adecuado y confiable y dar mantenimiento.
(Organización Mundial de la Salud, 2005).

5.2 Manejo de desechos

El manejo de los desechos del laboratorio debe ser una parte importante de seguridad, debido a que los desechos que se generan pueden estar contaminados por microorganismos o contener sustancias químicas tóxicas y peligrosas.

La mejor manera para ello es tener presente tres procesos: minimización, segregación y eliminación (Mostorino, et.al., 2005)

La clasificación de los residuos del laboratorio puede ser de la siguiente manera:

No peligrosos

Biodegradables, materia orgánica

Ordinarios e inertes: papel, cartón, empaque de reactivos entre otros.

Plástico reciclable: recipientes de reactivos

Peligrosos

Vidrios: portaobjetos rajados, quebrados, cubreobjetos, tubos etc.

Bioinfecciosos: Placas de medios de cultivos ya utilizadas.


(Universidad de San Buenaventura Cartagena, s.f.)

Se debe de separar los desechos, los que se clasifican como peligrosos deben de manejarse de forma específica como los vidrios, los cuales deben depositarse en recipientes específicos que sean resistentes a la punción y con un cierre seguro (Resino, 2011).

5.2.1 Eliminación de desechos biológicos

La descontaminación y eliminación de desechos y/o materiales son operaciones relacionadas debido a que la mayor parte de la cristalería, los instrumentos y la ropa del laboratorio vuelve a utilizarse o se recicla.

Lo principal es que todo material infeccioso debe ser descontaminado, previo a su descarte o lavado, por medio de esterilización en autoclave o incineración (OMS, 2005).

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 10 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Los residuos líquidos como en el caso de los caldos deben ser esterilizados en autoclave y seguido se pueden mezclar con hipoclorito de sodio y descartar en desagüe o almacenar y contratar a una empresa encargada del tratamiento de desechos.

Los desechos sólidos su tratamiento es mediante incineración y la esterilización por autoclave. Lo más apropiado es transferir los residuos a empresas autorizadas para el tratamiento de desechos infecciosos, colocándolos en bolsa roja (Resino, 2011).

5.2.2 Eliminación de desechos químicos

Los residuos químicos pueden poseer características diferentes y producirse en cantidades variables, y aspectos específicos del compuesto que van a incidir en la elección del procedimiento para su eliminación.

Factores

- Volumen generado
- Periodicidad de generación
- Facilidad de neutralización
- Posibilidad de recuperación, reciclado o reutilización.
- Coste del tratamiento y de otras alternativas
- Valoración del tiempo disponible


(Ministerio de Trabajo y Asuntos sociales España, 2019).

El último factor depende más de la cantidad de trabajo que entra al laboratorio, por lo tanto, se puede optar por una empresa especializada en eliminación de residuos.

Los residuos se deben almacenar en envases plásticos de 2.5 a 10 litros de capacidad no exceder los 30kg en peso, por seguridad al ser transportado y no colocar un envase sobre otro.

Se debe de demarcar una zona de residuos químicos en tránsito, la cual, no debe obstruir el paso o vías de evacuación, ser de fácil limpieza, adecuada ventilación y de superficie lisa (Fondecyt-CONICYT, 2018).

El traslado de residuos químicos se debe realizar cuando los recipientes hayan alcanzado $\frac{3}{4}$ de su capacidad, y se realiza hacia una zona de acopio institucional con la ayuda de personal asignado por el laboratorio, que conozca y porte el equipo de protección necesaria para esta actividad (Fondecyt-CONICYT, 2018).

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 11 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. SEGURIDAD QUÍMICA, ELÉCTRICA Y PROTECCION CONTRA INCENDIOS

Se debe contar con inventario actualizado de productos químicos, incluyendo las fichas de seguridad de todos ellos.

No se debe de colocar equipos o corrientes eléctricas cerca de fuentes de agua, agentes corrosivos o inflamables.

Al finalizar de trabajar se debe de recoger el material, reactivos, desconectar aparatos eléctricos y cerrar las conexiones a gas, evitando así acumulación de materiales e incendios.

Evitar la exposición directa a toda sustancia química presente en el laboratorio

Evitar contacto con la piel y mucosas, protegiendo manos, cara y ojos, adecuadamente

Evitar la inhalación de humos o vapores químicos, usando campana de extracción/mascarillas, según particularidad del agente químico

Limitar el acceso al laboratorio al personal autorizado durante la realización de análisis o manipulación de sustancias químicas

Mantener y dar mantenimiento a todo el equipo de emergencia al menos una vez al año

No obstruir salidas de emergencia o acceso a equipo de seguridad


Rotular los depósitos de sustancias químicas

Las sustancias químicas de alto riesgo se deben de almacenar en un lugar aislado y bien ventilado, que sea adecuado para el compuesto que en él se mantenga.

Separar los productos químicos considerando los riesgos que presentan.

Contar con estanterías con estructuras que eviten el desplazamiento de envases o botellas en situaciones de sismos.

(Fondecyt-CONICYT, 2018).

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 12 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

7. PLANES DE CONTIGENCIA Y PRODECIMIENTOS DE EMERGENCIA

7.1 Heridas punzantes, cortes y abrasiones

Se deberá informar a encargada de laboratorio o acompañante en el laboratorio.
 Proceder a quitarse la ropa protectora, lavarse las manos y parte lesionada.
 Aplicarse desinfectante cutáneo apropiado y buscar la atención médica necesaria.

7.2 Rotura de recipientes y derrame de sustancias infecciosas

Colocarse guantes y mascarilla si fuera necesario.
 Se debe cubrir con paños o papel absorbente el derrame.
 Verter desinfectante, cloro al 5%, dejar actuar entre 15 a 20 minutos.
 Recoger el paño o papel junto con material roto, el vidrio será manipulado con pinzas.
 Limpiar con desinfectante.
 El papel deberá descartarse con materiales contaminados, y el vidrio donde corresponde.

7.3 Derrame de sustancias químicas

Se debe de actuar rápidamente para la neutralización, absorción y eliminación.
 Se usará equipo de protección, como: lentes, guantes y mascarilla, según lo amerite (OMS, 2005).


7.4 Incendio

Se debe atender según el tipo de fuego presente.
 Si existe posibilidad de extinguir el fuego, debe de buscarse el extintor adecuado, evaluar la necesidad de cortar la electricidad en los sectores necesarios.
 Situarse entre la puesta de salida y el fuego.
 Atacar el fuego dirigiendo el extintor a la base del fuego.
 Si no, es posible extinguir el fuego; se debe de dar aviso al encargado de emergencia, para que se active el plan de evacuación.
 Se debe dar alarma a los bomberos (Instituto antártico chileno, 2012).

7.5 Terremoto

Durante:
 Mantener la calma
 Desconectar cualquier aparato eléctrico
 Mantenerse en un lugar seguro como: bajo las mesas de trabajo.
 Alejarse de ventanas, puertas de vidrio, cristalería que pueda caerse, lejos de sustancias químicas.
 No salir corriendo, no usar escaleras.

Después:
 Examinar si posee heridas, atenderlas.

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 13 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Verificar el perímetro, si existen personas heridas, atenderlas.

Notificar o pedir auxilio si se requiere.

Verificar daños en la infraestructura, para evacuar y llegar a la zona de seguridad.

Sintonizar radio para instrucciones y noticias.

(Instituto antártico chileno, 2012)

7.6 Uso de extintores

Puesta en funcionamiento

Descolgar extintor

Trasladarlo sin quitar el anillo de seguridad

Ubicarse entre el fuego y la puerta de salida, parado de forma segura guardando la distancia de alcance del extintor

Quitar anillo de seguridad

Accionar el mecanismo de disparo dirigiendo el chorro hacia la base de la llama sin acercarse.


Al estar extinguido el fuego, permanecer atento uno minutos, si vuelve a encenderse.

(Instituto antártico chileno, 2012).



Recuperado de:

http://www.extintoresmalaga.cl/wpcontent/uploads/2016/06/normas_uso_extintores.jpg

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA- Departamento de Investigación y Calidad Ambiental - DICA-	M-001 Fecha: 30/04/2019 Página 15 de 15
	MANUAL DE BIOSEGURIDAD	Elaborado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

8. REFERENCIAS

- Alonso, M.M. (2008). Elaboración del Manual de Bioseguridad y Documentación de los procedimientos operativos estándar e instructivos del laboratorio de Bacteriología especializada de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de grado Licenciatura. Bogotá: Universidad Javeriana.
- Carmona, F. (2002). *Transporte de mercancías peligrosas: explosivos*. Madrid: Diaz de Santos.
- Centro de Control y Prevención de Enfermedades, (s.f.). *Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina*. EE.UU.: CDC, NIH.
- Fondecyt-CONICYT (2018). *Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados*. Chile: CONICYT.
- Instituto antártico chileno, (2012). Plan de Emergencia y Evacuación para el Edificio de Laboratorios Científicos Embajador Jorge Berguño Barnes. Chile: PEE-LAB
- Masías, J. (2013). *Manual de bioseguridad de Laboratorio Clínico*. Recuperado de: http://www.hsjd.cl/Intranet/Calidad/Servicios%20de%20Apoyo/APL-1/1.5/Manual%20de%20Bioseguridad%20de%20Laboratorio%20Clinico_3.pdf
- Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España, (2019). Eliminación de residuos en el laboratorio: procedimientos generales. Recuperado de: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_276.pdf
- Mostorino, R.M. et. Al. (2005). *Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, biomédicos y Clínicos*. Recuperado de: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/normatividad/norref/MAN-INS-001%20Ed03%20BIOSEGURIDAD_%20IIL%2016_08_05.pdf
- Organización Mundial de la Salud, (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. Ginebra: OMS.
- Resino, S. (2011). Gestión de los residuos en el laboratorio de microbiología clínica. *Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas*
- Universidad de San Buenaventura Cartagena. (s.f.). Guía de Seguridad y Bioseguridad. Recuperado de: http://www.usbcartagena.edu.co/phocadownload/facultades/salud/GUIA_SEGURIDAD_Y_BIOSEGURIDAD.pdf



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD
AMBIENTAL


LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA

MANUAL DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL

AMSCLAE

Norma ISO/IEC 17025:2005-05-15

25 de enero 2019

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	M - 002 Versión: 1 Fecha: 25/01/2019 Página: 2 de 5
	MANUAL DE CALIDAD DE AGUAS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes


1. Introducción

El lago Atilán representa uno de los recursos naturales más valiosos y populares del país, debido a su paisaje, cultura, uso recreacional, consumo humano, es un atractivo turístico y fuente de beneficios a la población. Prácticamente toda la cuenca hidrográfica del lago Atilán se encuentra en 15 de los 19 municipios del departamento de Sololá.

En 1994, ante el vacío por la ausencia de autoridades ambientales en Sololá, se desarrolla la iniciativa de ley para crear la Autoridad de Manejo Sustentable del Lago Atilán y su Entorno (AMSCLAE). En noviembre de 1996 es aprobada por el Congreso de la República como el Decreto 133-96 “ley de creación de la AMSCLAE”, su reglamento se emite según Acuerdo Gubernativo No. 78-2012. La AMSCLAE está facultada para planificar, coordinar y ejecutar en coordinación con las instituciones del sector público y privado, todas las acciones que permitan conservar, preservar y resguardar los ecosistemas de la cuenca del Lago de Atilán, busca sustentar sus decisiones en información científica que permita el desarrollo de políticas y planificación hacia el uso y manejo sustentable del Lago Atilán y los recursos en su cuenca hidrográfica.

Según el artículo 13 del Reglamento de la AMSCLAE (Acuerdo Gubernativo 78-2012) el Departamento de Investigación y Calidad Ambiental -DICA-, es un órgano técnico operativo, responsable de la investigación científica institucional, del monitoreo permanente del lago, los recursos hídricos de la cuenca y el clima, así como de la calidad ambiental en la cuenca mediante la evaluación permanente del impacto ambiental de las diversas acciones que en ésta se desarrollan y de fomentar la gestión integrada de riesgos.

La investigación científica es fundamental para el mejor conocimiento de los fenómenos que ocurren en la cuenca y especialmente en el Lago de Atilán, lo cual es de suma importancia para generar información que sirva de base para establecer programas de manejo, planes de monitoreo y otros para la toma adecuada de decisiones, pertinentes a la promoción, planificación y ejecución de actividades relacionadas a la conservación y buen manejo del recurso hídrico, para resguardar y proteger la cuenca y el lago de Atilán. Actualmente se cuenta con programas de Investigación científica y un laboratorio de calidad de aguas en funcionamiento permanente y en crecimiento.

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	M - 002 Versión: 1 Fecha: 25/01/2019 Página: 3 de 5
	MANUAL DE CALIDAD DE AGUAS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

2. El Laboratorio de Calidad de Aguas de DICA

En el año 2010, se inicia el laboratorio con poco equipo y adaptado a un garaje en una vivienda. Durante los años 2011 a 2016, el laboratorio se trasladó a nuevas instalaciones, donde el laboratorio cuenta con un área aproximada de 7.73 m X 5.20 m, a finales del 2016, el laboratorio sufre de nuevo un traslado, actualmente se encuentra ubicado en un 3er nivel, cuenta con un área de 65.52 m², las instalaciones sufrieron remodelación para poder adaptarlas al equipo y mobiliario con el que se cuenta.


Actualmente se cuenta con instrumentos para el análisis de muestras de agua, el personal está capacitado para la operación de los equipos, los procedimientos están en desarrollo, con meta a un futuro poder acreditar los mismos. Se han implementado las buenas prácticas de laboratorio y todos los análisis se realizan bajo estrictas normas de aseguramiento analítico de la calidad la necesidad de asegurar la confiabilidad de los resultados analíticos que comprueban el cumplimiento de los límites de control.

Se busca llevar al Laboratorio de Calidad de Aguas de la AMSCLAE a establecer el sistema de gestión de calidad basado en la Norma ISO/IEC 17025, de forma que se garantice la confiabilidad en los resultados de los análisis, y ser utilizados en la toma de decisiones.

En el laboratorio de Calidad de Aguas de la AMSCLAE se genera información analítica que sirve como evidencia técnica.

Entre algunas de las tareas que desarrolla el laboratorio, y que contribuyen a la toma de decisiones son:


- a) Verificación de la calidad del recurso hídrico y descarga de aguas residuales, ante situaciones de contaminación ambiental, así como el cumplimiento de las normas y límites máximos permisibles.
- b) Proveer información analítica necesaria para la implementación de planes de descontaminación y delimitación de zonas ambientales críticas.
- c) Mantener registros actualizados de los resultados de análisis de la calidad del recurso hídrico y la descarga de aguas residuales.
- d) Apoyar a las municipalidades de la cuenca en el análisis de las descargas de aguas residuales de las Plantas de Tratamiento.

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	M - 002 Versión: 1 Fecha: 25/01/2019 Página: 4 de 5
	MANUAL DE CALIDAD DE AGUAS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

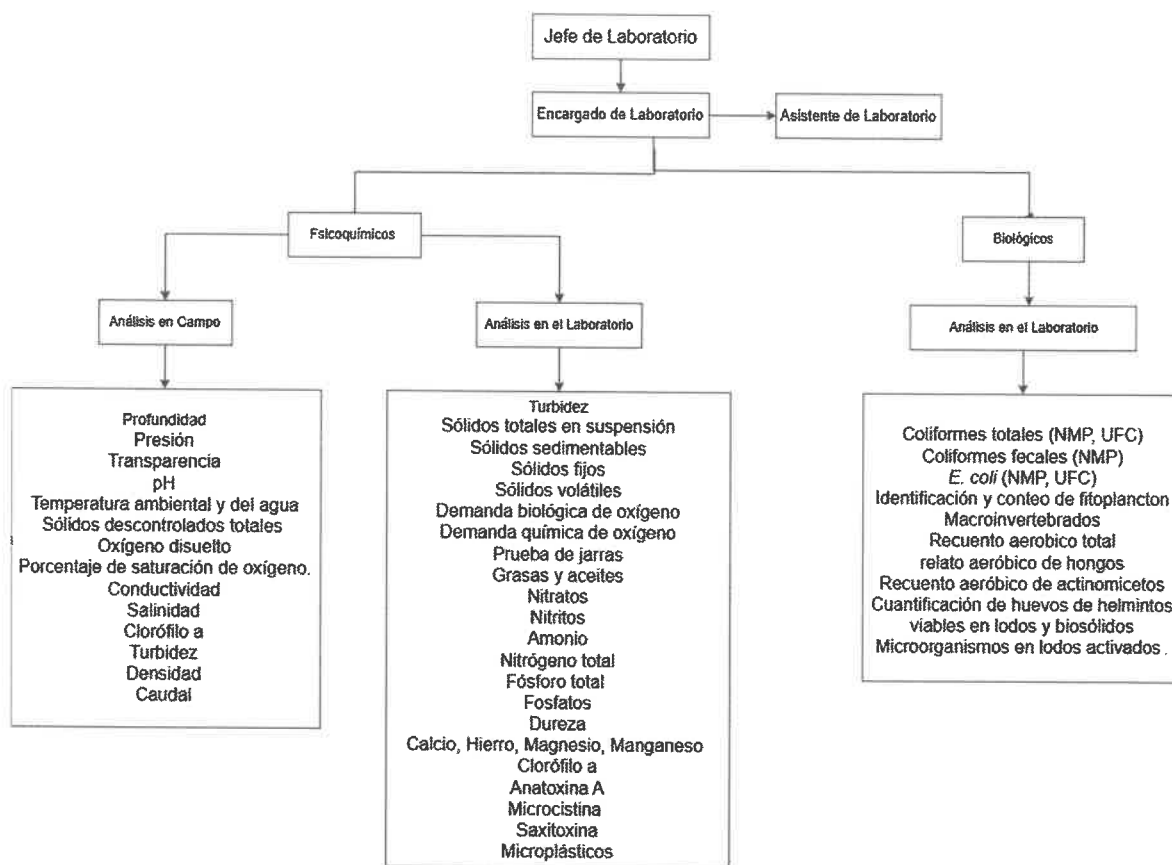
- e) Apoyo en el análisis de muestras de agua en alguna inspección de descarga de aguas residuales.
- f) Coordinación y cooperación con otros laboratorios de análisis de agua de la cuenca, que permita la continua actualización y retroalimentación de información.
- g) Desarrollar programas de monitoreo de calidad del agua, como apoyo al Departamento de Investigación y Calidad Ambiental.
- h) Apoyar en diferentes los programas de investigación científica, ya sea nacional e internacional, en temas relacionados con el monitoreo de la calidad del agua.
- i) Mantener un sistema de aseguramiento y control de calidad para garantizar una confiabilidad en los resultados de los análisis realizados.

Entre los principales parámetros que se evalúan son los siguiente: Microbiológicos (UFC y NMP en 100 mL), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Ortofosfatos (PO₄-3), Fósforo total (PT), Nitratos (NO₃), Amonio (NH₄), Nitrógeno Total (NT), , sólidos suspendidos totales, turbidez, color verdadero y aparente, clorofila a, también se identifica y cuantifica fitoplancton, entre otros. Todos los análisis se realizan con base en las metodologías de análisis de Calidad de Agua de los Métodos Estandarizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. (APHA-AWWA-WPCF, 1992)

Responsable: Encargado de Laboratorio y Asistente de Laboratorio

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	M - 002 Versión: 1 Fecha: 25/01/2019 Página: 5 de 5
	MANUAL DE CALIDAD DE AGUAS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

3. Flujograma



4. Bibliografía

APHA-AWWA-WPCF. (1992). *Métodos Normalizados: para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid, España: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.




DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD
AMBIENTAL

LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA

Manual de Manejo de vales de Agua Desmineralizada del Laboratorio de Calidad de Agua del
Departamento de Investigación y Calidad Ambiental

AMSCLAE

26 de noviembre 2024

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	M – 003 Versión: 1 Fecha: 26/11/2024 Página: 2 de 4
	MANUAL DE MANEJO DE VALES DE AGUA DESMINERALIZADA	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

1. Introducción

El presente manual tiene como objetivo normar el manejo de vales de agua desmineralizada por medio de vales, para el cumplimiento de los diferentes análisis de calidad de agua que se llevan a cabo en el Laboratorio de Calidad de Aguas del departamento de Investigación y Calidad Ambiental.


2. Responsabilidades

2.1 Jefe del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental

- Realizar las gestiones para la compra de vales de agua desmineralizada.
- Llevar el control de los cupones de agua desmineralizada en el libro autorizado por la Contraloría General de Cuentas y mantenerlo actualizado.

2.2 Encargado de Laboratorio


- Realizar la solicitud al Jefe del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental la cantidad de vales de agua desmineralizada anual con el efecto de contar con disponibilidad de la misma.
- Verificar el diseño de los vales que como mínimo debe de contener la siguiente información (Anexo 1):
 - Logotipo de empresa
 - Logotipo de Amsclae
 - Valor del vale en quetzales
 - Correlativo del vale
 - Fecha de uso del vale
 - Firma y sello de autorización del vale
- Es responsable de firmar los vales
- Es responsable del resguardo de los vales de agua desmineralizada

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	M – 003 Versión: 1 Fecha: 26/11/2024 Página: 3 de 4
	MANUAL DE MANEJO DE VALES DE AGUA DESMINERALIZADA	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

- Es responsable de llevar un registro exacto y control de los vales de agua desmineralizada en libros y formularios de manejo de los vales de agua desmineralizada u otro método verificable (anexo 2)
- Llevar cualquier otro registro de control que considere necesario.

3. Manejo y control de vales

- Los vales serán solicitados por la encargada de laboratorio a la unidad de almacén a través de una solicitud.
- Los vales de agua desmineralizada serán manejados por el encargado de laboratorio.
- El consumo de agua desmineralizada debe de ser congruente a la cantidad de análisis que se realicen por mes en el laboratorio.
- El manejo de los vales de agua desmineralizado deberá de registrarse en el libro autorizado por la Contraloría de cuentas.
- El manejo de los vales de agua desmineralizado deberá de registrarse en el formulario de uso de agua desmineralizada (Anexo 2).

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	M – 003 Versión: 1 Fecha: 26/11/2024 Página: 4 de 4
	MANUAL DE MANEJO DE VALES DE AGUA DESMINERALIZADA	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

4. Anexos

4.1 Anexo 1 Vale de agua desmineralizada



4.2 Anexo 2 Formulario de Control de Manejo de Agua desmineralizada






DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD
AMBIENTAL

LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA

**Manual de Procedimientos Analíticos
(Procedimientos Operacionales Estándares)
del Laboratorio de Calidad de Aguas del
Departamento de Investigación y Calidad
Ambiental**

25 de enero 2019

**PROCEDIMIENTOS
OPERACIONALES
ESTÁNDARES**

	Procedimiento Operacional Estándar SEGURIDAD DE VIAJES EN LANCHAS	POE - 1 Versión: 3 Fecha: 10/10/2016 Página: 1 de 6 Preparado por: M. Orozco Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix
--	--	--

1. Propósito

El propósito de este procedimiento es detallar las medidas de seguridad y el comportamiento que se deben observar durante los viajes de colección de muestras de agua o actividades en lagos.

2. Aplicación

Todas las personas que realicen actividades de campo (visitas, talleres, proyectos, investigaciones) que requieran el uso y movilización en lanchas.

3. Referencias

Reglamento para viajes de campo para catedráticos, estudiantes, tesisistas e investigadores de la UVG.

4. Documentos asociados

Hoja de Recomendaciones y Compromisos.

Formulario Médico.




5. Seguridad

Todos los asistentes al viaje de campo deberán estar asegurados.

Todos los asistentes deben haber firmado la "Hoja de Recomendaciones y Compromisos".

Los participantes y estudiantes deberán acatar las normas de conducta siguientes:

- De ser posible deberá de trabajar en parejas y evitar estar solos.
- No se permite el consumo de alcohol, drogas ilegales y/o estupefacientes, fumar en la lancha ni durante la actividad.
- Utilizar vestuario adecuado: zapatos cerrados bajos, pantalones largos, camisas con mangas largas, cabello recogido, no usar joyería, u otra ropa adecuada según el tipo de trabajo.
- Los participantes deberán estar en buena condición de salud y no encontrarse bajo efectos de cualquier medicamento, droga o bebida alcohólica que pueda disminuir su capacidad de concentración y que ponga en riesgo su salud.
- Antes de operar cualquier equipo el participante debe estar seguro que sabe cuál es el funcionamiento adecuado. En caso que no esté seguro, es su responsabilidad preguntar al encargado.
- En los viajes de campo en ambientes acuáticos, es requisito indispensable, el uso de chalecos salvavidas.
- Todo participante deberá informar al encargado si sabe o no nadar.

		Procedimiento Operacional Estándar	POE - 1 Versión: 3 Fecha: 10/10/2016 Página: 2 de 6
		SEGURIDAD DE VIAJES EN LANCHAS	Preparado por: M. Orozco Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

Conducta en lanchas:

- No exceder la capacidad de carga segura de la lancha.
- Utilizar chalecos salvavidas durante toda la actividad.
- Moverse tranquilamente y mantener el peso distribuido equilibradamente.
- Seguir inmediatamente las instrucciones del capitán del barco o el instructor.
- No salir de noche sin un permiso específico y que sea absolutamente necesario. Evaluar si se puede realizar el trabajo por tierra.
- No salir en horas de viento, parar la actividad si se levanta viento. Seguir trabajando representa un riesgo para la persona y sus acompañantes y el equipo que está siendo usado.
- De ser posible realizar trabajos cerca de la orilla.
- Prestar atención a las recomendaciones de la gente local sobre los riesgos potenciales del sitio.
- Asegurar que no haya cuerdas sueltas.
- En caso de encontrarse en una lancha a punto de hundirse, quitarse zapatos, cuerdas, monedas, cualquier cosa pesada y dejarlo en la lancha. Reconocer que hay artículos además del chaleco salvavidas que permite la flotación, como una hielera, botes, tanque de combustible. No saltar del barco, si no sumergirse suavemente y flotar. Mantener la calma y seguir las instrucciones del capitán de la lancha y de los facilitadores del curso.

6. Materiales y Equipo

Salvavidas.

Botiquín de primeros auxilios.

Listado de contactos de emergencia.




7. Procedimiento

El encargado de la actividad (denominado: el/la responsable) debe dejar en la dirección ó coordinación el formato de liberación de responsabilidades, el cual tiene una lista de los participantes y sus contactos.

El responsable o una persona delegada por él, preparará todo el material y equipo necesario para el viaje de campo y se encargará de que sea llevado. El responsable del proyecto o la persona encargada (así nombrado) es el responsable del material y equipo; al regresar del viaje de campo debe entregarlo al lugar correspondiente.

En todo viaje de campo un instructor autorizado debe acompañar durante todo el viaje al grupo de trabajo.

8. Accidentes

  	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 1 Versión: 3 Fecha: 10/10/2016 Página: 3 de 6
	SEGURIDAD DE VIAJES EN LANCHA	Preparado por: M. Orozco Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

De acuerdo al tipo de accidente, se deberá proceder lo más pronto posible para brindar la atención médica necesaria al herido, bajo las instrucciones del encargado de la actividad.

Accidentes leves: serán todos aquellos que no representen un riesgo para la vida de la persona y que podrán ser atendidos por el catadrático, entre ellos puede mencionarse; cortaduras leves, quemaduras leves, etc.

Accidentes graves: serán todos aquellos en los que se encuentra en riesgo la vida de la persona (infarto, derrame, heridas causadas por arma, golpes o caídas fuertes, etc.).

En caso de presentarse alguna emergencia a cualquier participante durante el viaje de campo, será responsabilidad del encargado informar de inmediato a las autoridades competentes del lugar.

Número de Teléfono Central de Bomberos	122
Bomberos Voluntarios Sololá	77624084
Bomberos Vol. Panajachel	77622759
Bomberos Vol. Santiago Atitlán	77217111
Bomberos Vol. San Andrés Semetabaj	77221840
Bomberos Vol. Aldea Los Encuentros	52473004
Bomberos Vol. San Juan La Laguna	41483121
Hospital Nacional Sololá	77624121/22
Policía Nacional Civil Sololá	77624000
Base Naval	77620931
AMSCLAE	79616464
Universidad del Valle, campus Altiplano	79310814

9. Responsabilidades

9.1 Botiquín

Es responsabilidad del (la) encargado (a) de la actividad proporcionar un botiquín de primeros auxilios para llevar a cada viaje de campo. Dicho botiquín debe contener por lo menos:

5 pares de guantes quirúrgicos descartables, 3 rollos de esparadrapo de 3 pulgadas, 5 toallas sanitarias (apósitos), 1 rollo de gasa, 1 paquete pequeño de hisopos, 1 rollo de micropore de ½", 2 bolsitas pequeñas de algodón, 1 paquete pequeño de curitas, 5 sobres de suero de rehidratación oral, 1 blíster de Nauseol, 1 blíster de ibuprofeno, 1 blíster de antihistamínicos, 6 onzas de jabón anti-bacterial gel, 1 paquete de toallitas húmedas, 1 rollo de papel higiénico, 100cc de alcohol, 50cc de agua oxigenada, 1 litro de agua potable.

En el botiquín también se encontrarán los teléfonos importantes para informar de cualquier emergencia. El encargado será el responsable del botiquín.


	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 1 Versión: 3 Fecha: 10/10/2016 Página: 4 de 6
	SEGURIDAD DE VIAJES EN LANCHA	Preparado por: M. Orozco Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

9.2 Registro de participantes

Se debe tener un registro de los participantes y encargados de la actividad que incluya los datos generales y médicos actualizados, desglosados, que se requerirían en cualquier emergencia (tipo de sangre, alergias, cirugías, si toma medicamentos, padecimiento de alguna enfermedad, estado de salud en general, condiciones especiales, saber nadar o no, licencia de conducir, fobias), números telefónicos y nombre de las personas que pueden ser notificadas en caso de emergencia.


9.3 Responsabilidades del encargado de la actividad

- El responsable deberá presentarse en el sitio y a la hora programada para la salida, en caso contrario se suspenderá la práctica.
- Asegurarse de que se tengan a la mano teléfonos celulares o radios que les permitan la comunicación.
- Llevar botiquín de primeros auxilios.
- Dar a conocer a los participantes el presente reglamento antes del inicio de la actividad.
- Deberá tener durante el viaje de campo los teléfonos importantes para informar de cualquier emergencia.
- Realizar cualquier actividad o trámite anterior necesario para la realización adecuada del viaje de campo, así como lo que sea necesario durante el viaje.
- Respetar el horario de salida y de entrada de los viajes de campo. Así como el número de personas máximo que pueden viajar en una lancha.
- Conocer y comunicar a los participantes las sanciones a las que se harán acreedores en caso de incurrir en faltas durante el viaje.
- Informar a los participantes de aquellas prácticas que involucren actividades o trabajo en zonas de alto riesgo, de las posibles eventualidades que pudieran presentarse.
- Cuidar en todo momento que los participantes no realicen actividades que pongan en riesgo su integridad física.
- Ser responsable de la toma de decisiones y acciones necesarias en caso de descomposturas del transporte, accidentes o cualquier incidente que se suscite.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 1 Versión: 3 Fecha: 10/10/2016 Página: 5 de 6
	SEGURIDAD DE VIAJES EN LANCHAS	Preparado por: M. Orozco Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

9.4 Responsabilidad de los participantes

- Asistir puntualmente al lugar de la salida del viaje de campo.
- Llevar consigo un documento de identificación (DPI, cédula o partida de nacimiento).
- Respetar los horarios establecidos durante el viaje de campo y no retrasar las actividades.
- Permanecer durante todo el viaje de campo con el grupo. Bajo ninguna circunstancia, un participante podrá quedarse en sitios distintos a los establecidos en el viaje de campo.
- Respetar estrictamente los reglamentos de las instituciones y organizaciones a las que visitarán durante el viaje de campo.
- Respetar y cuidar los vehículos de transporte en los que se trasladen.
- Respetar las indicaciones y decisiones que tome el responsable del viaje de campo y acatar las resoluciones de problemas derivados de cualquier incidente.
- Utilizar adecuadamente y cuidar el material y el equipo.
- Abstenerse de ingerir bebidas alcohólicas, consumir estupefacientes o psicotrópicos, o fumar en los vehículos, alojamiento, campamento y áreas de trabajo.
- En caso de causar un daño material el responsable deberá cubrir los gastos que se generen.
- Es responsabilidad del participante llenar el formulario médico para informar a los encargados de su tipo de sangre, alergias que padece, medicamentos que toma, y condiciones especiales.

	<p>Procedimiento Operacional Estándar</p> <p>RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS: ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y CONTEO DE PLANCTON</p>	<p>POE - 2 Versión: 3 Fecha: 06/02/2017 Página: 1 de 7 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix</p>
---	---	--

1. Propósito

Recolectar muestras de agua y biológicas, preservación y almacenamiento para análisis posterior (físicoquímicos y conteo de plancton).

2. Aplicación

Estos procedimientos son para el muestreo de agua superficial y profunda en lagos y ríos. Los métodos de preservación están diseñados para realizar posteriormente análisis físicoquímicos (nutrientes, pH, conductividad, demanda biológica de oxígeno u otros análisis) y conteo de plancton.

3. Principio


La recolección de muestras de agua y su preservación para su posterior análisis es fundamental en el estudio limnológico. Una incorrecta técnica de recolección de muestras puede alterar el resultado en análisis físicoquímicos y biológicos.

4. Referencias

1. Wetzel, R. G. & G, E. Likens 2000. Limnological Analyses. New York, NY. Springer.
2. Eaton, A. D. et al. (eds.). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2005.
3. UVG. 2010. Métodos de Análisis, Laboratorio de Análisis y Monitoreo, Centros de Estudios Atitlán, Universidad del Valle de Guatemala Altiplano.

5. Documentos asociados

1. Seguridad en viajes en lancha POE - 1
2. Seguridad en el laboratorio POE - 4
3. Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería y materiales POE - 5
4. Procesamiento de muestras POE - 6
5. Análisis de nitratos/nitritos POE - 7
6. Análisis de amonio POE - 8
7. Análisis de fósforo reactivo soluble (ortofosfatos) POE - 9
8. Análisis de fósforo total POE - 10
9. Análisis de nitrógeno total POE - 11
10. Análisis de plancton POE - 12
11. Análisis de clorofila a POE - 13

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 2 Versión: 3 Fecha: 06/02/2017 Página: 4 de 7
	RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS: ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS Y CONTEO DE PLANCTON	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

10.1 Etiquetado y rotulación de recipientes para muestras

Antes de salir a campo se recomienda etiquetar y rotular los recipientes que se utilizarán para coleccionar las muestras.

La identificación de cada sitio debe ser única y corresponder a la boleta de campo.

Es recomendable el uso de doble etiqueta: una etiqueta con cinta adhesiva y otra con marcador permanente en cada botella de muestreo.

La codificación e identificación de cada sitio muestreado queda a discreción de los interesados, sin embargo, existe información básica que cualquier etiqueta debería incluir: fecha de muestreo, profundidad de muestreo y tipo de preservante utilizado (si aplica).

Una correcta identificación de muestras es el primer paso para la construcción de una base de datos confiable.

10.2 Muestreo con la botella van Dorn


1. Abrir las tapas de la botella van Dorn como corresponda según sea el modelo del equipo.
2. Sumergir la botella a la profundidad que desea muestrear (la cuerda debe estar marcada al menos a las profundidades que desea muestrear). Antes de iniciar a sumergir la botella, asegúrese que las tapas no estén obstruidas por la cuerda, que el mensajero (peso que se envía, guiado por la cuerda, a la botella para activar el mecanismo de cerrado) permanezca en su poder y que la botella esté bien anudada a la cuerda.
3. Enviar el mensajero y esperar hasta que llegue a la botella y se active el dispositivo de seguridad y se cierren las tapas.
4. Regresar la botella a superficie y extraiga su muestra.

Nota: La primera botella que debe llenar es la DBO, seguido de la muestra para nutrientes y, por último, las botellas para conteo de plancton u otros análisis que desee realizar.

10.3 Llenado de botella para DBO

La preservación para DBO se realiza en botellas de vidrio con tapón esmerilado, aproximadamente a temperatura ambiente de la muestra, en completa oscuridad.

1. Insertar la manguera de hule en la llave de la botella van Dorn.
2. Con el agua que sale de la manguera, enjuagar la botella DBO un par de veces.

	Procedimiento Operacional Estándar RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS: ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS Y CONTEO DE PLANCTON	POE - 2 Versión: 3 Fecha: 06/02/2017 Página: 5 de 7 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix
---	--	---

3. Introducir la manguera hasta el fondo de la botella DBO y dejar llenar hasta que rebalse. Asegurar que no haya burbujas de aire en la manguera. Dejar que rebalse aproximadamente la mitad del volumen de la botella mientras extrae la manguera.
4. Tapar la botella con el tapón esmerilado. Conservar esa pequeña cantidad de agua que queda entre el tapón y el reborde de la botella.
5. Almacenar la botella a temperatura ambiente en un lugar oscuro.

10.4 Llenado de botella para análisis de nutrientes y otros análisis

1. Enjuagar la botella de 1 L con el tapón puesto con un poco del agua de la botella van Dorn. Repetir esto al menos tres veces.
2. Llenar la botella, no necesariamente hasta el borde, con agua de la botella.
3. Almacenar la muestra en una hielera y transportar a 4°C aproximadamente para su posterior análisis.

10.5 Muestreo en ríos

1. Enjuagar un par de veces la botella antes de tomar la muestra definitiva. Desechar el agua de enjuague aguas abajo (unos 2 o 3 m) del sitio que muestrea.
2. Llenar el bote sumergiéndolo lateralmente con la boca en dirección de la corriente.
3. Almacenar la muestra en una hielera y transportar a 4°C aproximadamente para su posterior análisis.

11. Procedimiento para muestras biológicas (Plancton)


Para el conteo de plancton, el tipo de preservante a utilizar depende del tipo de organismo que se desea conservar. Se utiliza formaldehído diluido al 4% para la preservación de zooplancton y fitoplancton. Una solución de lugol al 2% para la preservación de fitoplancton. Para el conteo e identificación de especies planctónicas in vivo se recolectan muestras vivas recolectadas con una red para plancton.

11.1 Preparación de botes y frascos para conservación de plancton

Reactivos Solución de Lugol
 Formaldehído 40%

Procedimiento

1. Agregar 50 mL de formaldehído a un bote de 500 mL.
2. Agregar 1 mL de Lugol en un frasco de 4 oz.
3. Agregar 10 mL de solución de Lugol a otro bote de 500 mL.
4. Agregar 5 mL de formaldehído a otro frasco de 4 oz.

	<p>Procedimiento Operacional Estándar</p> <p>RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS: ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y CONTEO DE PLANCTON</p>	<p>POE - 2 Versión: 3 Fecha: 06/02/2017 Página: 6 de 7 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix</p>
---	---	--

11.2 Recolecta para muestras de plancton puntuales

1. Tomar una muestra de agua con la botella de van Dorn a las profundidades que desee.
2. Agregar aproximadamente 450 mL de agua de la botella van Dorn en la botella preparada con formol. Esta botella NO necesita enjuague.
3. Agregar aproximadamente 490 mL de agua de la botella van Dorn en la botella preparada con lugol. Esta botella NO necesita enjuague.

11.3 Recolecta para muestras integradas (columna de agua)

Para este tipo de muestra se describen dos metodologías:

Recolecta de una muestra integrada (0 a 30 m).


La muestra se toma utilizando una manguera de ½ pulgada de diámetro (este tamaño puede variar), lastrada y graduada, de manera que pueda mantenerse recto en la columna de agua. Conociendo el ancho de la manguera y la distancia a donde se tomó la muestra se puede saber el volumen de la muestra recolectada.

1. Bajar lentamente la manguera a modo que no queden burbujas dentro de la columna de la manguera, cuando se llegue a la distancia deseada, crear un vacío en la manguera doblando el extremo que esta fuera del agua.
2. Subir lentamente la punta que se encuentra sumergida con un lazo (en forma de U), luego vaciar el contenido de la manguera dentro de una red de fitoplancton de 20 micras de luz de malla, para concentrar la muestra.
3. Depositar el contenido de la muestra concentrada en frascos de vidrio o botellas plásticos de 150 mL.
4. Posteriormente fijar con una solución de lugol para su análisis en laboratorio.

Recolecta de una muestra integrada > 1m (Arrastre vertical).

La muestra se toma utilizando una red de fitoplancton de 20 micras de luz de malla.

1. Bajar lentamente la red de fitoplancton hasta la distancia deseada.
2. Subir lentamente la red sobre la columna de agua. Una vez afuera lavar con agua desmineralizada la red para concentrar la muestra.
3. Depositar el contenido de la muestra concentrada en los frascos de vidrio con lugol (forado de aluminio).
4. Repetir el procedimiento para recolectar la segunda muestra y depositar en los frascos con formol

	Procedimiento Operacional Estándar RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS: ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS Y CONTEO DE PLANCTON	POE - 2 Versión: 3 Fecha: 06/02/2017 Página: 7 de 7 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix
---	--	---

Nota: Antes de bajar nuevamente la red lavarla para que no quede material del arrastre anterior.

11.4 Recolecta para muestras vivas

Muestras superficiales


1. Enrollar el lazo y la red para luego tirarla a aproximadamente 10 m de distancia (la red no debe enredarse con el lazo).
2. Halar lentamente la red por la superficie para recolectar la muestra (si la red se hunde, deberá repetir el procedimiento).
3. Una vez afuera lavar con agua desmineralizada la red para concentrar la muestra.
4. Depositar el contenido de la muestra concentrada en frascos de vidrio sin preservantes.

Muestras profundas

La muestra se toma utilizando una red de fitoplancton de 20 micras de luz de malla.

1. Bajar lentamente la red de fitoplancton hasta la distancia deseada.
2. Subir lentamente la red sobre la columna de agua. Una vez afuera lavar con agua desmineralizada la red para concentrar la muestra.
3. Depositar el contenido de la muestra concentrada en los frascos de vidrio sin preservantes.

12. Notas

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 3 Versión: 3 Fecha: 08/02/2017 Página: 1 de 6</p>
	<p align="center">PARÁMETROS <i>IN SITU</i></p>	<p>Preparado por: F. Reyes Revisado por: O. García Aprobado por: M. Dix</p>

1. Propósito

Medición *in situ* (en el sitio) de algunos parámetros físicos en campo tales como Transparencia, Temperatura (T), Oxígeno disuelto (O₂), Potencial de Hidrógeno (pH) y Conductividad específica (Cond.).

2. Principio

La *Transparencia* del agua está asociada a la turbidez en el agua, la cual es causada por material suspendido orgánico o inorgánico como arcilla, arena, limos, compuestos orgánicos solubles coloreados, plancton y otros organismos microscópicos. La transparencia en campo es medida mediante un disco Secchi.

La *Temperatura* del agua nos da mucha información sobre las condiciones del lago. En especial cuando queremos conocer si un cuerpo de agua esta estratificado, es decir, si hay una separación de una capa de agua más caliente y menos densa flotando encima de una capa de agua más fría y densa. La estratificación influye en la distribución de nutrientes a diferentes profundidades. En la actualidad se emplean muchos medidores electrónicos provistos con sondas.

El *Oxígeno disuelto* en todo sistema de agua natural es importante para la distribución de los organismos y su metabolismo. Es conveniente conocer la concentración del oxígeno disuelto en mg/L y también el porcentaje de saturación con oxígeno disuelto del agua. Se han desarrollado varios métodos analíticos para su estimación, sin embargo, en los últimos años se ha avanzado mucho en equipos electrónicos para la determinación del oxígeno con electrodos de membrana o foto eléctrico.

El *Potencial de hidrógeno* para aguas naturales oscila entre cuatro y nueve, la mayoría son ligeramente básicas debido a la presencia de bicarbonatos y carbonatos. En la actualidad la técnica más usada para la medición del pH es la potenciométrica, que se fundamenta en la medida de la diferencia de potencial experimentada entre dos celdas electroquímicas (denominadas electrodos).

La *Conductividad* se define como la capacidad que tiene una sustancia de transportar electrones (conducir electricidad) en el agua, esta capacidad se ve influenciada por la cantidad de sales disueltas y la temperatura. La Conductividad específica se define como la capacidad de transportar electricidad en el agua a una temperatura específica, normalmente de 25 ° C. Actualmente existen equipos que miden la conductividad de una muestra de agua con un conductímetro.

3. Referencias

APHA.1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA/AWWA/WPCF.

4. Documentos asociados

Seguridad en viajes en lancha POE - 1

Check List de Equipo de campo (Anexo 2)

Hoja de parámetros *in situ* (Anexo 1)

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 3 Versión: 3 Fecha: 08/02/2017 Página: 2 de 6
	PARÁMETROS <i>IN SITU</i>	Preparado por: F. Reyes Revisado por: O. García Aprobado por: M. Dix

5. Terminología y abreviaciones

Temperatura en grados Celsius (°C)

Potencial de Hidrógeno (pH)

Oxígeno Disuelto en miligramos por litro (O₂ mg/L)

Porcentaje de Saturación del Oxígeno Disuelto (O₂ %)

Conductividad en micro siemens por centímetro (Cond. μS/cm) a 25 °C

Conductividad específica en micro siemens por centímetro (Cond. μS/cm)

Litros (L)

Mililitros (mL)

Metros (m)

Milímetros (mm)

6. Materiales y Equipo

5.1 Reactivos

Agua desmineralizada grado reactivo

5.2 Equipo

Disco Secchi

Sondas Multiparamétricas que midan temperatura, oxígeno, pH y conductividad

Cuerdas graduadas

Lancha con motor fuera de borda

Baterías

Pesos

GPS

Botella de Van Dorn y su mensajero (colecta agua a diferentes profundidades)

Boleta de campo (Anexo 1)



Lápices

Guantes de trabajo

7. Procedimiento

Previo al viaje de campo se debe cerciorar que todos los equipos estén en buen estado y funcionando (*e.i.*, calibrado).

El día del monitoreo hacer un chequeo previo (Ver Anexo 2). Revisar que se lleva todo el equipo que se va a utilizar.

 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 3 Versión: 3 Fecha: 08/02/2017 Página: 3 de 6
	PARÁMETROS IN SITU	Preparado por: F. Reyes Revisado por: O. García Aprobado por: M. Dix

Tomar los datos en el orden que a continuación se describe.

7.1 *Transparencia*

Introducir el disco Secchi en el agua y bajar lentamente hacia el fondo hasta que se pierda de vista, luego subir hasta que reaparezca.

Anotar ambas medidas en metros. La medida final es el promedio entre las dos observaciones.

Anotar quien realizó la lectura en la boleta de campo

Incluir un peso o lastre al disco Secchi para bajar verticalmente.

La cuerda debe estar graduada en centímetros.

Realizar las mediciones del lado sombreado de la lancha.

No usar lentes de sol ni lentes que sean polarizados.

Realizar al final del muestreo una nueva medición de la transparencia con el disco Secchi, si permanece más de 15 min en el sitio de muestreo.

7.2 *Temperatura*

Encender el aparato y dejar calentar por lo menos 15 minutos.

Sumergir la sonda en el agua y bajar hasta la profundidad que desee hacer la lectura, el cable de la sonda debe estar graduado.

Recolectar una muestra de agua con una botella de muestreo (Van Dorn), si no se dispone de una sonda que realice lecturas a profundidades mayores de un metro, y realizar lo más rápido posible la medición dentro de la botella de muestreo o en un frasco de cuello ancho.

Mover suavemente el electrodo.

Anotar el dato hasta que las lecturas sean estables.

Bajar siempre la sonda verticalmente.

Prestar atención al cable o lazo de la sonda cuando baje, para que no se enrede el cable con redes de pesca u otros obstáculos dentro del agua.


Lavar los electrodos con agua desmineralizada y colocar su respectivo protector, al finalizar las lecturas.

7.3 *Oxígeno disuelto*

Encender el aparato y dejar calentar por lo menos 15 minutos.

Calibrar el electrodo en una cámara con aire al 100%, si es necesario. Algunas sondas requieren calibración según la elevación sobre el nivel de mar.

Sumergir la sonda en el agua y bajar hasta la profundidad que desee hacer la lectura, el cable de la sonda debe estar graduada.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 3 Versión: 3 Fecha: 08/02/2017 Página: 4 de 6
	PARÁMETROS IN SITU	Preparado por: F. Reyes Revisado por: O. García Aprobado por: M. Dix

Recolectar una muestra de agua con una botella de muestreo (Van Dorn), si no se dispone de una sonda que realice lecturas a profundidades mayores de un metro, y realizar lo más rápido posible la medición dentro de la botella de muestreo o en un frasco con cuello ancho.

Mover suavemente el electrodo mientras se tome las lecturas.

Mantener siempre el electrodo dentro la cámara saturada cuando no se use.

Observar que la membrana del electrodo de oxígeno de la sonda no tenga burbujas ni arrugas.

Anotar el dato hasta que las lecturas sean estables.

Bajar siempre la sonda verticalmente.

Prestar atención al cable o lazo de la sonda cuando baje, para que no se enrede el cable con redes de pesca u otros obstáculos dentro del agua.

Lavar los electrodos con agua desmineralizada y colocar su respectivo protector, al finalizar las lecturas.

7.4 *Potencial de hidrógeno*

Calibrar la sonda antes de usar con soluciones estándares.

Encender el aparato y dejar calentar por lo menos 15 minutos.

Sumergir la sonda en el agua y bajar hasta la profundidad que desee hacer la lectura, el cable de la sonda debe estar graduada.

Recolectar una muestra de agua con una botella de muestreo (Van Dorn), si no se dispone de una sonda que realice lecturas a profundidades mayores de un metro, y realizar lo más rápido posible la medición dentro de la botella de muestreo o en un frasco con cuello ancho.

Mover suavemente el electrodo mientras se tome las lecturas.

Anotar el dato hasta que las lecturas sean estables.

Bajar siempre la sonda verticalmente.

Prestar atención al cable o lazo de la sonda cuando baje, para que no se enrede el cable con redes de pesca u otros obstáculos dentro del agua.


Lavar los electrodos con agua desmineralizada y colocar su respectivo protector, al finalizar las lecturas.

7.5 *Conductividad y Conductividad específica a 25 °C*

Calibrar la sonda antes de usar con soluciones estándares.

Encender el aparato y dejar calentar por lo menos 15 minutos.

Sumergir la sonda en el agua y bajar hasta la profundidad que desee hacer la lectura, el cable de la sonda debe estar graduada.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 3 Versión: 3 Fecha: 08/02/2017 Página: 5 de 6
	PARÁMETROS IN SITU	Preparado por: F. Reyes Revisado por: O. García Aprobado por: M. Dix

Recolectar una muestra de agua con una botella de muestreo (Van Dorn), si no se dispone de una sonda que realice lecturas a profundidades mayores de un metro, y realizar lo más rápido posible la medición dentro de la botella de muestreo o en un frasco con cuello ancho.

Anotar el dato hasta que las lecturas sean estables.

Bajar siempre la sonda verticalmente.

Prestar atención al cable o lazo de la sonda cuando baje, para que no se enrede el cable con redes de pesca u otros obstáculos dentro del agua.

Lavar los electrodos con agua desmineralizada y colocar su respectivo protector, al finalizar las lecturas.

7.6 *Recolecta de muestras de agua con botella Van Dorn*

La botella de van Dorn permite coleccionar una muestra de agua a una profundidad específica.

Bajar lentamente, con sus extremos abiertos, la botella van Dorn hasta alcanzar la profundidad deseada, esperar un minuto y luego dejar caer y correr el mensajero.

Esperar un minuto o más, dependiendo la profundidad deseada, para que el mensajero llegue, active y se cierre la botella.

Halar hacia la superficie la botella y realizar las mediciones que requiera.

La botella debe bajar verticalmente y la cuerda debe estar debidamente graduada.

Colocar y cerrar el mensajero cuidadosamente sobre las cuerdas graduadas.

Colocar pesos o lastre a la botella van Dorn para que baje vertical, si es necesario.

8. Reporte de datos

Anotar quienes realizan las mediciones y el equipo utilizado.

Toda la información registrada en la boleta de campo servirá para crear y alimentar las bases de datos.

Hora de inicio y de finalización

Temperatura ambiental en grados Celsius (°C)

Temperatura en grados Celsius (°C) por profundidad

Potencial de Hidrógeno (pH) por profundidad


Oxígeno Disuelto en miligramos por litro (O₂ mg/L) por profundidad

Porcentaje de Saturación del Oxígeno Disuelto (O₂ %) por profundidad

Conductividad en micro siemens por centímetro (Cond. μS/cm) por profundidad

Conductividad específica en micro siemens por centímetro (Cond. μS/cm) por profundidad

Transparencia en metros (m)

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 3 Versión: 3 Fecha: 08/02/2017 Página: 6 de 6</p>
	<p align="center">PARÁMETROS <i>IN SITU</i></p>	<p>Preparado por: F. Reyes Revisado por: O. García Aprobado por: M. Dix</p>

9. Notas



Anexo 2.

CHECK LIST

Item	Estado	Comentario
Botella Van Dorn		
Disco Secchi		
Sonda multiparametricas		
Red de Plancton		
Frascos 4 oz. con 0.4ml Lugol		
Frascos 4oz. con 2 ml de Formol		
Frascos 4oz. sin preservantes		
Botellas 1L (calidad agua)		
Botellas 500 ml con 5 mL de Lugol		
Botellas 500 ml con Formol		
GPS		
Cámara fotográfica		
Marcadores permanentes indelebles		
Pinzas		
Hoja de campo		
Cuaderno de notas		
Pesos		
Lazos graduados		
Guantes de nitrilo o látex		
Guantes gruesos (cuero)		
Baterías AA, C, D y baterías extra		
Masking Tape		
Goteros		
Jeringa de 10ml		
Solución de lugol		
Solución de Formol		
Zip ties (cinchos de plástico ajustables)		
Bolsas ziploc		
Bolsas plásticas, 25 libras		
Probeta 250 ml		
Probeta 100 ml		
Desarmador Philips		
Hieleras con hielo		
Embudo para filtrar		
Baterías Extra		
Termómetro ambiental		
Lápices		
Alcohol Etilico al 70%		
Alcohol Propílico al 80%		
Cubetas		
Pizetas con agua desmineralizada		
Manguera para fitoplancton		

DATOS GENERALES

Lugar: _____ Fecha Día 1: _____ Hora Inicio: _____ Hora Final: _____
 Fecha Día 2: _____ Hora Inicio: _____ Hora Final: _____

Participantes: _____

Estación	Prof.	Hora muestreo	Prof. de muestreo	Secchi Inicial	Secchi Final	Secchi	T° Ambiental	No. muestras	Observaciones
								M F N DBO	
								M F N DBO	
								M F N DBO	
								M F N DBO	
								M F N DBO	
								M F N DBO	
								M F N DBO	
								M F N DBO	
								M F N DBO	

TIPO DE MUESTREO:

Puntual: _____ Estratificado: _____

Equipo de muestreo utilizado: _____


Observaciones:

Nombre de la persona que toma la muestra:

Analista a cargo: _____
 Código de muestra en el laboratorio: _____

Control de emisión

Elaboró: _____ F: _____ Domingo Ujpán Tec. Sistemas de Información	Revisó: _____ F: _____ Flor Mayarí Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobo: _____ F: _____ Elsa María Reyes Jefe DICA
---	--	--

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 4 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 1 de 7
	SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

1. Propósito

Conseguir un ambiente seguro y saludable de trabajo, con el mínimo riesgo para la salud de los trabajadores y con el absoluto compromiso de efectuar todas las actividades con criterio ambiental, conociendo los riesgos que para el entorno natural implica el manejo de reactivos, materiales y equipo.

El laboratorio es un lugar potencial de riesgo por la presencia y uso de equipos, sustancias y elementos que hacen parte del trabajo diario desarrollado, teniendo en cuenta esto, trabajar con seguridad es una prioridad y depende del conocimiento y la actitud que pueda tenerse ante los peligros potenciales.

A través de este procedimiento de seguridad, se pretende que todo el personal de laboratorio conozca y maneje las normas de seguridad, ya que cada quien es responsable de protegerse a sí mismo y a sus compañeros.

2. Aplicación

Laboratorio de calidad de agua de la institución.

3. Referencias

APHA-AWWA-WPCF. 1992. Métodos Normalizados, para el análisis de aguas potables y residuales. Ediciones Díaz de Santos, S.A., Barcelona, España.

Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca del Lago de Atitlán y su Entorno –AMSCLAE-. Laboratorio de Calidad de Aguas. 2012. Plan de manejo para la operación y funcionamiento del equipos y reactivos. Guatemala. 20 p

Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. s.a. Manual de seguridad para el laboratorio de limnología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. Colombia. 12 p.

4. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras POE - 2

Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería POE - 5

Procesamiento de muestras POE - 6

Análisis de nitratos/nitritos POE - 7

Análisis de amonio POE – 8


Análisis de fosforo reactivo soluble (ortofosfatos) POE - 9

Análisis de fosforo total POE - 10

Análisis de nitrógeno total POE - 11

Análisis de plancton POE - 12

Análisis de clorofila a POE – 13

	Procedimiento Operacional Estándar SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	POE - 4 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 2 de 7 Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix
---	---	--

5. Seguridad

5.1 Equipo de seguridad

Extintores químicos secos: son útiles contra la mayoría de los fuegos, pero sobre todo para apagar los producidos por líquidos y metales inflamables y los fuegos eléctricos.

Extintores de dióxido de carbono: útiles para fuegos pequeños producidos por líquidos inflamables y con una eficacia limitada al aplicarse sobre instrumentos y equipos electrónicos.

Duchas de seguridad: se utiliza en accidentes por ácidos, cáusticos u otros líquidos peligrosos, cuando se prende fuego a las ropas y en otras situaciones de emergencia. Las duchas deben estar convenientemente situadas, preferiblemente cerca de una puerta al exterior y sobre un espacio despejado. Hay que comprobar su estado periódicamente.

Es ventajoso mantener un tanque de reserva de agua para emergencias.

Lavado de ojos: Lávense inmediata y cuidadosamente (15 min) los ojos para evitar alteraciones visuales o incluso la ceguera en caso de que se produzca una salpicadura de un producto químico. Las salpicaduras en la cara se lavan fácilmente con un colirio con aplicación en chorro.

Manta ignífuga: Es necesario contar con mantas ignífuga en lugares fácilmente accesibles, en caso de incendios menores.

Cubeta con arena: Es necesario contar con cubetas llenas de arena para poder acceder a ellas fácilmente en caso de incendio.

Instalaciones de almacenamiento: Para guardar los materiales de laboratorio, hay que conocer sus propiedades, así como las consecuencias de accidentes tales como derramamientos, explosión o fuego. Por regla general no deben almacenarse grandes cantidades de reactivos en las áreas de trabajo, sino utilizar envases más pequeños que sólo contengan lo suficiente para el trabajo diario o semanal. Evítense la mezcla, en caso de accidente, de productos químicos que puedan combinarse dando lugar a compuestos explosivos, inflamables o peligrosos, para ello deben almacenarse por separado. Los materiales peligrosos se guardarán en un recinto con recipientes específicos. Los disolventes inflamables se guardarán en cabinas adecuadas ventiladas.

Campanas extractoras de gases: Es esencial que existan campanas extractoras de gases. Esta se utiliza para trabajar con materiales peligrosos, pero no como sistema de almacenamiento.

Avisos en las paredes: Colóquense en un lugar central.

Recipiente con bicarbonato de sodio: contar con bicarbonato de sodio, en caso de cualquier derramamiento de ácido, sobre la piel o sobre alguna superficie.


5.2 Equipo y medidas de protección personal

En laboratorio, en especial ante el manejo de productos químicos es fundamental el uso de elementos adecuados que protejan el cuerpo, ojos y manos, las cuales son obligatorias.

Deberá usar bata de laboratorio de manga larga, debidamente abotonada.

El cabello deberá estar permanentemente recogido, no utilizar gorras.

Usar zapatos bien firmes, cerrados de suela de goma, para evitar resbalones y caídas.

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 4 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 3 de 7</p>
	<p align="center">SEGURIDAD EN EL LABORATORIO</p>	<p>Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix</p>

Usar gafas protectoras de material seguro contra golpes, que ofrezcan protección superior del área de la vista y suficiente protección lateral, ante situaciones que impliquen riesgo de salpicaduras de ácidos, álcalis, incluso fragmentos de vidrio, etc.

Usar guantes de protección apropiados, dependiendo de la actividad.

No usar pañuelos, bufandas, joyas y demás accesorios que puedan engancharse en los equipos y elementos de trabajo originando accidentes

Está prohibido en el laboratorio: consumir bebidas, fumar, consumir alimentos y utilizar celulares. Sin embargo, es aconsejable tener un teléfono designado para uso de emergencia.

Durante los procedimientos no se distraiga, ni distraiga a otros mientras está trabajando.

No trabaje solo en el laboratorio, si lo hace informe al encargado de laboratorio.

Dejar sus cosas personales en un lugar apropiado, para que no interrumpa el área de trabajo.

5.3 Recomendaciones al área de trabajo en el laboratorio

Mantener las áreas de trabajo del laboratorio despejadas y limpias para poder realizar un trabajo seguro y eficiente.

Respetar los espacios de uso, circulación y seguridad.

Mantener las mesas, repisas y estante limpios y ordenados.

Los frascos de los reactivos deben de estar etiquetados, así como cualquier otra cristalería utilizada se debe de rotular. La cual debe de incluir lo siguiente:

Fecha de elaboración, que sustancia contiene y concentración y quién elaboró la solución.

No apoyar materiales y equipo en los bordes de la mesa de trabajo.

Armar los equipos sobre soportes firmes.

Debe verificar el estado de las conexiones eléctricas, de gas, etc. antes del uso de los equipos, si está dañado no los utilice, avise al encargado de laboratorio.

No dejar equipos operando en su ausencia.

Antes de abandonar el laboratorio limpie, lave y ordene el material que utilizó.

Apagar todos los equipos y el agua.


Colocar los estuches protectoras encima de los aparatos.

5.4 Seguridad en la manipulación de productos químicos y material de laboratorio

Mantener en el laboratorio copias de los instructivos para cada equipo allí montado.

Manejar apropiadamente los productos e instrumentos de laboratorio es uno de los factores clave para evitar accidentes.

Evitar el contacto directo con productos químicos. Use guantes y cámbielos si se dañen.

	Procedimiento Operacional Estándar SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	POE - 4 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 4 de 7 Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix
---	---	--

Manipular los químicos volátiles bajo la campana de extracción de gases y en ambientes bien ventilados.

No usar productos que no estén etiquetados correctamente o cuyas etiquetas se encuentren en mal estado. Rotular todo lo que se utiliza en laboratorio.

Antes de usar un producto químico lea su etiqueta.

Ser muy cuidadoso al abrir las botellas de los químicos, recuerde que la tapadera se debe de depositar en la mesa con la parte interior hacia arriba, tape inmediatamente los frascos al dejar de utilizarlos y asegúrese de que queden cerradas apropiadamente.

No introducir pipetas directamente en los frascos de reactivos. Verter en un recipiente adecuado la cantidad aproximada que se va a utilizar y pipetee desde allí. Si sobra reactivo, no lo regrese al frasco del reactivo, deséchelo apropiadamente, en el recipiente adecuado, para tal fin.

No verter productos químicos directamente del frasco, verter en un recipiente que pueda manipular.

Siempre verter las soluciones más concentradas sobre las más diluidas. Así evitará reacciones violentas y salpicaduras.

No tomar las botellas de reactivos por el cuello o por la tapadera.

Los líquidos inflamables deben de estar lejos de calor, de la luz solar directa, chispas eléctricas y en lugar bien ventilado.

Bajo ninguna circunstancia identificar el contenido de una botella o recipiente aspirando directamente para percibir su olor.

Sustancias o Productos Tóxicos:

Leer cuidadosamente la etiqueta del reactivo a utilizar.

Toda persona que trabaja en el laboratorio debe de estar entrenado para las actividades que se desarrollaran. Se debe de estar informado de la toxicidad de los productos que se utilizaran y las medidas de seguridad para manipularlos.

Los productos altamente tóxicos (hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos halogenados, bases nitrogenadas, etc), deben ser utilizadas bajo autorización del encargado del laboratorio.

Los productos tóxicos se absorben por la piel y mucosas, por lo cual deben de manipularse con guantes y bajo la campana de extracción de gases y utilizando gafas y ropa protectoras.

5.5 Manipulación de ácidos y bases fuertes


Leer cuidadosamente la etiqueta del reactivo a utilizar.

Abrir los frascos despacio o bajo la campana de extracción de gases.

Los ácidos y bases concentrados deben almacenarse en envases de vidrio perfectamente tapados y rotulados.

No exponer los recipientes al calor.

Antes de tomar una botella verifique que no esté húmeda y que no posea pérdidas.

	Procedimiento Operacional Estándar SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	POE - 4 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 5 de 7 Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix
---	---	--

Trabajar con guantes.

No apoyar a las pipetas usadas directamente en la mesa de trabajo.

Si va a utilizar grandes cantidades de ácidos, siempre tener a su alcance, carbonado de sodio o bicarbonato de sodio.

5.6 Manipulación de elementos volátiles o inflamables

Leer cuidadosamente la etiqueta del reactivo a utilizar.

Conocer la volatilidad e inflamabilidad de los productos a utilizar y manejarlos con cuidado.

Si es necesario calentar productos volátiles, hacerlo bajo la campana en recipientes abiertos. Aplicar el calor por medio de un baño de agua. No utilizar llama directa.

5.7 Manipulación de material de vidrio

Antes de emplear material de vidrio verificar su buen estado. Descartar materiales con bordes rotos o astillados, así como el que presente rajaduras.

No ejercer tensión sobre el material de vidrio.

Evitar cambios bruscos de temperatura con material de vidrio.

Enjuagar el material inmediatamente después de usarlo.

5.8 Seguridad en los procedimientos de análisis químico

Verificar el armado y funcionamiento correcto de los equipos a ser usados

Conocer las principales características de los productos, implementos y reactivos que va a manipular.

No realizar procedimientos nuevos, ni introducir cambios en los existentes, si los mismos no han sido debidamente autorizados.

Durante los procedimientos no se distraiga, ni distraiga a otros mientras está trabajando.

Está prohibido beber, fumar y consumir alimentos en el laboratorio.

Nunca utilizar materiales, equipos y/o reactivos de los cuales desconoce su peligrosidad.


Luego de manipular un producto químico o de realizar cualquier tarea de laboratorio, lavar cuidadosamente las manos con agua y jabón.

Lavado de ojos. Lavar inmediatamente y cuidadosamente (15 min), los ojos para evitar alteraciones visuales o incluso la ceguera en caso de que se produzca una salpicadura de un producto químico.

Nunca llevar las manos a la boca u ojos cuando esta o ha estado manipulando productos químicos.

Comunicar todo accidente o irregularidad por insignificante que parezca al encargado del laboratorio, ello ayudara a prevenir otros.

5.9 Desecho de materiales y productos

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 4 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 6 de 7
	SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

Todo material de desecho del laboratorio debe ser clasificado y tratado apropiadamente.

Los residuos generales del laboratorio como guantes y papel no deben de mezclarse con los desechos de productos químicos.

El material de vidrio se debe de manejar de forma separada.

Nunca deseche un producto químico en el drenaje.

Los ácidos y bases deben ser neutralizados y desechados apropiadamente.

Si sobra reactivo, no devolverlo al recipiente original, sino desecharlo en los recipientes destinados a tal fin.

5.10 Derrame de productos químicos

En caso de derramamiento de productos químicos en el área de trabajo, de inmediato avisar al encargado del laboratorio.

Si el derramamiento no generó un accidente mayor, limpiar y descontaminar el área de trabajo, evitando todo contacto con la piel y, de ser posible, neutralizar los productos que se han derramado. Siempre tener cuidado de no producir mezclas reactivas durante este proceso.

5.11 Quemaduras por ácidos

En caso de salpicaduras en la piel:

- a) Lavar con agua abundante.
- b) Si se trata de ácido concentrado, aplicar bicarbonato en polvo sobre el área afectada.
- c) Si se trata de ácido diluido, lavar la porción de piel afectada con algodón empapado en solución acuosa de bicarbonato de sodio.

En caso de salpicaduras en los ojos:

- a) Lavar los ojos inmediatamente con abundante agua aplicada con un frasco de lavado (o una pera de goma). También puede poner la cabeza inclinada bajo el grifo, de modo tal que el chorro de agua le caiga sobre los ojos.
- b) Después de haber lavado los ojos consultar a un médico.

En caso de ingestión:

- a) Llamar al responsable del laboratorio, indique cual fue el producto ingerido.
- b) Si el ácido ha quemado los labios y la lengua:


Enjuagar profusamente con agua

Humedecer con solución acuosa de bicarbonato de sodio al 2%.

- c) Acudir a un médico

5.12 Quemaduras por álcalis

En caso de salpicaduras en la piel:


	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 4 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 7 de 7</p>
	<p align="center">SEGURIDAD EN EL LABORATORIO</p>	<p>Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix</p>

- a) Lavar profusa y repetidamente con agua.
- b) Humedecer la parte afectada de la piel con algodón empapado con ácido acético al 5% o vinagre sin diluir.

En caso de salpicaduras en los ojos:

- a) Lavar los ojos inmediatamente con abundante agua aplicada con un frasco de lavado (o una pera de goma).
- b) Acuda a un médico.

**En caso de emergencia llamar al Centro de información y asistencia toxicológica
2251-3560, 2230-0080**

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 5 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 1 de 4
	PROCEDIMIENTO DE LAVADO, SECADO Y ALMACENAMIENTO DE CRISTALERIA Y MATERIALES	Preparado por: F. Barreno y A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

El lavado, secado y almacenamiento adecuado de cristalería, pues es determinante en los diferentes tipos de análisis y resultados realizados en el laboratorio.

Disminuir las interferencias provenientes de la cristalería que causan problemas tales como la contaminación de las diferentes muestras recolectadas en el lago de Atitlán, ríos de la cuenca y plantas de tratamiento.

Obtener resultados confiables, basados en el cumplimiento de los lineamientos de este procedimiento.

2. Aplicación

Cristalería de laboratorio utilizada en los diferentes análisis de calidad de agua y recipientes plásticos utilizados en toma de muestras.

3. Principio

Es necesario lavar con ácido Clorhídrico (HCl) la cristalería de vidrio y de plástico que se utiliza para la toma de muestra y análisis de nutrientes el mismo día de uso. El ácido clorhídrico tiene propiedades que dan mejores resultados de lavado de cristalería, pues es un ácido con menor tendencia a provocar reacciones redox que puedan interferir con otras reacciones, es monoprótico por lo que puede utilizarse para disolver algunos metales (metales activos) para formar cloruros metálicos oxidados e hidrógeno gaseoso, su bajo pH es capaz de corroer material orgánico y a pesar de ser uno de los siete ácidos fuertes, es de los menos peligrosos de manipular (tomar precauciones). Logrando maximizar la eficiencia del proceso de lavado, para quitar los elementos contaminantes que puedan estar en los recipientes (Wisniewski, K., 2007).

4. Referencias

Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca del lago de Atitlán y su Entorno -AMSCLAE-. Laboratorio de Calidad de Aguas. 2012. Estudio para el análisis a través de protocolos normalizados para los principales parámetros físico-químicos. Guatemala. 25 p

Centro de Estudios Atitlán, Universidad del Valle de Guatemala. Laboratorio de Análisis y Monitoreo. Métodos de Análisis. Guatemala. 29 p

Wisniewski, Karen. 2007. All-Purpose Cleaners and their Formulation. In Tsoler, Uri. Handbook of detergents, Part 2. Surfactant science series. CRC Press. ISBN 978-1-57444-757-6.

5. Documentos asociados

Recolección y Preservación de Muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de Plancton POE - 2

Seguridad en el laboratorio POE – 4

Procesamiento de muestras POE - 6

Análisis de nitratos/nitritos POE – 7

Análisis de amonio POE – 8

Análisis de fosforo reactivo soluble (ortofosfatos) POE – 9

Análisis de fosforo total POE – 10

Análisis de nitrógeno total POE – 11

Análisis de plancton POE – 12

Análisis de clorofila *a* POE – 13

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 5 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 2 de 4
	PROCEDIMIENTO DE LAVADO, SECADO Y ALMACENAMIENTO DE CRISTALERIA Y MATERIALES	Preparado por: F. Barreno y A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

Mililitros (mL)

Litro (L)

Mol (M)

7. Seguridad

Usar siempre los elementos de protección personal (guantes, pinzas, batas de manga larga, tapabocas, gafas, zapatos cerrados, etc.)

Conocer las principales características de los productos, implementos y reactivos que va a manipular.

No realizar procedimientos nuevos, ni introducir cambios en los existentes, si los mismos no han sido debidamente autorizados.

Durante los procedimientos no se distraiga, ni distraiga a otros mientras está trabajando.

Está prohibido en el laboratorio: consumir bebidas, fumar y consumir alimentos.

Nunca utilizar materiales, equipos y/o reactivos de los cuales desconoce su peligrosidad.

Nunca llevar las manos a la boca u ojos cuando estuvo manipulando productos químicos.

Comunicar todo accidente o irregularidad por insignificante que parezca, ello ayudara a prevenir otros

8. Materiales y equipo

8.1 Reactivos

Ácido clorhídrico concentrado 37% (Nro. CAS: 7732-18-5)

Jabón libre de fósforo

Agua desmineralizada

Agua de grifo

Acetona

Hidróxido de sodio o cal hidratada.

8.2 Cristalería

Probeta de 100 mL

Varilla de agitación

8.3 Equipo

Campana de extracción de gases

Carretilla para escurrir cristalería

Horno para secado de cristalería (de uso exclusivo para cristalería)


Cajas plásticas de polietileno

Escobillones para lavar cristalería (solo se usa de ser necesario remover residuos)

Papel parafilm o papel aluminio

Toallas de papel

Pizetas

	Procedimiento Operacional Estándar PROCEDIMIENTO DE LAVADO, SECADO Y ALMACENAMIENTO DE CRISTALERÍA Y MATERIALES	POE - 5 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 3 de 4 Preparado por: F. Barreno y A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes
--	--	--

9 Soluciones necesarias

9.1. Baño ácido 0.1 M (preparación para 30 L)

Medir el volumen del recipiente plástico en el que se realizará el baño ácido.

Colocar la mitad del volumen final de agua, del baño ácido a preparar, en el recipiente plástico que tenga la capacidad del volumen final.

En la campana de extracción de gases, medir con una probeta 8.3 ml de ácido clorhídrico concentrado por cada litro de agua desmineralizada agregada en el recipiente plástico para lograr una concentración de 0.1 M.

Agregar lentamente el volumen de ácido clorhídrico especificada en el recipiente plástico con agua desmineralizada, este proceso debe llevarse a cabo en una campana de extracción de gases

Rotular el baño ácido con la siguiente información: Fecha de elaboración, sustancia contenida y concentración, quién elaboró el baño ácido y que cristalería contiene.

Precaución: Agregar lentamente el ácido clorhídrico al agua desmineralizada, mezclar cuidadosamente con una varilla de vidrio.

Nota 1.: Generalmente se usa un baño de ácido de 30 L. Por consiguiente, agregar 250 ml de ácido clorhídrico concentrado o 770 ml de ácido clorhídrico de 33% a 15 L de agua desmineralizada. Luego de agitar y homogenizar la solución, agregar 15 L de agua grado reactivo, para un volumen final de 30 L.

Nota 2: Se puede reusar el baño ácido, sin embargo, es recomendable hacer baños nuevos para la cristalería de vidrio y plástico dedicado a las siguientes actividades para asegurar un control de calidad: análisis de fósforo, estándares.

9.2 Solución jabonosa

Disolver 10 ml de jabón libre de fósforo en un litro de agua de grifo. Preparar la cantidad que se utilizará en un recipiente apropiado.

10. Procedimiento

10.1 Lavado de cristalería a mano


Desechar adecuadamente los residuos de los recipientes plásticos o cristalería utilizados, en los recipientes de desechos químicos respectivos.

Desmarcar la cristalería con algodón y acetona.

Si hay suciedad evidente, preparar una solución jabonosa (9.2) y remoje la cristalería en ella, de 4 a 12 hrs. Utilizar escobillones si es necesario, excepto en cristalería graduada o volumétrica.

Enjaguar la cristalería con agua de grifo por lo menos 7 veces, para eliminar los restos de solución jabonosa. Luego sumergir la cristalería en el baño ácido.

Si no hay suciedad evidente, enjaguar por lo menos tres veces con suficiente agua desmineralizada los recipientes plásticos de toma de muestra y la cristalería que haya sido utilizada para los análisis químicos.

	Procedimiento Operacional Estándar PROCEDIMIENTO DE LAVADO, SECADO Y ALMACENAMIENTO DE CRISTALERIA Y MATERIALES	POE - 5 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 4 de 4 Preparado por: F. Barreno y A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes
--	--	--

Sumergir la cristalería en el baño ácido, por lo menos 4hrs, y un máximo de 24hrs.

Al pasar el tiempo adecuado, sacar la cristalería del baño ácido cuidadosamente. Siempre utilizando guantes largos (hule grueso).

Enjuagar, usando pizetas, la cristalería con agua grado reactivo por lo menos seis veces y dejar escurrir a temperatura ambiente.

10.2 Secado de cristalería

Si no se cuenta con un horno exclusivo para el secado de cristalería:

Secar la cristalería a temperatura ambiente, en un lugar apropiado.

Secar la cristalería volumétrica (matraces, buretas, probetas), siempre a temperatura ambiente

Si se cuenta con un horno exclusivo de secado de cristalería:

Secar los recipientes plásticos en el horno a una temperatura de 85°C por 90 minutos.

Secar la cristalería no volumétrica en el horno a 130°C por 45 minutos.

Después de secar la cristalería, colocar papel parafilm o papel aluminio, en el borde de la misma para evitar contaminación.

10.3 Almacenaje de cristalería

Almacenar en un lugar apropiado con el respectivo papel parafilm o papel aluminio.

10.4 Lavado de celdas de cuarzo

Después de desechar apropiadamente el contenido de las celdas de cuarzo, desaguar tres veces con agua desmineralizada.

Preparar un baño exclusivo para las celdas de cuarzo, siguiendo los pasos del inciso 9.1

Remojar las celdas en el baño ácido por un máximo de 10 min.

Enjuagar las celdas con agua grado reactivo por lo menos seis veces.

Ecurrir las celdas de cuarzo a temperatura ambiente.

Secar sobre una superficie y con toallas de papel, las celdas de cuarzo boca abajo.

Almacenar apropiadamente.


10.5 Desecho de baño ácido

Después de utilizar el baño ácido, neutralizar la solución a un pH 7, utilizando cal hidratada o hidróxido de sodio

Antes de iniciar a neutralizar el baño ácido, medir el pH con papel indicador de pH.

Agregar lentamente una pequeña cantidad de cal hidratada o hidróxido de sodio y agitar. Volver a medir el pH. Repetir hasta lograr un pH 7.

Descartar el desecho en una cama biológica (preparado anteriormente).

	Procedimiento Operacional Estándar PROCESAMIENTO DE MUESTRAS: NUTRIENTES Y CLOROFILA a	POE - 6 Versión: 2 Fecha: 09/02/2017 Página: 1 de 4 Preparado por: J. Bocel y F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix
---	---	---

1. Propósito

Preparación de muestras a través de filtrado, para determinar nutrientes y clorofila en agua del lago de Atitlán y ríos de la cuenca.

2. Aplicación

Para análisis de fosfatos, nitratos/nitritos, amonio, y clorofila.

3. Principio

Es necesario filtrar las muestras para determinar los nutrientes reactivos, en el agua del lago de Atitlán y ríos de la cuenca.

4. Referencias

R. Wetzel & G. Likens. 2000. Limnological Analyses. Third Edition.

CEA. Centro de Estudios Atitlán. 2010. Universidad del Valle de Guatemala. Laboratorio de Análisis y Monitoreo. Métodos de Análisis. Guatemala. 29 p

5. Documentos asociados

Recolección y Preservación de Muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de Plancton POE - 2

Seguridad en el laboratorio POE - 4

Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería POE - 5

Análisis de amonio POE - 7

Análisis de nitratos/nitritos POE - 8

Análisis de fósforo reactivo soluble (ortofosfatos) POE - 9

Análisis de fosforo total POE - 10

Análisis de nitrógeno total POE - 11


Análisis de clorofila a POE - 13

6. Terminología y abreviaciones

Mililitros (mL)

Litro (L)

Milímetros (mm)

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 6 Versión: 2 Fecha: 09/02/2017 Página: 2 de 4
	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS: NUTRIENTES Y CLOROFILA a	Preparado por: J. Bocel y F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

7. Seguridad

Emplear siempre los elementos de protección personal (guantes, pinzas, batas de manga larga, tapabocas, gafas, zapatos cerrados, etc.)

Conocer las principales características de los productos, implementos y reactivos que va manipular.

No realizar procedimientos nuevos, ni introduzca cambios en los existentes, si los mismos no han sido debidamente autorizados.

Durante los procedimientos no se distraiga, ni distraiga a otros mientras está trabajando.

Está prohibido en el laboratorio: consumir bebidas, fumar y consumir alimentos.

Nunca utilizar materiales, equipos y/o reactivos de los cuales desconoce su peligrosidad.

Nunca llevar las manos a la boca u ojos cuando estuvo manipulando productos químicos.

Comunicar todo accidente o irregularidad por insignificante que parezca, ello ayudara a prevenir otros.

8. Materiales y equipo


8.1 Equipo

Jeringas de 60 mL
 Filtros Whatman GF/F 25 mm
 Filtros Whatman GF/C 25 mm
 Pizetas
 Papel aluminio
 Toallas de papel
 Recipientes plásticos de 125 mL
 Agua desmineralizada
 Guates de nitrilo
 Pinzas de punta plana
 Portafiltros

9. Procedimiento

9.1 Muestras filtradas

Colocar sobre la mesa de trabajo las muestras crudas colectadas en recipientes plásticos.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 6 Versión: 2 Fecha: 09/02/2017 Página: 3 de 4
	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS: NUTRIENTES Y CLOROFILA a	Preparado por: J. Bocel y F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

Tener el recipiente plástico de 125 ml, debidamente rotulado (Fecha, profundidad, sitio de muestreo), donde se depositará la muestra filtrada.

Tener sobre la mesa de trabajo la jeringa de 60 ml, el portafiltro y los filtros Whatman de 25 mm GF/F

Desenroscar la parte más grande del portafiltro, asegúrese que hay un empaque blanco en la parte superior o en la mitad. Si no lo tiene agarre otro portafiltro.

Agregar un poco de agua desmineralizada al portafiltro, utilizando una piceta. Esto para evitar que el filtro se mueva de lugar.

Con unas pinzas tomar un filtro y colocarlo sobre el portafiltro. El filtro debe quedar en el centro del portafiltro. Para muestras del lago de Atitlán se utilizan filtros Whatman de 25 mm GF/F y para muestras de ríos se utiliza GF/C

Atornillar de nuevo las dos mitades del portafiltro, recordar que el empaque debe de ir en la parte cónica del portafiltro.

Verificar el buen estado de la jeringa. Nunca tirar del embolo de la jeringa cuando el filtro este colocado en el portafiltro, la presión de vacío puede romper el filtro.

Agitar los recipientes plásticos que contienen las muestras crudas.

Introducir la jeringa de 60 ml en la botella, evitando que ingresen burbujas, succione el agua, hasta llenarla.

Verificar que la jeringa no tenga burbujas. Si las tiene sáquelas. Verificar que la jeringa contenga los 60 ml.

Enroscar la jeringa al portafiltro. Recordar que algunas jeringas se pueden atornillar con el portafiltro y otras solo se conectan.

Filtrar 10 ml en el recipiente plástico de 125 ml. Lavar el recipiente con estos 10 ml y descártelos. Luego filtre los restantes 50 ml.

Volver a llenar la jeringa con 60 ml, y filtrar de nuevo, depositándolos en el mismo recipiente plástico de 125 ml. Para obtener un volumen de 110 ml.

Luego de haber llenado el primer recipiente, repita lo mismo con un nuevo recipiente, hasta haber filtrado un volumen total de 240 ml con el mismo filtro.

En cada recipiente debe de quedar un poco de aire, para que las muestras se puedan preservar.


Al momento de filtrar la presión ejercida debe de ser constante, para evitar que el filtro se rompa.

Retirar la jeringa del portafiltro y proceda con la siguiente muestra.

No se olvide de agitar la muestra cruda cada vez que se va a tomar muestra de la misma.

Después de filtrar las muestras, si no se trabajaran inmediatamente, guárdela en la refrigeradora a una temperatura de 4 °C.

Nota: Si al momento de iniciar el filtrado, la muestra se escapa por los bordes del portafiltro, significa que el portafiltro está en mal estado, mal armado o el filtro está roto. Por lo cual se debe de iniciar de nuevo.

	Procedimiento Operacional Estándar PROCESAMIENTO DE MUESTRAS: NUTRIENTES Y CLOROFILA a	POE - 6 Versión: 2 Fecha: 09/02/2017 Página: 4 de 4 Preparado por: J. Bocel y F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix
---	---	---

9.2 *Resguardo de filtros*

Luego de haber filtrado los 240 ml. Proceda a desenroscar el portafiltro de la jeringa.


Desenroscar el portafiltro.

Con ayuda de dos pinzas, doblar el filtro por la mitad, cuidadosamente.

Guardar los filtros en sobres de aluminio preparados con anticipación y debidamente etiquetados.

Enjuagar el portafiltro, pinzas y jeringas con agua desmineralizada antes de iniciar con una nueva muestra.

10. **Notas**

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 1 de 10
	ANÁLISIS DE AMONIO	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Determinar concentración de amonio como $\mu\text{g/L NH}_4^+\text{-N}$ en muestras de agua.

2. Aplicación

El método es aplicable en el intervalo de 0-500 $\mu\text{g/L NH}_4^+\text{-N}$ a pesar de dar los mejores resultados con muestras que contienen menos de 50 $\mu\text{g/L NH}_4^+\text{-N}$. El límite de detección del método (LDM) es 3 $\mu\text{g/L}$. La precisión del método utilizando 10 ml de muestra es $\pm 2 \mu\text{g/L}$ (nivel de confianza de 95%). El análisis de amonio es prioritario y debe realizarse no más de 24 horas después de recolectada la muestra.

3. Principio

El amonio presente en cuerpos de agua es, en su mayoría, de origen biológico, siendo liberado como desecho del metabolismo de organismos heterótrofos (i.e. organismos que no realizan fotosíntesis). El ion amonio es una de las formas de nitrógeno inorgánico aprovechables por organismos fotosintéticos. Por su procedencia, se utiliza como indicador de contaminación reciente en aguas.


El método para la determinación de amonio es una modificación del utilizado por Liddicoat et al. (1975), basado en Solórzano (1969), análogo al método SM 4500-NH₃ F. (Eaton et al., 2005). El amonio reacciona con hipoclorito de sodio y fenol en medio básico, utilizando ferrocianuro de potasio como catalizador, se produce indofenol, que se caracteriza por su color azul intenso. Como parte de la estructura de indofenol, el amonio puede ser medido espectrofotométricamente (Boller, W. T., Buschman, C. J., & Tidwell, P. W., 1961).

4. Referencias

- Bolleter, W. T., Bushman, C. J. & Tidwell, P. W. 1961. Spectrophotometric determination of ammonia as Indophenol. Analytical chemistry. Monsanto Chemical Co., Texas City, Tex. 33: 592-594.
- Liddicoat, M.I., S. Tibbits, & E.I. Butler. 1975. The determination of ammonia in seawater. Limnol. Oceanogr. 20:131 - 132.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. Limnol. Oceanogr. 14:799 - 801.
- Eaton, A. D. et al. (eds.). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.

5. Documentos asociados

- Recolección y preservación de muestras POE - 2
- Seguridad en el Laboratorio POE - 4
- Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5
- Procesamiento de muestras POE – 6

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 2 de 10
	ANÁLISIS DE AMONIO	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

Litros (L)

Mililitros (mL)

Micro litros (μ L)

Gramos (g)

Miligramos (mg)

Microgramos (μ g)

Nanómetros (nm)

Centímetros (cm)

Mol (M)

Grados centígrados ($^{\circ}$ C)

Ultra violeta (UV)

Minutos (min.)

Segundos (s)

Concentración nominal: Concentración teórica obtenida por medio de procedimientos estandarizados por alguna entidad de metrología.

LDM (Límite de detección del método): cantidad mínima que puede ser detectada por una metodología.

Nro. CAS (Número de registro del Chemical Abstracts Service): es una identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones.

Precisión del método: Capacidad de la metodología en dar los mismos resultados en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones.

Matriz: Es el conjunto de todas aquellas especies químicas (agua, compuestos orgánicos e inorgánicos) que acompañan al amonio en la muestra analizada. La interferencia de la matriz se refiere a cualquier efecto que estas especies químicas tengan en la ejecución del método.


7. Materiales y Equipo

7.1 Reactivos

Fenol C_6H_5OH (CAS: 108-95-2)

Etanol C_2H_6 (CAS: 64-17-5)

Tri-Sodio citrato dihidrato $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ (CAS: 6132-04-3)

	Procedimiento Operacional Estándar ANÁLISIS DE AMONIO	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 3 de 10 Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes
--	--	---

Hidróxido de sodio en lentejas NaOH (CAS: 1310-73-2)

Hipoclorito de sodio en solución 6% NaClO

Hexaciano ferrato (II) de potasio trihidratado $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$ (CAS: 14459-95-1)

Nitrato de amonio NH_4NO_3 (CAS: 6484-52-2)

Agua grado reactivo

Solución estandar de referencia (SRM)

7.2 Cristalería

100 Tubos de ensayo con rosca (2.0 x 12.5 cm)

2 Balones aforados 50 mL

3 Balones aforados 100 mL

1 Balón aforado 500 mL

3 Erlenmeyer 250 mL

5 Beaker 100 mL

7.3 Equipo

Gradillas para tubos de ensayo

Unidad de luz ultravioleta 360 nm

Pipetas 10-2 ml, 100-1000 μ L, 20-200 μ L

Puntas para pipetas, varios volúmenes

Espectrofotómetro UV-visible

Campana de extracción de gases

Celda de espectrofotómetro de 5 cm

Pipetas 10-2 ml, 100-1000 μ L, 20-200 μ L


Celda de espectrofotómetro de 5 cm

Vortex

Balanza

8. Recomendaciones de seguridad especiales

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerar las siguientes normas como importantes y obligatorias

	Procedimiento Operacional Estándar ANÁLISIS DE AMONIO	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 4 de 10 Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes
--	--	---

Al utilizar fenol e hipoclorito de sodio hágalo en la campana de extracción de gases. Limpiar con papel toalla los derrames de reactivo inmediatamente. Algunos liberan vapores tóxicos y/o irritantes.

9. Soluciones necesarias para el análisis (para 100 muestras)

9.1 Solución de citrato alcalino 0.68 M (preparación para 500 mL)

Reactivos: 100.0 g de tri-Sodio citrato dihidratado
5.0 g de hidróxido de sodio en lentejas
500 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Colocar 250 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 500 mL. Agregar lentamente 100 g de tri-Sodio citrato hidrato y disuelva. Luego, agregar 5 g de hidróxido de sodio en lentejas y vuelva a disolver. Si es necesario, utilizar agitador magnético. Finalmente, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.

Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses

9.2 Solución fenol-etanol 1.06 M (preparación para 50 mL)

Reactivos: 5.0 g de fenol
50 mL de etanol al 95%

Procedimiento: Colocar 25 mL de etanol en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 5.0 g de fenol y agitar lentamente hasta disolver. Luego aforar con etanol y agitar de nuevo. Utilizar la campana de extracción de gases encendida, gafas protectoras y guante. Evitar la inhalación y la exposición con la piel


Almacenamiento: Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante cuando se finalice el análisis.

9.3 Solución oxidante (preparación para 100 mL)

Reactivos: 80.0 mL de solución de citrato alcalino 0.68 M (9.1)
17.5 mL de hipoclorito de sodio 6.0%
2.5 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Colocar lentamente 80 mL de solución de citrato alcalino en un Erlenmeyer de 200 mL, Luego agregar 17.5 mL de hipoclorito de sodio 6.0%. Finalmente 2.5 mL de agua grado reactivo y mezclar.

Almacenamiento: Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrenadante al finalizar el análisis.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 5 de 10
	ANÁLISIS DE AMONIO	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9.4 Solución catalizadora (preparación para 50 mL)

- Reactivos: 0.25 g de hexaciano ferrato (II) de potasio trihidratado
 50 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento: Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 0.25 g de hexaciano ferrato (II) de potasio trihidratado y agitar lentamente hasta disolver. Luego aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento: Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante al finalizar el análisis.

9.5 Solución madre de nitrato de amonio 50 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (preparación para 100mL)


- Reactivos: 0.02858 g de nitrato de amonio (secado al horno 100-110 °C, por una hora)
 100 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento: Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.02858 g de nitrato de amonio y agitar lentamente hasta disolver. Luego aforar agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses

9.6 Solución de enriquecimiento 1 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (Spike)

- Reactivos: 2.0 mL de solución madre de amonio 50 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$
 100 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento: Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 2.0 mL de solución madre de amonio 50 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (9.5) y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento: Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante al finalizar el análisis.

9.7 Solución intermedia 1 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$

- Reactivos: 2.0 mL de solución madre de amonio 50 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$
 100 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento: Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 2.0 mL de solución madre de amonio 50 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (9.5) y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento: Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante cuando se finalice el análisis.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 6 de 10
	ANÁLISIS DE AMONIO	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Nota: La solución de enriquecimiento y la solución intermedia pueden ser preparadas como una misma solución.

10. Preparación de la corrida

La corrida es un grupo de tubos a los cuales se les realiza el mismo procedimiento de análisis, adición de reactivos, tiempos de reacción y lectura de las muestras, basado en la disponibilidad de cristalería, personal y equipo de laboratorio (Ver anexo 1, ejemplo de una corrida).

10.1 Muestras

Medir y colocar 10 mL de muestra filtrada en un tubo de ensayo limpio. Nota: Si la concentración esperada de amonio en la muestra es mayor al límite superior a la establecida en la curva de calibración debe considerar realizar diluciones (ver inciso 15).

Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante al finalizar el análisis.

10.2 Curva de calibración

Partiendo de la solución intermedia (9.7), preparar (por duplicado) 14 tubos con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:

<i>Concentración nominal [µg/L NH₄⁺-N]</i>	<i>Volumen solución intermedia [µL]</i>	<i>Volumen de agua grado reactivo [mL]</i>
0	0	10.00
5	50	9.95
10	100	9.90
25	250	9.75
50	500	9.50
100	1000	9.00
200	2000	8.00


10.3 Duplicados

Preparar duplicados en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento:

Medir y colocar 10 mL de muestra elegida al azar en un tubo de ensayo limpio.

10.4 Blancos

Preparar dos tubos con agua grado reactivo (blanco) los cuales serán incluidos al azar dentro de la corrida. Los blancos sirven para asegurar que las soluciones y la cristalería no estén

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 7 de 10</p>
	<p align="center">ANÁLISIS DE AMONIO</p>	<p>Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes</p>

contaminados. Si se encuentra una cantidad detectable de amonio en un blanco la corrida se debe desechar y el análisis debe ser repetido con nuevas soluciones y cristalería limpia.

Medir y colocar 10.0 mL de agua grado reactivo en un tubo de ensayo limpio

10.5 Muestras enriquecidas (Spikes)

Preparar tubos con muestra enriquecida en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras y un blanco, para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir 9.5 mL de una muestra escogida al azar y colocar en un tubo de ensayo limpio.

Agregar 0.5 mL de la solución enriquecida (9.6) (Spike)

Agitar el tubo en el vortex.

10.6 Estándares de referencia (SRM)

Para el aseguramiento de la calidad del análisis, es necesario contar con un estándar de referencia de amonio trazable hasta alguna entidad de metrología.

Preparar tres tubos con estándares de referencia para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir 10 mL de la solución de estándar de referencia.

Nota: La solución de estándar de referencia (SRM) se debe preparar a manera que entre dentro de las concentraciones de la curva de calibración.

11 Procedimiento de análisis

Luego de haber preparado la corrida, seguir el procedimiento descrito a continuación para todos los tubos.

Agregar 0.4 mL (400 µL) de la solución fenol-etanol (9.2). Agitar en el vortex a alta velocidad por al menos 30 s.

Agregar 0.4 mL (400 µL) del catalizador (9.4). Agitar en el vortex a alta velocidad por al menos 30 s

Agregar 1.0 mL (1000 µL) de la solución oxidante (9.3). Agitar en el vortex a alta velocidad por al menos 30 s.

Colocar los tubos dentro de la unidad de luz ultravioleta por 45 minutos.

Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 640 nm en una celda de 5 cm.




12 Cálculos

12.1 Curva de calibración

En una hoja electrónica calcular la función regresión lineal de curva Concentración vs. Absorbancia de los estándares de calibración.

$$y = ax + b$$

Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia.

  	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 8 de 10
	ANÁLISIS DE AMONIO	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

12.2 Concentración

Con la función calculada en el inciso (12.1), calcular la concentración de cada muestra según sea la lectura del espectrofotómetro (11.6)

12.3 Control de calidad

Muestras enriquecidas (Spikes)

Calcular el porcentaje de recuperación (PR) con

$$PR = 100 \times \frac{\text{Concentración con spike} - \text{Concentración sin spike}}{50}$$

Duplicados


Calcular la diferencia relativa (DR) con

$$DR = 200 \times \frac{\text{Concentración 1} - \text{Concentración 2}}{\text{Concentración 1} + \text{Concentración 2}}$$

Estándar de referencia

Calcular la diferencia del estándar (DE) con

$$DE = 100 \times \frac{\text{Concentración medida} - \text{Concentración nominal}}{\text{Concentración nominal}}$$

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 9 de 10
	ANÁLISIS DE AMONIO	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

13 Criterios de aceptación

Los criterios de aceptación son valores máximos y mínimos dentro de los cuales se aceptarán los resultados como válidos. Los criterios de aceptación para cada control de calidad son los siguientes:

Control de Calidad	Valor Mínimo	Valor máximo
Porcentaje de recuperación (PR)	85%	115%
Diferencia relativa (DR)	-5%	5%
Diferencia del estándar	-15%	15%
Blancos (B)	<LD	>LD

Si el valor del control de calidad está entre el Valor Máximo y el Valor Mínimo el resultado del control se reporta como ACEPTABLE, de lo contrario se reporta como INACEPTABLE

14. Reporte de datos

14.1 Curva de calibración

Reportar la gráfica de concentración (eje y) vs. Absorbancia (eje x) de la curva de calibración (12.1) y la ecuación ($y = ax + b$). Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia. Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto

14.2 Concentración de Muestras

Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra (como $\mu\text{g/L NH}_4^+\text{-N}$), indique cuando esta sea menor que el límite de detección del método ($3 \mu\text{g/L}$)

14.3 Control de calidad

Reportar los valores de cada control de calidad e indique el resultado según el criterio de aceptación (13) (Anexo2).




14.4 Presentación de datos

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la colecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observación del analista.

Notas

Si la concentración de la muestra es mayor a la máxima concentración considerada en la curva de calibraciones necesario hacer una dilución de la muestra. Las diluciones más comunes son:

1:5 (2 mL de muestra en 8 mL de agua grado reactivo)

  	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 7 Versión: 5 Fecha: 20/11/2018 Página: 10 de 10
	ANÁLISIS DE AMONIO	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1:10 (1 mL de muestra en 9 mL de agua grado reactivo)

1:20 (0.5 ml de muestra en 9.5 mL de agua grado reactivo)






Elegir la dilución más conveniente según la lectura de la absorbancia.


Anexos

Anexo 1. Esquema de corrida para 60 muestras

DUP2	DUP3	Blanco	SPIKE1	SPIKE2	SPIKE3	SRM1	SRM2	SRM3
M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	Blanco	DUP1
M46	M47	M48	M49	M50	Blanco	M51	M52	M53
M38	M39	M40	Blanco	M41	M42	M43	M44	M45
M30	Blanco	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37
M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29
M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	Blanco
M5	M6	M7	M8	M9	M10	Blanco	M11	M12
[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	M1	M2	M3	M4
[0]	[5]	[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	[0]	[5]

Fuente: Elaboración DICA-AMSCLAE 2018

	Curva de calibración
	Blanco
	Duplicado
	Spike
	SRM

	Procedimiento Operacional Estándar ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 1 de 13 Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix
--	---	--

1. Propósito

Determinar concentración de nitrato/nitrito como $\mu\text{g/L NO}_3^- \text{-N} + \text{NO}_2^- \text{-N}$ en muestras de agua dulce.

2. Aplicación

El método es aplicable en el intervalo de 0-500 $\mu\text{g/L NO}_3^- \text{-N} + \text{NO}_2^- \text{-N}$. El límite de detección del método (LDM) es 2 $\mu\text{g/L}$. La precisión del método utilizando 10 ml de muestra es $\pm 0.3 \mu\text{g/L}$ (nivel de confianza de 99%). El análisis de nitrato/nitritos es de segunda prioridad y debe realizarse no más de 48 horas después de recolectada la muestra. En caso de no poderse analizar en este periodo de tiempo la muestra debe congelarse hasta el momento del análisis. No aplica para aguas con altas concentraciones de calcio y/o magnesio.

3. Principio

El nitrato naturalmente se encuentra en las aguas superficiales subterráneas, esto como consecuencia del ciclo natural del nitrógeno, sin embargo, existen alteraciones en este ciclo por fuentes naturales o por actividades antropogénicas, como el aumento de bacterias nitrificantes, el excesivo uso de abonos nitrogenados y su arrastre por las aguas de lluvia o riego, provocando mayor concentración de nitratos. Los nitratos presentan toxicidad para el consumo humanos y animal, por lo que es importante realizar monitoreos alrededor de la cuenca (Tenorio F., Del Valle, L. & Pastelín, G., 2005).

Para realizar el análisis de nitratos, se realiza una diazotización, para ello se reduce el nitrato a nitrito utilizando hidracina como reductor y cobre como catalizador en medio básico (Kamphake, L., Hannan, S. & Cohen, M., 1967). El nitrito resultante se hace reaccionar con sulfanilamida y N-(1-naftil) etilendiamina en medio ácido, provocando la formación de un compuesto diazoico, que se caracteriza por ser de color rojo-violeta en solución acuosa, de tal forma, puede ser analizado espectrofotométricamente (Tenorio F., Del Valle, L. & Pastelín, G., 2005).


4. Referencias

Kamphake, L. J., Hannah, S. A. and J. M. Cohen.1967. Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Research*, 1:205-216.

Strickland, J. D. H and Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of sea water analysis. Bulletin 167. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Eaton, A. D. et al. (eds.). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Tenorio F., Del Valle, L. & Pastelín, G. 2005. Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 36: 31-41

		Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 2 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix	

5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de Plancton POE - 2

Seguridad en el Laboratorio POE - 4

Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5

Procesamiento de muestras POE - 6

6 Terminología y abreviaciones

Litros (L)

Mililitros (mL)

Micro litros (μ L)

Gramos (g)

Miligramos (mg)

Microgramos (μ g)

Nanómetros (nm)

Centímetros (cm)

Mol (M)

Grados centígrados ($^{\circ}$ C)

Ultra violeta (UV)

Minutos (min.)

Segundos (s)

Concentración nominal: Concentración teórica obtenida por medio de procedimientos estandarizados por alguna entidad de metrología.

LDM (Límite de detección del método): cantidad mínima que puede ser detectada por una metodología.

CAS No. (Número de registro del Chemical Abstracts Service): es una identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones.

Precisión del método: Capacidad de la metodología en dar los mismos resultados en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones.

Matriz: Es el conjunto de todas aquellas especies químicas (agua, compuestos orgánicos e inorgánicos) que acompañan al nitrato en la muestra analizada. La interferencia de la matriz se refiere a cualquier efecto que estas especies químicas tengan en la ejecución del método.

   	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 3 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

7 Materiales y Equipo

7.1 Reactivos

Fenol C_6H_5OH (CAS No.: 108-95-2)

Sulfato de hidracina $N_2H_6SO_4$ (CAS No.: 10034-93-2)

Sulfato de cobre (II) pentahidratado $CuSO_4 * 5 H_2O$ (CAS No.: 7758-99-8)

Hidróxido de sodio en lentejas NaOH (CAS No.: 1310-73-2)

Sulfanilamida $C_6H_8N_2O_2S$ (CAS No.: 63-74-1)

Ácido clorhídrico fumante 37% HCl

N-(1-Naftil) etilendiamina diclorohidrato (NED) $C_{12}H_{16}Cl_2N_2$ (CAS No.: 1465-25-4)

Nitrato de potasio KNO_3 (CAS No.: 7757-79-1)

Solución estándar de referencia (SRM)

7.2 Cristalería

100 Tubos de ensayo con rosca (2.0 x 12.5 cm)

1 Balón aforado 25 mL

1 Balón aforado 50 mL

4 Balones aforados 100 mL

1 Balón aforado 250 mL

2 Balones aforado 500 mL

2 Balones aforado 1000 mL

3 Erlenmeyer 250 mL

5 Beaker 100 mL

7.3 Equipo





Gradillas para tubo de ensayo

Baño María

Pipetas 10-2 mL, 100-1000 μ L, 20-200 μ L

Puntas para pipetas, varios volúmenes

Espectrofotómetro UV-visible

   	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 4 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

Celda de espectrofotómetro de 5 cm

Vortex

Balanza

Bandejas de pesaje

Espátulas

Campana de extracción de gases

8. Recomendaciones de seguridad especiales

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

- Al utilizar fenol e hidracina, hágalo en la campana de extracción de gases.
- El (Sulfato de hidracina) hidracinio sulfato es (altamente) muy tóxico. Evite la exposición directa con la piel, ojos, inhalación e ingesta. Utilice guantes, gafas protectoras, bata de manga larga y la campana de extracción de gases.

9. Soluciones necesarias para el análisis (para 100 muestras)

Previo a realizar el análisis deberá preparar, almacenar y tener listas estas soluciones.

9.1 Solución de hidróxido de sodio 1.0 M (preparación para 1000 mL)

Reactivos: 40.0 g de hidróxido de sodio en lentejas

1000 mL de Agua grado reactivo

Procedimiento: Colocar 500 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 1000 mL. Agregar lentamente 40.0 g de hidróxido de sodio en lentejas y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.


Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.2 Solución de hidracina 0.037 M (preparación para 250 mL)

Reactivos: 1.2 g de sulfato de hidracina
250 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Colocar 125 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 250 mL. Agregar lentamente 1.20 g de sulfato de hidracina y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo. Evitar la inhalación y la exposición con la piel.

Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 5 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

9.3 Solución de cobre 0.0016 M (preparación para 100 mL)

- Reactivos: 0.040 g de sulfato de cobre pentahidratado
100 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento: Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.040 g de sulfato de cobre pentahidratado y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo
- Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses. Cuando la solución cambie a color azul o enturbie, debe ser descartada apropiadamente.

9.4 Solución de sulfanilamida 10 g/L (preparación para 500 mL)

- Reactivos: 5.0 g de sulfanilamida
20 mL de ácido clorhídrico fumante (37%)
500 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento: Colocar 250.0 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 500 mL. Agregar muy lentamente 20.0 mL de ácido clorhídrico fumante 37% y agitar. Agregar lentamente 5.0 g de sulfanilamida y agitar hasta disolver, de ser necesario puede utilizar un agitador magnético. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.5 Solución NED 1 g/L (preparación para 500 mL)

- Reactivos: 0.5 g de N-(1-Naftil) etilendiamina diclorohidrato (NED)
500 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento: Colocar 250 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 500 mL. Agregar lentamente 0.5 g de NED y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento: Esta solución debe prepararse al menos mensualmente y debe almacenarse en un recipiente oscuro a 4°C. Si presenta una coloración café debe desecharse.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 6 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

9.6 Buffer de fenolato 0.19 M (preparación para 50 mL)

- Reactivos:**
- 0.9 g de fenol
 - 7.5 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 M (9.1)
 - 50 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento:** Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 0.9 g de fenol y agitar lentamente hasta disolver. Agregar 7.5 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 M y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento:** Esta solución debe prepararse el mismo día que el análisis y descartar los sobrantes cuando se finalice el análisis.

9.7 Solución reductora (preparación para 25 mL)

- Reactivos:**
- 12.5 mL de solución de hidracina 0.037 M (9.2)
 - 2.5 mL de solución de cobre 0.0016 M (9.3)
 - 10 mL de agua grado reactivo
- Procedimiento:** Agregar 12.5 mL de solución de hidracina 0.037 M y 2.5 mL de solución de cobre 0.0016 M en un balón aforado de 25 mL. Aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
- Almacenamiento:** Esta solución debe prepararse el mismo día del análisis y descartar el sobrante cuando se finalice el análisis.

9.8 Reactivo combinado (preparación para 100 mL)

- Reactivos:**
- 50 mL de solución de sulfanilamida 10 g/L (9.4)
 - 50 mL de solución NED 1 g/L (9.5)
- Procedimiento:** Vierta en un Erlenmeyer de 250 mL, 50 mL de la solución de sulfanilamida 10 g/L y luego 50 ml de solución NED 1 g/L. Mezclar bien.
- Almacenamiento:** Esta solución debe prepararse el mismo día del análisis y debe almacenarse en un recipiente oscuro o en lugar oscuro, debe descartarse el sobrante cuando se finalice el análisis.

 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 7 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

9.9 Solución madre de nitrato de 50 mg/L NO₃⁻- N (preparación para 100 mL)

Reactivos: 0.03607 g de nitrato de potasio (secado al horno a 105 °C por 24 horas)
100 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Colocar 50.0 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.03607 g de nitrato de potasio y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.

Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.10 Solución de enriquecimiento 1 mg/L NO₃⁻-N (preparación para 100 mL)

Reactivos: 2.0 mL de solución madre de nitrato de 50 mg/L NO₃⁻- N.
100 mL de agua grado reactivo.

Procedimiento: Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 2.0 mL de solución madre de nitrato de 50 mg/L NO₃⁻- N (9.9) y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.

Almacenamiento: Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante al finalizar el análisis.

9.11 Solución intermedia de 1 mg/L NO₃⁻-N (preparación para 100 mL)

Reactivos: 2.0 mL de solución madre de nitrato de 50 mg/L NO₃⁻- N.
100 mL de agua grado reactivo.

Procedimiento: Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 2.0 mL de solución madre de nitrato de 50 mg/L NO₃⁻- N (9.9) y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo

Almacenamiento: Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante al finalizar el análisis

Nota: La solución de enriquecimiento y la solución intermedia pueden ser preparadas como una misma solución.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 8 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

10. Preparación de la corrida

La corrida es un grupo de tubos a los cuales se les realiza el mismo procedimiento de análisis, adición de reactivos, tiempo de reacción y lectura de las muestras, basado en la disponibilidad de cristalería, personal y equipo de laboratorio (Ver anexo 1).

10.1 Muestras

Medir y colocar 10 mL de muestra filtrada en un tubo de ensayo limpio. Nota: Si la concentración esperada de nitratos en la muestra es mayor al límite superior a la establecida en la curva de calibración, debe considerar realizar diluciones (ver inciso 15).

10.2 Curva de calibración

Partiendo de la solución intermedia (9.11), preparar (por duplicado) 14 tubos con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla

Concentración nominal [$\mu\text{g/L NO}_3^- \text{-N}$]	Volumen solución intermedia [μL]	Volumen de agua grado reactivo [ml]
0	0	10.00
5	50	9.95
10	100	9.90
25	250	9.75
50	500	9.50
100	1000	9.00
200	2000	8.00

10.3 Duplicados


Preparar duplicados en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento

Medir y colocar 10 mL de muestra elegida al azar en un tubo de ensayo limpio.

10.4 Blancos

Preparar por lo menos dos tubos con agua grado reactivo (blanco) los cuales serán incluidos al azar dentro de la corrida, o el 5% del total de muestras y deben ser preparados tal como se haría con cualquier otra muestra. Los blancos sirven para asegurar que las soluciones y la cristalería no estén contaminados. Si se encuentra una cantidad detectable de nitratos en un blanco la corrida se debe desechar y el análisis debe ser repetido con nuevas soluciones y cristalería limpia.

Medir y colocar 10 mL de agua desmineralizada en cada tubo de ensayo limpio.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 9 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

10.5 Muestras enriquecidas (Spikes)

Preparar tubos con muestras enriquecidas en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir 9.5 mL de una muestra escogida al azar y colocar en un tubo de ensayo limpio.

Agregar 0.5 mL de la solución de enriquecimiento (9.10) (Spike).

Agitar el tubo en el vortex.

10.6 Estándares de referencia (SRM)

Para el aseguramiento de la calidad del análisis, es necesario contar con un estándar de referencia de nitratos trazable hasta alguna entidad de metrología

Preparar tres tubos con estándares de referencia para asegurar la precisión del procedimiento

Medir 10 mL de la solución de estándar de referencia.

Nota: La solución de estándar de referencia (SRM) se debe preparar a manera que entre dentro de las concentraciones de la curva de calibración.

11 Procedimiento para análisis de muestras

Luego de haber preparado la corrida, seguir el procedimiento descrito a continuación para todos los tubos.

Colocar la corrida en el baño María con una temperatura de 37 °C y dejarlas estabilizar por lo menos 45 minutos. Deben cubrirse los tubos con su tapa o, alternativamente, usar Parafilm.


Mientras los tubos están en el baño María, agregar 0.4 ml (400 µL) de buffer de fenolato (9.6) seguido inmediatamente de 0.2 ml (200 µL) de solución reductora (9.7) a cada muestra. Agitar en el vortex a alta velocidad por al menos 30 s. Nota: Ver Anexo 2, para calcular el volumen de solución reductora (9.7).

Dejar las muestras incubar **por exactamente 30 minutos**, tomando en cuenta el orden y tiempo de agregar el reactivo.

Quitar las muestras del baño María y dejarlas enfriar a temperatura ambiente por 40 minutos. Luego agregar 0.4 mL (400µL) del reactivo combinado (9.8) a cada muestra. Agitar en el vortex a alta velocidad por al menos 30 s

Dejar las muestras por 30 minutos, pero no más de 2 horas para que el color aparezca.

Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 543 nm en una celda de 5 cm, antes que se cumplan las dos horas.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 10 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

12 Cálculos

12.1 Curva de calibración

En una hoja electrónica calcular la función regresión lineal de curva Concentración vs. Absorbancia de los estándares de calibración (10.2).

$$y = ax + b$$

Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia

12.2 Concentración

Con la función calculada en (12.1), calcular la concentración de cada muestra según sea la lectura de absorbancia del espectrofotómetro de las muestras.

12.3 Control de calidad

Muestras enriquecidas (Spikes)

Calcular el porcentaje de recuperación (PR) con

$$PR = 100 \times \frac{\text{Concentración con spike} - \text{Concentración sin spike}}{50}$$

Duplicados


Calcular la diferencia relativa (DR) con

$$DR = 200 \times \frac{\text{Concentración 1} - \text{Concentración 2}}{\text{Concentración 1} + \text{Concentración 2}}$$

Estándar de referencia

Calcular la diferencia del estándar (DE) con

$$DE = 100 \times \frac{\text{Concentración medida} - \text{Concentración nominal}}{\text{Concentración nominal}}$$

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 11 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

13 Criterios de aceptación

Los criterios de aceptación son los valores máximos y mínimos dentro de los cuales se aceptarán los resultados como válidos. Los criterios de aceptación para cada control de calidad son los siguientes:

Control de Calidad	Valor Mínimo	Valor Máximo
Porcentaje de recuperación (PR)	85%	115%
Diferencia Relativa (DR)	-5%	5%
Diferencia del Estándar (DE)	-15%	15%
Blancos(B)	<LD	>LD

Si el valor del control de calidad está entre el Valor Máximo y el Valor Mínimo el resultado del control se reporta como ACEPTABLE, de lo contrario se reporta como INACEPTABLE

14. Reporte

14.1 Curva de calibración

Reportar la gráfica de concentración (eje y) vs. Absorbancia (eje x) de la curva de calibración (12.1) y la ecuación ($y = ax + b$). Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia. Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto.

14.2 Concentración de muestras





Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra (como $\mu\text{g/L NO}_2^- \text{-N} + \text{NO}_3^- \text{-N}$), indicar cuando esta sea menor que el límite de detección del método ($2\mu\text{g/L}$)

14.3 Control de calidad

Reporte los valores de cada control de calidad e indique el resultado según el criterio de aceptación (13).

14.4 Presentación de datos

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

   	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 12 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

15 Notas

Si la concentración de la muestra es mayor a la máxima concentración considerada en la curva de calibración es necesario hacer una dilución de la muestra. Las diluciones más comunes son:

1:5 (2 mL de muestra en 8 ml de agua grado reactivo);

1:10 (1 mL de muestra en 9 ml de agua grado reactivo) y;

1:20 (0.5 mL de muestra en 9.5 ml de agua grado reactivo).






Elegir la dilución más conveniente según la lectura de la absorbancia.


16 Anexos

Anexo 1. Esquema de corrida para 60 muestras

DUP2	DUP3	BLANCO	SPIKE1	SPIKE2	SPIKE3	SRM1	SRM2	SRM3
M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	BLANCO	DUP1
M46	M47	M48	M49	M50	BLANCO	M51	M52	M53
M38	M39	M40	BLANCO	M41	M42	M43	M44	M45
M30	BLANCO	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37
M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29
M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	BLANCO
M5	M6	M7	M8	M9	M10	BLANCO	M11	M12
[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	M1	M2	M3	M4
[0]	[5]	[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	[0]	[5]

Fuente: Elaboración DICA-AMSCLAE 2018

	Curva de calibración
	Blanco
	Duplicado
	Spike
	SRM


	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 8 Versión: 6 Fecha: 11/12/2018 Página: 13 de 13
	ANÁLISIS DE NITRATOS/NITRITOS	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Reyes (F. Barreno) Aprobado por: M. Dix

Anexo 2. Determinación de volumen de solución reductora a utilizar.

1. Realizar una curva de calibración de NO_2 a partir de la solución intermedia 1 mg/L de NO_2 con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:

<i>Concentración nominal [$\mu\text{g/L NO}_2^- \text{-N}$]</i>	<i>Volumen solución intermedia [μL]</i>	<i>Volumen de agua grado reactivo [ml]</i>
0	0	10.00
5	50	9.95
10	100	9.90
25	250	9.75
50	500	9.50
100	1000	9.00
200	2000	8.00

2. Graficar las absorbancias de las curvas de NO_2 vrs NO_3
 3. Utilizando la ecuación de regresión line $y=ax+b$ para determinar la correlación
- Nota: si la correlación es >1 se debe disminuir la cantidad de reactivo reductor y si es <0.9 disminuir la cantidad de reactivo reductor.

	Procedimiento Operacional Estándar ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄³⁻-P)	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 1 de 9 Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes
--	---	--

1. Propósito

Determinar concentración de fósforo reactivo soluble, ortofosfato, como $\mu\text{g/L PO}_4^{3-}\text{-P}$ en muestras de agua dulce.

2. Aplicación

El método es aplicable en el intervalo de 0-500 $\mu\text{g/L PO}_4^{3-}\text{-P}$. El límite de detección del método (LDM) es 1 $\mu\text{g/L}$. La precisión utilizando 20 mL de muestra es de $\pm 0.6 \mu\text{g/L}$ (nivel de confianza de 99%). El análisis de fósforo reactivo soluble es de tercera prioridad. No aplica para aguas con altas concentraciones de arsenatos (mayores a 100 $\mu\text{g/L As}$) o presencia de cromo hexavalente.

3. Principio

El ion fosfato es de gran importancia para todos los seres vivos y se regula mediante el ciclo del fósforo. Existen actividades naturales, pero sobre todo antropogénicas que, a través del tiempo, han provocado desequilibrio en este ciclo. El uso de fosfatos en productos de limpieza, fertilizantes y desechos orgánicos que llegan por distintas fuentes a cuerpos acuáticos, son una de las principales causas de la eutrofización, que es el crecimiento excesivo de algas y otros microbios que estaban previamente limitados. El crecimiento excesivo de algas, provoca malos olores, sabores y la producción de compuestos tóxicos. Además, la muerte de las algas y su descomposición requiere de grandes cantidades de oxígeno, reduciendo la concentración de oxígeno disuelto en el agua, lo cual conduce a la muerte de otros organismos acuáticos. Es por esto que es necesario el análisis de los niveles de fosfatos en los cuerpos acuáticos naturales (Yan, Z., Peñuelas, J., Sardans, J., *et al.*, 2016).

El ortofosfato se convierte en un complejo de fosfomolibdato al combinarse con molibdato en un medio acidificado. El complejo formado es de un color azul intenso que puede determinarse espectrofotométricamente.

4. Referencias

Murphy, J. y Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chemica Acta* 27: 31-36.

CEA 2010. Métodos de Análisis, Laboratorio de Análisis y Monitoreo, Centros de Estudios Atitlán, Universidad del Valle de Guatemala Altiplano.

Eaton, A. D. et al. (eds.). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Yan, Z., Peñuelas, J., Sardans, J., *et al.* 2016. Phosphorus accumulates faster than nitrogen globally in freshwater ecosystems under anthropogenic impacts. *Ecology Letters*. 19: 1237–1246. DOI: 10.1111/ele.12658.


5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de plancton POE - 2

Seguridad en el Laboratorio POE - 4

Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5

Procesamiento de muestras POE - 6

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 2 de 9
	ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄³⁻-P)	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

Litros (L)

Mililitros (mL)

Micro litros (μL)

Gramos (g)

Miligramos (mg)

Microgramos (μg)

Nanómetros (nm)

Centímetros (cm)

Mol (M)

Grados centígrados (°C)

Ultra violeta (UV)

Minutos (min.)

Segundos (s)

Concentración nominal: Concentración teórica obtenida por medio de procedimientos estandarizados por alguna entidad de metrología.

LDM (Límite de detección del método): cantidad mínima que puede ser detectada por una metodología.

Nro. CAS (Número de registro del Chemical Abstracts Service): identificación numérica única para compuestos químicos, secuencias biológicas, preparados y aleaciones (mezcla de dos o más metales).

Precisión del método: Capacidad de la metodología en dar los mismos resultados en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones.

Matriz: Es el conjunto de todas aquellas especies químicas (agua, compuestos orgánicos e inorgánicos) que acompañan al ortofosfato en la muestra analizada. La interferencia de la matriz se refiere a cualquier efecto que estas especies químicas tengan en la ejecución del método.

7. Materiales y reactivos

7.1 Reactivos

Ácido sulfúrico concentrado 95-97% H₂SO₄ (Nro. CAS: 7664-93-9)

Heptamolibdato de amonio tetrahidratado (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (Nro. CAS: 12054-85-2)


Tartrato de antimonio (III) y potasio trihidratado K₂(SbO)₂C₈H₄O₁₀ (Nro. CAS: 28300-74-5)

Ácido ascórbico C₆H₈O₆ (Nro. CAS: 50-81-7)

Dihidrofosfato de Potasio KH₂PO₄ (Nro. CAS: 7778-77-0)

Agua grado reactivo

Estándar de Referencia de ortofosfato

	Procedimiento Operacional Estándar ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄⁻³-P)	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 3 de 9 Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes
--	---	--

7.2 Cristalería

- 100 Tubos de ensayo con rosca (2.5 x 15 cm)
- 1 Balón aforados 25 mL.
- 2 Balones aforados 100 mL
- 1 Balón aforado 2000 mL
- 3 Erlenmeyer 250 mL
- 4 Beaker 100 mL

7.3 Equipo

- Gradillas para tubos de ensayo
- Pipetas 2-10 ml, 100-1000 µL, 20-200 µL
- Puntas para pipetas, varios volúmenes
- Espectrofotómetro UV-visible
- Celda de espectrofotómetro de 5 cm
- Vortex
- Balanza
- Bandejas de pesaje
- Espátulas

8. Recomendaciones de seguridad especiales

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, considerar las siguientes normas como importantes y obligatorias:

Precauciones con el molibdato de amonio:

Tras inhalación: aire fresco.


Contacto con la piel: Quitar inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua.

Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Retirar las lentillas.

Tras ingestión: hacer beber agua inmediatamente (máximo 2 vasos). Consultar a un médico.

9. Soluciones necesarias para el análisis (para 100 muestras)

Previo a realizar el análisis preparar, almacenar y tener listas las siguientes soluciones.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 4 de 9
	ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS ($PO_4^{3-}P$)	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Soluciones de digestión

9.1 Solución de molibdato-antimonio (preparación para 2000 mL)

Reactivos:	244 mL de ácido sulfúrico concentrado 21.0 g de heptamolibdato de amonio tetrahidratado 0.6 g de tartrato de antimonio y potasio trihidratado 2000 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 1500 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 2000 mL. Agregar lentamente 244 mL de ácido sulfúrico concentrado, (CUIDADO: aumento de temperatura). Mezclar y dejar que la solución se enfríe. Agregar el tartrato de antimonio y potasio trihidratado, agitar y disolver, agregar el heptamolibdato de amonio tetrahidratado y agitar hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Mantener a 4°C en un recipiente de vidrio. Desechar la solución cuando ya no colorea las soluciones de fosfato a azul.

Soluciones de coloración


9.2 Solución de ácido ascórbico 30 g/L (preparación para 25 mL)

Reactivos:	0.75 g de ácido ascórbico 25 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 10 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 25 mL. Agregar lentamente 0.75 g de ácido ascórbico lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante cuando se finalice el análisis.

Soluciones de referencia

9.3 Solución madre de ortofosfato de 1000 mg/L $PO_4^{3-}P$ (preparación para 100 mL)

Reactivos:	0.143 g de dihidrogenofosfato de potasio(secado al horno 110°C) 100 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.143 g de bifosfato de potasio y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 5 de 9
	ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄³⁻-P)	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9.4 Solución de ortofosfato de 100 mg/L PO₄³⁻ - P (preparación para 50 mL)

Reactivos:	5 mL de solución madre de ortofosfato 1000 mg/L PO ₄ ³⁻ - P (9.3) 50 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 5 mL de solución madre de ortofosfatos 1000 mg/L PO ₄ ³⁻ - P (9.3) y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.5 Solución madre de ortofosfato de 50 mg/L PO₄³⁻ - P (preparación para 50 mL)

Reactivos:	25 mL de solución madre de ortofosfato 100 mg/L PO ₄ ³⁻ - P (9.4) 50 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 25 mL de solución madre de ortofosfatos 100 mg/L PO ₄ ³⁻ - P (9.4) y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.


9.6 Solución de enriquecimiento 1 mg/L PO₄³⁻-P (Spike, preparación para 50 mL)

Reactivos	1 mL de solución madre de ortofosfato 50 mg/L PO ₄ ³⁻ - P (9.5) 50 mL agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 1 mL de solución madre de ortofosfato 50 mg/L PO ₄ ³⁻ - P (9.5) y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Preparar el mismo día del análisis y descartar el sobrante al finalizar el análisis.

9.7 Solución intermedia 1 mg/L - P (preparación para 50 mL)

Reactivos:	1 mL de solución madre de ortofosfato 50 mg/L PO ₄ ³⁻ - P 50 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 1 mL de solución madre de ortofosfato (9.5) y agitar lentamente hasta disolver. Luego aforar agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

Nota: La solución de enriquecimiento y la solución intermedia pueden ser preparadas como una misma solución.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 6 de 9
	ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄³⁻-P)	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10. Preparación de la corrida

La corrida es un grupo de tubos a los cuales se les realiza el mismo procedimiento de análisis, adición de reactivos, tiempos de reacción y lectura de las muestras, basado en la disponibilidad de cristalería, personal y equipo de laboratorio (Ver anexo 1).

10.1 Muestras

Medir y colocar 20 mL de muestra filtrada en un tubo de ensayo limpio. Nota: Si la concentración esperada de ortofosfato en la muestra es mayor al límite superior a la establecida en la curva de calibración, debe considerar realizar diluciones (ver inciso 15).

10.2 Curva de calibración

- Partiendo de la solución intermedia (9.7), preparar (por duplicado) 14 tubos con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:

Curva de calibración

<i>Concentración nominal [µg/L PO₄³⁻-P]</i>	<i>Volumen solución intermedia [µL]</i>	<i>Volumen de agua [mL]</i>
0	0	20.00
5	100	19.90
10	200	19.80
25	500	19.50
50	1000	19.00
100	2000	18.00
200	4000	16.00

10.3 Duplicados


Preparar duplicados en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir y colocar 20 mL de muestra elegida al azar en un tubo de ensayo limpio.

10.4 Blancos

Preparar por lo menos dos tubos con agua grado reactivo (blanco) los cuales serán incluidos al azar dentro de la corrida, o el 5% del total de muestras y deben ser preparados tal como se haría con cualquier otra muestra. Los blancos sirven para asegurar que las soluciones y la cristalería no estén contaminados. Si se encuentra una cantidad detectable de ortofosfato en un blanco la corrida se debe desechar y repetir el análisis con nuevas soluciones y cristalería limpia.

Medir y colocar 20 mL de agua grado reactivo en un tubo de ensayo limpio.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 7 de 9
	ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄⁻³-P)	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10.5 Muestras enriquecidas (Spikes)

Preparar tubos con muestras enriquecidas en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir 19 mL de una muestra escogida al azar y colocar en un tubo de ensayo limpio.

Agregar 1 mL de la solución de enriquecimiento (9.6) (Spike).

Agitar el tubo en el vortex.

10.6 Estándares de referencias (SRM)

Para el aseguramiento de la calidad del análisis, es necesario contar con un estándar de bifosfato de potasio. Preparar tres tubos con estándares de referencia para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir 20 mL de la solución de estándar de referencia. Nota: La solución de estándar de referencia (SRM) se debe preparar a manera que entre dentro de las concentraciones de la curva de calibración.

11. Procedimiento para análisis de muestras

Luego de haber preparado la corrida, seguir el procedimiento descrito a continuación para todos los tubos.

Añadir 2 mL de solución de molibdato-antimonio (9.1). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.

Añadir 0.2 mL de solución de ácido ascórbico 30 g/L (9.2). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.

Dejar las muestras incubar por, aproximadamente, 30 minutos.

Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 675 nm o, alternativamente, a 880 nm, en una celda de 5 cm.

12. Cálculos

12.1 Curva de calibración

En una hoja electrónica, calcular la función regresión lineal de curva Concentración vs. Absorbancia de los estándares de calibración.

$$y = ax + b$$

Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia.

12.2 Concentración


Con la función calculada en (12.1), calcular la concentración de cada muestra según sea la lectura del espectrofotómetro (11.5)

12.3 Control de calidad

Muestras enriquecidas (Spikes)

Calcular el porcentaje de recuperación (PR) con

$$PR = 100 \times \frac{\text{Concentración con spike} - \text{Concentración sin spike}}{50}$$

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 8 de 9
	ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄³⁻-P)	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Duplicados

Calcular la diferencia relativa con

$$DR = 200 \times \frac{\text{Concentración 1} - \text{Concentración 2}}{\text{Concentración 1} + \text{Concentración 2}}$$

Estándar de referencia

Calcular la diferencia del estándar (DE) con

$$DE = 100 \times \frac{\text{Concentración medida} - \text{Concentración nominal}}{\text{Concentración nominal}}$$

13. Criterios de aceptación

Los criterios de aceptación son los intervalos en los que se aceptarán los resultados del procedimiento como válidos.

Control de Calidad	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>Porcentaje de recuperación (PR)</i>	85%	115%
<i>Diferencia relativa (DR)</i>	-5%	5%
<i>Diferencia del estándar (DE)</i>	-15%	15%
<i>Blancos (B)</i>	< LD	< LD

Si el valor del control de calidad está entre el Valor Máximo y el Valor Mínimo el resultado del control se reporta como ACEPTABLE, de lo contrario se reporta como INACEPTABLE.

14. Reporte

14.1 Curva de calibración

Reportar la gráfica de concentración (eje y) vs. Absorbancia (eje x) de la curva de calibración (12.1) y la ecuación ($y = ax + b$). Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia. Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto.

14.2 Concentración de muestras


Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra (como $\mu\text{g/L PO}_4^{3-} - \text{P}$), indicar cuando esta sea menor que el límite de detección del método (2)

14.3 Control de calidad

Reportar los valores de cada control de calidad e indicar el resultado según el criterio de aceptación (13).

14.4 Presentación de datos

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 9 Versión: 6 Fecha: 20/11/2018 Página: 9 de 9
	ANÁLISIS DE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE ORTOFOSFATOS (PO₄⁻³-P)	Preparado por: O. García, A. Díaz Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

15. Notas

Si la concentración de la muestra es mayor a la máxima concentración considerada en la curva de calibración es necesario hacer una dilución de la muestra. Las diluciones más comunes son:

1:5 (4 mL de muestra en 16 ml de agua grado reactivo);

1:10 (2 mL de muestra en 18 ml de agua grado reactivo) y;

1:20 (1 mL de muestra en 19 ml de agua grado reactivo).






Elegir la dilución más conveniente según la lectura de la absorbancia.


Anexos

Anexo 1. Esquema de corrida para 60 muestras

DUP2	DUP3	Blanco	SPIKE1	SPIKE2	SPIKE3	SRM1	SRM2	SRM3
M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	Blanco	DUP1
M46	M47	M48	M49	M50	BLANCO	M51	M52	M53
M38	M39	M40	BLANCO	M41	M42	M43	M44	M45
M30	Blanco	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37
M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29
M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	Blanco
M5	M6	M7	M8	M9	M10	Blanco	M11	M12
[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	M1	M2	M3	M4
[0]	[5]	[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	[0]	[5]

Fuente: Elaboración DICA-AMSCLAE 2018

	Curva de calibración
	Blanco
	Duplicado
	Spike
	SRM

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019
	FÓSFORO TOTAL	Página 1 de 13 Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

1. Propósito

Determinar concentración de fósforo total, como $\mu\text{g/L-P}$ en muestras de agua de diferentes orígenes (i.e. aguas residuales, agua dulce y salada).

2. Aplicación

El método aplica en el intervalo de 0-400 $\mu\text{g/L-P}$. El límite de detección del método (LDM) es 2 $\mu\text{g/L}$. La precisión utilizando 20 mL de muestra es $\pm 0.6 \mu\text{g/L}$ (nivel de confianza de 99%). Esta metodología es análoga a la I-4600-85:00665 del USGS. El análisis no es prioritario, por lo que la muestra puede congelarse por algún tiempo. No aplica en aguas con alta concentración de arsenatos (mayores a 100 $\mu\text{g/L}$) o presencia de cromo hexavalente. La presencia de bario, plomo o plata puede causar precipitados. Es recomendable utilizar reactivos bajos en silicio (en forma de silicatos) ya que puede causar interferencias.

3. Principio

El fósforo es un nutriente limitante y esencial para los seres vivos. Se encuentra en forma de fosfatos, acumulados en rocas sedimentarias y a medida que se meteorizan o desgastan, el fósforo se filtra hacia el suelo y las aguas superficiales, quedando a disposición para el consumo de los seres vivos. Altos niveles de fósforo generados principalmente por el uso de fertilizantes y productos de limpieza, provocan la eutrofización, creando riesgos en el consumo del agua para cualquier ser vivo. Además, la muerte y descomposición de algas, reduce la concentración de oxígeno disuelto en el agua, lo que conduce a la muerte de otras especies acuáticas. Por esto es necesario el análisis de los niveles de fosfatos en los cuerpos acuáticos naturales (Yan, Z., Peñuelas, J., Sardans, J., *et al.*, 2016).

La materia orgánica presente es oxidada utilizando persulfato de potasio acidificado, obteniendo fósforo en forma de ortofosfato. Este ortofosfato se convierte en un complejo de fosfomolibdato al combinarse con molibdato en un medio acidificado. El complejo formado es de un color azul intenso que puede determinarse espectrofotométricamente a las longitudes de onda de 675 o 880 nm.

4. Referencias

Eaton, A. D. et al. (eds.). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2005.


Métodos de Análisis, Laboratorio de Análisis y Monitoreo, Centros de Estudios Atitlán, Universidad del Valle de Guatemala Altiplano. 2010.

Murphy, J. y Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chemica Acta* 27: 31-36.

Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.* 10:109.

Fishman, M. & Friedman, L. 1989. Methods for determination of inorganic substances in water and fluvial sediments. *Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey.*

Yan, Z., Peñuelas, J., Sardans, J., *et al.* 2016. Phosphorus accumulates faster than nitrogen globally in freshwater ecosystems under anthropogenic impacts. *Ecology Letters.* 19: 1237–1246.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019 Página 2 de 13
	FÓSFORO TOTAL	Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de Plancton POE - 2

Seguridad en el Laboratorio POE - 4

Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5

Procesamiento de muestras POE - 6

6. Terminología y abreviaciones

Litros (L)

Mililitros (mL)

Micro litros (μ L)

Gramos (g)

Miligramos (mg)

Microgramos (μ g)

Nanómetros (nm)

Centímetros (cm)

Normal (N)

Grados centígrados ($^{\circ}$ C)

Ultra violeta (UV)

Minutos (min.)


Concentración nominal: Concentración teórica obtenida por medio de procedimientos estandarizados por alguna entidad de metrología.

LDM (Límite de detección del método): cantidad mínima que puede ser detectada por una metodología.

CAS Nro. (Número de registro del Chemical Abstracts Service): es una identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones.

Precisión del método: Capacidad de la metodología en dar los mismos resultados en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones.

Matriz: Es el conjunto de todas aquellas especies químicas (agua, compuestos orgánicos e inorgánicos) que acompañan al ortofosfato en la muestra analizada. La interferencia de la matriz se refiere a cualquier efecto que estas especies químicas tengan en la ejecución del método.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019 Página 3 de 13
	FÓSFORO TOTAL	Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

7. Materiales y equipos

7.1 Reactivos


- Persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ (CAS Nro.: 7727-21-1)
- Ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4 36 N (CAS Nro.: 7664-93-9)
- Hidróxido de sodio en lentejas (CAS Nro.: 1310-73-2)
- Heptamolibdato de amonio tetrahidratado $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (CAS Nro.: 12054-85-2)
- Tartrato de antimonio (III) y potasio trihidratado $K_2(SbO)_2C_8H_4O_{10}$ (CAS Nro.: 28300-74-5)
- Ácido ascórbico $C_6H_8O_6$ (CAS Nro.: 50-81-7)
- Dihidrogenofosfato de potasio KH_2PO_4 (CAS Nro.: 7778-77-0)
- Fenoltaleína $C_{20}H_{14}O_4$ (CAS Nro.: 77-09-8)
- Etanol, solución acuosa al 95% (CAS Nro.: 64-17-5)
- Material de referencia estándar de ortofosfatos
- Material de referencia estándar de fósforo orgánico
- Agua grado reactivo
- Solución estándar de referencia (SRM)

7.2 Cristalería

- 100 Tubos de ensayo
- 1 Balón aforados 25 mL.
- 3 Balones aforados 100 mL.
- 1 Balón aforado 2000 mL.
- 3 Erlenmeyer 250 mL.
- 4 Beaker 100 mL com rosca (2.5 x 15 cm)

7.3 Equipo

- Gradillas para tubos de ensayo (resistentes a la autoclave)
- Pipetas 10-2 mL, 100-1000 μ L, 20-200 μ L
- Puntas para pipetas, varios volúmenes
- Espectrofotómetro UV-visible
- Celda de espectrofotómetro de 5 cm
- Vortex
- Balanza
- Espátulas
- Autoclave
- Agitador magnético
- Cronómetros
- Bandejas de pesaje

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019 Página 4 de 13
	FÓSFORO TOTAL	Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

8. Recomendaciones de seguridad especiales

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

1. El molibdato de amonio deshace la ropa. Utilice bata de manga larga y gafas de seguridad en todo momento y, en caso de salpicaduras en la ropa, remueva la prenda afectada.
2. Los reactivos de digestión (solución de persulfato de potasio, ácido sulfúrico e hidróxido de sodio) son muy corrosivos por lo que debe tenerse especial cuidado en su manejo.

La autoclave debe desaguar con agua luego de utilizarse con soluciones de persulfato de potasio y/o soluciones ácidas. Se debe drenar el agua de la autoclave al dejar de utilizarla.

9. Soluciones necesarias para el análisis (para 100 muestras)

Previo a iniciar el análisis deberá preparar, almacenar y tener listas estas soluciones. Las soluciones se dividen en: soluciones de digestión (9.1 a 9.4) y soluciones de coloración (9.5 a 9.6).

Soluciones de digestión

9.1 Solución de ácido sulfúrico 0.45M (preparación para 1 L)

Reactivos 25.2 mL de ácido sulfúrico concentrado (36 N)
 1000 mL de agua grado reactivo

Procedimiento Colocar 800 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 1000 mL. Agregar lentamente 25.2 mL de ácido sulfúrico concentrado moviendo constantemente, sea cuidadoso ya que este procedimiento eleva la temperatura. Mezclar y dejar que la solución se enfríe. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente. **NOTA:** Preparar en campana de extracción de gases encendida.


Almacenamiento Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.2 Solución de persulfato de potasio 4 g/L (preparación para 1 L)

Reactivos 4.0 g de persulfato de potasio
 1000 mL de agua grado reactivo

Procedimiento Colocar 500 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 1000 mL. Agregar lentamente 4.0 g de persulfato de potasio y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento Mantener en frasco ámbar a temperatura ambiente por un máximo de 6 meses.


 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019 Página 5 de 13
	FÓSFORO TOTAL	Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

9.3 Solución de digestión (ácido + persulfato) (preparación para 1 L)

Reactivos	500 mL de solución de ácido sulfúrico 0.45 M (9.2) 500 mL de solución de persulfato 4 g/L (9.3)
Procedimiento	Colocar 500 mL de solución de persulfato (9.3) en un balón aforado de 1000 mL. Luego, aforar con la solución de ácido sulfúrico 0.45 M (9.2) y agitar nuevamente.
Almacenamiento	Esta solución debe prepararse el mismo día del análisis y descartar el sobrante cuando se finalice el análisis.

9.4 Solución de hidróxido de sodio 10.8 N (preparación para 100 mL)

Reactivos	43.2 g de hidróxido de sodio en lentejas 100 mL de agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un beaker de 250 mL. Agregar lentamente 43.2 g de hidróxido de sodio en lentejas y agitar hasta disolver (usar agitador magnético si es necesario), sea cuidadoso ya que este procedimiento eleva la temperatura. Cuando la solución esté fría, traslade el contenido del beaker a un balón de 100 mL, lavando constantemente con aproximadamente 25 mL de agua. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente. NOTA: Preparar en campana de extracción de gases encendida.
Almacenamiento	Mantener en frasco de polietileno a temperatura ambiente por un máximo de 6 meses.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019
	FÓSFORO TOTAL	Página 6 de 13 Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

Soluciones de coloración

9.5 Solución de molibdato-antimonio (preparación para 2 L)

Reactivos	244.0 mL de ácido sulfúrico concentrado 21.0 g de heptamolibdato de amonio tetrahidratado 0.6 g de tartrato de antimonio y potasio trihidratado 2000 mL de agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 1500 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 2000 mL. Agregar lentamente 244 mL de ácido sulfúrico concentrado, (CUIDADO: aumento de temperatura). Mezclar y dejar que la solución se enfríe. Agregar el tartrato de antimonio y potasio trihidratado, agitar y disolver, agregar el heptamolibdato de amonio tetrahidratado y agitar hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento	Mantener a 4°C en un recipiente de polietileno. Desechar cuando ya no colorea las soluciones de fosfato a azul. Estable hasta un año.


9.6 Solución de ácido ascórbico 30 g/L (preparación para 25 mL)

Reactivos	0.75 g de ácido ascórbico 25 mL de agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 10.0 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 25 mL. Agregar lentamente 0.75 g de ácido ascórbico y agitar hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.
Almacenamiento	Esta solución debe prepararse el mismo día del análisis y descartarse el sobrante cuando se finalice el análisis. Si es necesario, puede almacenarse en una botella oscura a 4 °C por un máximo de 1 semana.

Soluciones de referencia

9.7 Solución madre de ortofosfato de 500 mg/L - P (preparación para 100 mL)

Reactivos	0.220 g dihidrogenofosfato de potasio (secado al horno 105 °C, 24 hrs) 100 mL de agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.220 g de dihidrogenofosfato de potasio y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.
Almacenamiento	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019 Página 7 de 13
	FÓSFORO TOTAL	Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

9.8 Solución madre de ortofosfato de 50 mg/L - P (preparación para 50 mL)

Reactivos	5 mL de solución madre de ortofosfato 500 mg/L PO_4^{3-} - P (9.8) 50 mL agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar lentamente 5.0 mL de solución madre de ortofosfato 500 mg/L PO_4^{3-} - P (9.8) y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.
Almacenamiento	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.9 Solución de enriquecimiento 1 mg/L -P (Spike, preparación para 100 mL)

Reactivos	2.0 mL de solución madre de ortofosfato 50 mg/L PO_4^{3-} - P (9.8) 100 mL agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 2.0 mL de solución madre de ortofosfato 50 mg/L PO_4^{3-} - P (9.8) y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.
Almacenamiento	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.10 Solución intermedia 1 mg/L - P (preparación para 100 mL)

Reactivos	2.0 mL de solución madre de ortofosfato 50 mg/L - P (9.8) 100 mL de agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 2.0 mL de solución madre de ortofosfato 50 mg/L PO_4^{3-} - P (9.8) y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.
Almacenamiento	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.


Nota: La solución de enriquecimiento y la intermedia pueden ser preparadas como una misma.

10. Preparación de la corrida

La corrida es un grupo de tubos a los cuales se les realiza el mismo procedimiento de análisis, adición de reactivos, tiempos de reacción y lectura de las muestras, basado en la disponibilidad de cristalería, personal y equipo de laboratorio (Ver anexo 1, ejemplo de corrida).

10.1 Muestras

Medir y colocar 20 mL de muestra cruda en un tubo de ensayo limpio. Nota: Si la concentración esperada de fósforo total en la muestra es mayor al límite superior a la establecida en la curva de calibración, debe considerar realizar diluciones (ver inciso 15).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019 Página 8 de 13
	FÓSFORO TOTAL	Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

10.2 Curva de calibración

Partiendo de la solución intermedia (9.10), preparar (por duplicado) 14 tubos con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla o una alternativa (ver el anexo 2):

<i>Curva de calibración</i>		
<i>Concentración nominal [µg/L - P]</i>	<i>Volumen solución intermedia [µL]</i>	<i>Volumen de agua [ml]</i>
0	0	20.00
5	100	19.90
10	200	19.80
25	500	19.50
50	1000	19.00
100	2000	18.00
200	4000	16.00

10.3 Duplicados

Preparar duplicados en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir y colocar 20 mL de muestra elegida al azar en un tubo de ensayo limpio.

10.4 Blancos

Preparar cuatro tubos o los que considere necesarios con agua grado reactivo (blanco) los cuales serán incluidos al azar dentro de la corrida. Los blancos sirven para asegurar que las soluciones y la cristalería no estén contaminados. Si se encuentra una cantidad detectable de fósforo total en un blanco la corrida se debe desechar y el análisis debe ser repetido con nuevas soluciones y cristalería limpia.

Medir y colocar 20 mL de agua grado reactivo en un tubo de ensayo limpio.


10.5 Muestras enriquecidas (Spikes)

Preparar tubos con muestras enriquecidas en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir 19 mL de una muestra escogida al azar y colocar en un tubo de ensayo limpio.

Agregar 1 mL de la solución de enriquecimiento (9.9) (Spike).

Agitar el tubo en el vortex.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019
	FÓSFORO TOTAL	Página 9 de 13 Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

10.6 Estándares de referencias (SRM)

Para el aseguramiento de la calidad del análisis, es necesario contar con un estándar de referencia de fósforo trazable hasta alguna entidad de metrología.

Preparar tres tubos con estándares de referencia para asegurar la precisión del procedimiento.

Medir 20 mL de la solución de estándar de referencia. Nota: La solución de estándar de referencia (SRM) se debe preparar a manera que entre dentro de las concentraciones de la curva de calibración.

11. Procedimiento de análisis

Luego de haber preparado la corrida, seguir el procedimiento descrito a continuación para todos los tubos.

Añadir 8.0 mL de solución de digestión (9.3). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.

Cerrar suavemente cada tubo con su tapa y colocar en la autoclave por 1 hr a 121 °C (103 kPa).

Después de enfriar. Añadir 0.3 mL (300 µL) de la solución de NaOH 10.8 N (9.4). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.

Añadir 2.0 mL de solución de molibdato-antimonio (9.5). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.

Añadir 0.2 mL de solución de ácido ascórbico 30 g/L (9.6). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.

Dejar las muestras reaccionar a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos.

Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 675 nm o, alternativamente a 880 nm, en una celda de 5 cm.

12. Cálculos

12.1 Curva de calibración


En una hoja electrónica calcular la regresión lineal de la curva Concentración vs. Absorbancia de los estándares de calibración.

$$y = ax + b$$

Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia.

12.2 Concentración

Con la función calculada en (12.1), calcular la concentración de cada muestra según sea la lectura del espectrofotómetro (11.8)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019 Página 10 de 13
	FÓSFORO TOTAL	Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

12.3 Control de calidad

Muestras enriquecidas (Spikes)

Calcular el porcentaje de recuperación (PR) con

$$PR = 100 \times \frac{\text{Concentración con spike} - \text{Concentración sin spike}}{50}$$

Duplicados

Calcular la diferencia relativa (DR) con

$$DR = 200 \times \frac{\text{Concentración 1} - \text{Concentración 2}}{\text{Concentración 1} + \text{Concentración 2}}$$

Estándar de referencia

Calcular la diferencia del estándar (DE) con

$$DE = 100 \times \frac{\text{Concentración medida} - \text{Concentración nominal}}{\text{Concentración nominal}}$$

Porcentaje de recuperación en la digestión: estándar de fósforo orgánico

El propósito de esta prueba es asegurar que el fósforo orgánico es completamente oxidado a ortofosfato durante la etapa de digestión.


Adicionalmente al estándar de referencia de ortofosfato, deben incluirse estándares de referencia de fósforo orgánico y calcular la diferencia del estándar (DE). Los criterios de aceptación están en (13). Esta prueba deberá realizarse cada vez que se preparen nueva solución de persulfato de potasio (9.2).

13. *Criterios de aceptación*

Los criterios de aceptación son los valores máximos y mínimos dentro de los cuales se aceptarán los resultados como válidos. Los criterios de aceptación para cada control de calidad son los siguientes:

<i>Control de Calidad</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
<i>Porcentaje de recuperación (PR)</i>	85%	115%
<i>Diferencia relativa (DR)</i>	-5%	5%
<i>Diferencia del estándar (DE)</i>	-15%	15%
<i>Blancos (B)</i>	< LD	< LD

Si el valor del control de calidad está entre el Valor Máximo y el Valor Mínimo el resultado del control se reporta como ACEPTABLE, de lo contrario se reporta como INACEPTABLE.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019
	FÓSFORO TOTAL	Página 11 de 13 Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

14. Reporte de datos

14.1 Curva de calibración

Reportar la gráfica de concentración (eje y) vs. Absorbancia (eje x) de la curva de calibración (12.1) y la ecuación ($y = ax + b$). Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia. Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto.

14.2 Concentración de muestras

Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra (como $\mu\text{g/L-P}$), indicar cuando este sea menor que el límite de detección del método ($2\mu\text{g/L}$)

14.3 Control de calidad

Reportar los valores de cada control de calidad e indicar el resultado como ACEPTABLE O INACEPTABLE para cada prueba realizada según el criterio de aceptación (13) (anexo 3).

14.4 Presentación de datos

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

15. Diluciones

Si la concentración de la muestra es mayor a la máxima concentración considerada en la curva de calibración es necesario hacer una dilución de la muestra. Las diluciones más comunes son:

1:5 (4 mL de muestra en 16 mL de agua grado reactivo);

1:10 (2 mL de muestra en 18 mL de agua grado reactivo) y;

1:20 (1 mL de muestra en 19 mL de agua grado reactivo).

Elegir la dilución más conveniente según la lectura de la absorbancia.



AMSCLAE

**Procedimiento
Operacional Estándar**

FÓSFORO TOTAL

POE - 10
Versión: 6
Fecha: 25/01/2019
Página 12 de 13






Preparado por: F. Santos, F. Barreno
Revisado por:
Aprobado por:


Anexos

Anexo 1. Esquema de corrida para 60 muestras

DUP2	DUP3	BLANCO	SPIKE1	SPIKE2	SPIKE3	SRM1	SRM2	SRM3
M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	BLANCO	DUP1
M46	M47	M48	M49	M50	BLANCO	M51	M52	M53
M38	M39	M40	BLANCO	M41	M42	M43	M44	M45
M30	BLANCO	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37
M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29
M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	BLANCO
M5	M6	M7	M8	M9	M10	BLANCO	M11	M12
[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	M1	M2	M3	M4
[0]	[5]	[10]	[25]	[50]	[100]	[200]	[0]	[5]

Fuente: Elaboración DICA-AMSCLAE 2018

	Curva de calibración
	Blanco
	Duplicado
	Spike
	SRM


 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 10 Versión: 6 Fecha: 25/01/2019
	FÓSFORO TOTAL	Página 13 de 13 Preparado por: F. Santos, F. Barreno Revisado por: Aprobado por:

Anexo 2. Alternativa de curva de calibración (la curva puede variar según la necesidad)

Partiendo de la solución intermedia (9.10), preparar (por duplicado) 32 tubos con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla, preparar las soluciones en balones aforados de 50 mL:

<i>Concentración nominal [$\mu\text{g/L NH}_4^+-\text{N}$]</i>	<i>Volumen solución intermedia [μL]</i>	<i>Volumen de agua grado reactivo [mL]</i>
0	0	50.00
1	50	49.95
2	100	49.90
4	200	49.80
5	250	49.75
6	300	49.70
8	400	49.60
10	500	49.50
20	1000	49.00
30	1500	48.50
40	2000	48.00
50	2500	47.5
60	3000	47.00
80	4000	46.00
100	5000	45.00
250	12500	37.50

Anexo 3. Ejemplo de reporte de datos

	Procedimiento Operacional Estándar NITRÓGENO TOTAL	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 1 de 15 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix
---	---	--

1. Propósito

Determinar la concentración de nitrógeno total, como $\mu\text{g/L-N}$ en muestras de agua dulce.

2. Aplicación

El método es aplicable en el intervalo de 0-500 $\mu\text{g/L-N}$. El límite de detección del método (LDM) es 30 $\mu\text{g/L}$. La precisión del método utilizando 10 mL de muestra es $\pm 3 \mu\text{g/L}$ (nivel de confianza de 99%). El análisis de nitrógeno total no es prioritario, por lo que puede congelarse y almacenarse la muestra por algún tiempo. Este análisis no aplica para aguas con concentraciones mayores a 5000 mg/L de ión sulfato; 1000 mg/L de calcio, sodio, potasio y cloruro; 150 mg/L de magnesio; 30 mg/L de fosfatos; 2 mg/L de S; o color mayor a 50 unidades de platino cobalto.

3. Principio


El nitrógeno en la materia orgánica presente y en forma de ión amonio es oxidado a nitrato utilizando persulfato de potasio. Una solución de hidrazina-cobre para reduce el nitrato a nitrito. Una reacción de diazotización de iones nitrito con sulfanilamida y el acoplamiento diazoico con N-(1-naftil) etilendiamina resulta en un compuesto azoico de color rojizo que puede determinarse espectrofotométricamente.

4. Referencias

1. Eaton, A. D. et al. (eds.). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
2. Métodos de Análisis, Laboratorio de Análisis y Monitoreo, Centros de Estudios Atitlán, Universidad del Valle de Guatemala Altiplano. 2010.
3. Strickland, J. D. H and Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of sea water analysis. Bulletin 167. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
4. Kamphake, L. J., Hannah, S. A. and J. M. Cohen. 1967. Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. Water Research, 1:205-216.
5. Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey. 1989. Methods for determination of inorganic substances in water and fluvial sediments Eds. Marvin J. Flshman and Linda C. Friedman.

5. Documentos asociados

1. Recolección y preservación de muestras POE - 2
2. Seguridad en el Laboratorio POE - 4
3. Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5
4. Procesamiento de muestras POE - 6

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017
	NITRÓGENO TOTAL	Página 2 de 15 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix


6. Terminología y abreviaciones

1. Litros (L)
2. Mililitros (mL)
3. Micro litros (μL)
4. Gramos (g)
5. Miligramos (mg)
6. Microgramos (μg)
7. Nanómetros (nm)
8. Centímetros (cm)
9. Normal (N)
10. Grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$)
11. Ultra violeta (UV)
12. Minutos (min.)
13. Concentración nominal: Concentración teórica obtenida por medio de procedimientos estandarizados por alguna entidad de metrología.
14. LDM (Límite de detección del método): cantidad mínima que puede ser detectada por una metodología.
15. Nro. CAS (Número de registro del Chemical Abstracts Service): es una identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones.
16. Precisión del método: Capacidad de la metodología en dar los mismos resultados en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones.
17. Matriz: Es el conjunto de todas aquellas especies químicas (agua, compuestos orgánicos e inorgánicos) que acompañan al ortofosfato en la muestra analizada. La interferencia de la matriz se refiere a cualquier efecto que estas especies químicas tengan en la ejecución del método.

7. Materiales y equipo

7.1 Reactivos

1. Persulfato de potasio $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($\leq 0.001\%$ N) (Nro.CAS: 7727-21-1)
2. Ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4 36 N (Nro. CAS: 7664-93-9)
3. Hidróxido de sodio en lentejas (Nro. CAS: 1310-73-2)
4. Fenol $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ (Nro. CAS: 108-95-2)
5. Sulfato de hidracina $\text{N}_2\text{H}_6\text{SO}_4$ (Nro. CAS: 10034-93-2)
6. Sulfato de cobre (II) pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Nro. CAS: 7758-99-8)
7. Sulfanilamida $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (Nro. CAS: 63-74-1)
8. Ácido clorhídrico fumante 37% HCl (7647-01-0)
9. N-(1-Naftil) etilendiamina diclorohidratado (NED) $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$ (Nro. CAS: 1465-25-4)
10. Nitrato de potasio KNO_3 (Nro. CAS: 7757-79-1)

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017
	NITRÓGENO TOTAL	Página 3 de 15 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix

11. Nitrito de sodio NaNO_2 (Nro. CAS: 7632-00-0)

7.2 *Cristalería*

1. 100 Tubos de ensayo con rosca (2.0 x 12.5 cm)
2. 1 Balón aforado 25 mL.
3. 1 Balón aforado 50 mL.
4. 5 Balones aforados 100 mL.
5. 1 Balón aforado 250 mL.
6. 2 Balones aforado 500 mL.
7. 3 Balones aforado 1000 mL.
8. 3 Erlenmeyer 250 mL.
9. 5 Beaker 100 mL


7.3 *Materiales y equipo*

1. Gradillas para tubo de ensayo (resistentes al autoclave)
2. Baño María
3. Pipetas 10-2 mL, 100-1000 μL , 20-200 μL
4. Puntas para pipetas, varios volúmenes
5. Espectrofotómetro UV-visible
6. Celda de espectrofotómetro de 5 cm
7. Vortex
8. Balanza
9. Bandejas de pesaje
10. Espátulas
11. Campana de extracción de gases
12. Cronómetro
13. Autoclave

8. **Recomendaciones**

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

1. Al utilizar fenol y sulfato de hidracina, hágalo en la campana de extracción de gases.
2. El sulfato de hidracina es muy tóxico. Evite la exposición directa con este reactivo. Utilice guantes, gafas protectoras, bata de manga larga y la campana de extracción de gases.
3. Los reactivos de digestión (solución de persulfato de potasio, ácido sulfúrico e hidróxido de sodio 10.8 N) son muy corrosivos por lo que debe tenerse especial cuidado en su manejo.
4. El autoclave debe desaguarse con agua luego de utilizarse con soluciones de persulfato de potasio y/o soluciones ácidas. Se debe drenar el agua del autoclave al dejar de utilizarla.

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 4 de 15</p>
	<p align="center">NITRÓGENO TOTAL</p>	<p>Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix</p>

9. Soluciones necesarias para el análisis (para 100 muestras)

Previo a iniciar el análisis deberá preparar la corrida en el cuaderno de laboratorio. Esta es la lista de muestras a analizar con su respectiva identificación (nombre, código o número de muestra), además de los estándares de calibración y los controles de calidad (blancos, muestras enriquecidas, duplicados y estándares de referencia) (10).

Recalcular la cantidad de reactivos a utilizar con base en el conteo total de muestras de la corrida y según sea conveniente. Las soluciones se dividen en: soluciones para la digestión (10.1 a 10.4), soluciones para la reducción (10.5 a 10.9), soluciones para coloración (10.10 a 10.12) y soluciones de referencia (10.13 a 10.15). Las soluciones de referencia deben estar preparadas antes de hacer la corrida, y las restantes estar disponibles cuando se vayan a utilizar según el procedimiento (11)

Soluciones para la digestión

9.1 Solución de ácido sulfúrico 0.45M (preparación para 1 L)

Reactivos

- 25.2 mL de ácido sulfúrico concentrado (36 N)
- 1000 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 800 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 1000 mL. Agregar lentamente 25.2 mL de ácido sulfúrico concentrado moviendo constantemente, sea cuidadoso ya que este procedimiento eleva la temperatura. Mezclar y dejar que la solución se enfríe. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente. NOTA: Preparar en campana de extracción de gases encendida.


Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.2 Solución de persulfato de potasio 4 g/L (preparación para 2 L)

Reactivos

- 8.0 g de persulfato de potasio
- 2000 mL de agua grado reactivo

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 5 de 15</p>
	<p align="center">NITRÓGENO TOTAL</p>	<p>Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix</p>

Procedimiento

Colocar 1000 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 2000 mL. Agregar lentamente 8.0 g de persulfato de potasio y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento

Mantener en frasco ámbar a temperatura ambiente por un máximo de 6 meses.

9.3 *Solución de digestión (ácido + persulfato) (preparación para 1 L)*

Reactivos

- 500 mL de solución de ácido sulfúrico 0.45 M (10.1)
- 500 mL de solución de persulfato 4 g/L (10.2)

Procedimiento

Colocar 500 mL de solución de persulfato (10.2) en un balón aforado de 1000 mL. Luego, aforar con solución de ácido sulfúrico 0.45 M (10.1) y agitar nuevamente.

Almacenamiento

Esta solución debe prepararse el mismo día del análisis y descartar el sobrante cuando se finalice el análisis.


9.4 *Solución de hidróxido de sodio 6 N (preparación para 100 mL)*

Reactivos

- 24.0 g de hidróxido de sodio en lentejas
- 100 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un beaker de 250 mL. Agregar lentamente 24.0 g de hidróxido de sodio en lentejas y agitar hasta disolver (usar agitador magnético si es necesario), sea cuidadoso ya que este procedimiento eleva la temperatura. Cuando la solución esté fría, traslade el contenido del beaker a un balón de 100 mL lavando constantemente con aproximadamente 25 mL de agua. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente. **NOTA:** Preparar en campana de extracción de gases encendida.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 6 de 15
	NITRÓGENO TOTAL	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix

Almacenamiento

Mantener en frasco de polietileno a temperatura ambiente por un máximo de 6 meses.

Soluciones para la reducción

9.5 *Solución de hidracina 0.037 M (preparación para 250 mL)*

Reactivos

- 1.20 g de sulfato de hidracina
- 250 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 125 mL de etanol en un balón aforado de 250 mL. Agregar lentamente 1.20 g de sulfato de hidracina y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente. Evitar la inhalación y la exposición con la piel. NOTA: Debido a la toxicidad de la hidracina, esta solución debe prepararse en la campana de extracción de gases encendida.

Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.6 *Solución de cobre 0.0016 M (preparación para 100 mL)*

Reactivos


- 0.040 g de sulfato de cobre pentahidratado
- 100 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.040 g de sulfato de cobre pentahidratado y agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses. Cuando la solución cambie a color azul o enturbie, debe ser descartada apropiadamente.

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017</p>
	<p align="center">NITRÓGENO TOTAL</p>	<p>Página 7 de 15</p> <p>Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix</p>

9.7 *Solución reductora (preparación para 25 mL)*

Reactivos

- 12.5 mL de solución de hidracina 0.037 M (10.5)
- 2.5 mL de solución de cobre 0.0016 M (10.6)
- 10 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Agregar 12.5 mL de solución de hidracina 0.037 M y 2.5 mL de solución de cobre 0.0016 M en un balón aforado de 25 mL. Aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento

Esta solución debe prepararse el mismo día del análisis y descartar el sobrante cuando se finalice el análisis.

9.8 *Solución de hidróxido de sodio 1.0 M (preparación para 1000 mL)*

Reactivos

- 40.0 g de sodio hidróxido en lentejas
- 1000 mL de Agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 500 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 1000 mL. Agregar lentamente 40.0 g de hidróxido de sodio y agitar lentamente hasta disolver, sea cuidadoso ya que este procedimiento podría elevar la temperatura. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.


Almacenamiento

Mantener en frasco de polietileno a temperatura ambiente por un máximo de 6 meses.

9.9 *Buffer de fenolato 0.19 M (preparación para 50 mL)*

Reactivos

- 0.9 g de fenol
- 7.5 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 M (10.8)
- 50 mL de agua grado reactivo

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 8 de 15</p>
	<p align="center">NITRÓGENO TOTAL</p>	<p>Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix</p>

Procedimiento

Colocar 25 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 50 mL. Agregar 0.9 g de fenol y agitar lentamente hasta disolver. Agregar 7.5 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 M y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente. **NOTA:** Debido a la toxicidad y a las propiedades irritantes del fenol, esta solución debe prepararse en la campana de extracción de gases encendida.

Almacenamiento

Esta solución debe prepararse el mismo día que el análisis y descartar los sobrantes cuando se finalice el análisis.

Soluciones para la coloración

9.10 Solución de sulfanilamida 10 g/L (preparación para 500 mL)

Reactivos

- 5.0 g de sulfanilamida
- 20.0 mL de ácido clorhídrico (37%)
- 500 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 250 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 500 mL. Agregar muy lentamente 20.0 mL de ácido clorhídrico (37%) y agite, sea cuidadoso ya que este procedimiento eleva la temperatura. Agregar lentamente 5.0 g de sulfanilamida y agitar hasta disolver, de ser necesario puede utilizar un agitador magnético. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.


9.11 Solución NED 1 g/L (preparación para 500 mL)

Reactivos

- 0.5 g de N-(1-Naftil) etilendiamina diclorohidrato (NED)
- 500 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 250 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 500 mL. Agregar 0.5 g de NED, agitar lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 9 de 15
	NITRÓGENO TOTAL	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix

Almacenamiento

Esta solución debe prepararse al menos mensualmente y debe almacenarse en un recipiente oscuro a 4°C. Si presenta una coloración café debe desecharse apropiadamente.

9.12 *Reactivo combinado (preparación para 100 mL)*

Reactivos

- 50 mL de solución de sulfanilamida 10 g/L (10.9)
- 50 mL de solución NED 1 g/L (10.10)

Procedimiento

Verter en un Erlenmeyer de 250 mL, 50 mL de la solución de sulfanilamida 10 g/L y luego 50 mL de solución NED 1 g/L. Mezclar bien.

Almacenamiento

Esta solución debe prepararse el mismo día del análisis y debe almacenarse en un recipiente oscuro o en lugar oscuro, deberá descartarse el sobrante cuando se finalice el análisis.

Soluciones de referencia

9.13 *Solución madre de nitrato de 50 mg/L - N (preparación para 100 mL)*

Reactivos

- 0.03607 g de nitrato de potasio (secado al horno a 105 °C por 24 horas)
- 100 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.03607 g de nitrato de potasio y agite lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo.


Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.14 *Solución de enriquecimiento 1 mg/L - N (Spike, preparación para 100 mL)*

Reactivos

- 2.0 mL de solución madre de nitrato 50 mg/L - N (10.9)

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 10 de 15
	NITRÓGENO TOTAL	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix

- 100 mL agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar 2.0 mL de solución madre de nitrato 50 mg/L NO₃-N) (10.9), y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.15 Solución intermedia 1 mg/L - N (preparación para 100 mL)

Reactivos

- 2.0 mL de solución madre de nitrato 50 mg/L - N (10.9)
- 100 mL agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar 2.0 mL de solución madre de nitrato 50 mg/L NO₃--N) (10.9), y agitar. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.16 Solución madre de nitrito 50 mg/L – NO₂- N (preparación para 100 mL)

Reactivos


- 0.02464 g de nitrito de potasio (secado al horno a 105 °C por 24 horas)
- 100 mL de agua grado reactivo

Procedimiento

Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 0.02464 g de nitrito de sodio y agite lentamente hasta disolver. Luego, aforar con agua grado reactivo.

Almacenamiento

Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017
	NITRÓGENO TOTAL	Página 11 de 15 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix

10. Preparación de la corrida

La corrida es un grupo de tubos a los cuales se les realiza el mismo procedimiento de análisis, adición de reactivos, tiempos de reacción y lectura de las muestras, basado en la disponibilidad de cristalería, personal y equipo de laboratorio (Ver anexo 1, ejemplo de una corrida).

10.1 Muestras

Medir y colocar 10.0 mL de muestra en un tubo de ensayo limpio. Nota: Sí la concentración esperada de amonio en la muestra es mayor al límite superior a la establecida en la curva de calibración, debe considerar realizar diluciones (ver inciso 15).

10.2 Curva de calibración

Partiendo de la solución intermedia (9.7), preparar (por duplicado) 14 tubos con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:


<i>Concentración nominal [µg/L - N]</i>	<i>Volumen solución intermedia [µL]</i>	<i>Volumen de agua [mL]</i>
0	0	10.00
5	50	9.95
10	100	9.90
25	200	9.75
50	500	9.50
100	1000	9.00
200	2000	8.00

10.3 Duplicados

1. Preparar duplicados en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento.
2. Medir y colocar 10.0 mL de muestra elegida al azar en un tubo de ensayo limpio.

10.4 Blancos

1. Preparar dos tubos con agua grado reactivo (blanco) los cuales serán incluidos al azar dentro de la corrida. Los blancos sirven para asegurar que las soluciones y la cristalería no estén contaminadas. Si se encuentra una cantidad detectable de amonio en un blanco la corrida se debe desechar y el análisis debe ser repetido con nuevas soluciones y cristalería limpia.

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 12 de 15</p>
	<p align="center">NITRÓGENO TOTAL</p>	<p>Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix</p>

2. Medir y colocar 10.0 mL de agua grado reactivo en un tubo de ensayo limpio.

10.5 Muestras enriquecidas (Spikes)

1. Preparar tubos con muestras enriquecidas en un 5% del total de las muestras o mínimo dos muestras para asegurar la precisión del procedimiento.
2. Medir 9.5 mL de una muestra escogida al azar y colocar en un tubo de ensayo limpio.
3. Agregar 0.5 mL de la solución de enriquecimiento (9.6) (Spike).
4. Agitar el tubo en el vortex.


10.6 Estándares de referencia (SRM)

1. Para el aseguramiento de la calidad del análisis, es necesario contar con un estándar de referencia de amonio trazable hasta alguna entidad de metrología.
2. Preparar tres tubos con estándares de referencia para asegurar la precisión del procedimiento.
3. Medir 10 mL de la solución de estándar de referencia. Nota: La solución de estándar de referencia (SRM) se debe preparar a manera que entre dentro de las concentraciones de la curva de calibración.

11. Procedimiento de análisis

Luego de haber preparado la corrida, seguir el procedimiento descrito a continuación para todos los tubos:

1. Añadir 4.0 mL de solución de digestión (9.3). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.
2. Cerrar, sin apretar, cada tubo con su tapa y colocar en la autoclave por 1 hr a 121 °C (103 kPa). Forrar la gradilla con papel aluminio para evitar derrames en caso que se quiebre algún tubo.
3. Después de enfriar, añadir 0.200 mL (200 µL) de la solución de NaOH 6 N (9.4). Agitar en el vortex por al menos 30 segundos.
4. Colocar las muestras en el baño María con una temperatura de 37 °C y dejarlas estabilizar por lo menos 45 minutos. Deben cubrirse los tubos con su tapa o, alternativamente, usar parafilm.
5. Mientras los tubos están en el baño María, agregar 0.4 mL (400 µL) de buffer de fenolato (9.9) seguido inmediatamente de 0.2 mL (200 µL) de solución reductora (9.7). Agitar en el vortex a alta velocidad por al menos 30 s.
6. Dejar las muestras incubar por exactamente 30 minutos, tomando en cuenta el orden y tiempo de agregar el reactivo.
7. Quitar las muestras del baño María y dejarlas enfriar a temperatura ambiente por 40 minutos. Luego agregar 0.4 mL (400µL) del reactivo combinado (9.12) a cada muestra. Agitar en el vortex a alta velocidad por al menos 30 s.

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 13 de 15</p>
	<p align="center">NITRÓGENO TOTAL</p>	<p>Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix</p>

8. Dejar las muestras por 30 minutos, pero no más de 2 horas para que el color aparezca.
9. Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 543 nm en una celda de 5 cm, antes que se cumplan las dos horas.

12. Cálculos

12.1 Curva de calibración

En una hoja electrónica calcular la función regresión lineal de curva Concentración vs. Absorbancia de los estándares de calibración.

$$y = ax + b$$

Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia.

12.2 Concentración

Con la función calculada en el inciso (12.1), calcular la concentración de cada muestra según sea la lectura del espectrofotómetro (11.10)

12.3 Control de calidad

Muestras enriquecidas (Spikes)

Calcular el porcentaje de recuperación (PR) con

$$PR = 100 \times \frac{\text{Concentración con spike} - \text{Concentración sin spike}}{50}$$


Duplicados

Calcular la diferencia relativa (DR) con

$$DR = 200 \times \frac{\text{Concentración 1} - \text{Concentración 2}}{\text{Concentración 1} + \text{Concentración 2}}$$

Estándar de referencia (SRM)

Calcular la diferencia del estándar (DE) con

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017 Página 14 de 15
	NITRÓGENO TOTAL	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix

$$DE = 100 \times \frac{\text{Concentración medida} - \text{Concentración nominal}}{\text{Concentración nominal}}$$

13. Criterios de aceptación

Los criterios de aceptación son los valores máximos y mínimos dentro de los cuales se aceptarán los resultados como válidos. Los criterios de aceptación para cada control de calidad son los siguientes:

<i>Control de Calidad</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
<i>Porcentaje de recuperación (PR)</i>	65%	135%
<i>Diferencia relativa (DR)</i>	-10%	10%
<i>Diferencia del estándar (DE)</i>	-10%	10%
<i>Blancos (B)</i>	< LD	< LD

Si el valor del control de calidad está entre el Valor Máximo y el Valor Mínimo el resultado del control se reporta como ACEPTABLE, de lo contrario se reporta como INACEPTABLE.


14. Reporte de datos

14.1 Curva de calibración

Reportar la gráfica de concentración (eje y) vs. Absorbancia (eje x) de la curva de calibración (12.1) y la ecuación ($y = ax + b$). Donde y es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y x es la absorbancia. Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto.

14.2 Concentración de muestras

Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra (como $\mu\text{g/L NH}_4^+ - \text{N}$), indique cuando esta sea menor que el límite de detección del método ($3 \mu\text{g/L}$).

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 11 Versión: 3 Fecha: 21/02/2017</p>
	<p align="center">NITRÓGENO TOTAL</p>	<p>Página 15 de 15 Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes, F. Barreno Aprobado por: M. Dix</p>

14.3 Control de calidad

Reportar los valores de cada control de calidad e indique el resultado según el criterio de aceptación (13) (Anexo 2).

14.4 Presentación de datos

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

15. Notas


Si la concentración de la muestra es mayor a la máxima concentración considerada en la curva de calibración es necesario hacer una dilución de la muestra. Las diluciones más comunes son:

1:5 (2 mL de muestra en 8 ml de agua grado reactivo);

1:10 (1 mL de muestra en 9 ml de agua grado reactivo) y;

1:20 (0.5 mL de muestra en 9.5 ml de agua grado reactivo).

Elegir la dilución más conveniente según la lectura de la absorbancia.

	Procedimiento Operacional Estándar ANÁLISIS DE PLANCTON	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 1 de 11 Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix
--	--	--

1. Propósito

Analizar las muestras de plancton mediante la identificación y conteo de los géneros de organismos presentes, con el fin de evaluar la diversidad y abundancia relativa de la comunidad planctónica del Lago de Atitlán.

2. Aplicación

El procedimiento es aplicable a muestras de plancton colectadas en campo.

3. Principio

El *plancton* es el conjunto de organismos microscópicos que flota en aguas saladas o dulces. Comúnmente se subdivide en fitoplancton y zooplancton.

Los productores primarios del plancton son conocidos como *fitoplancton*. Incluye a las cianobacterias (División Cianoprocariota), algas verdes (División Chlorophyta), algas pardas o pardodoradas (División Chrysophyta) las cuales incluyen a las Bacillariophyceae o diatomeas, euglenas (División Euglenophyta), dinoflagelados (División Pyrrophyta) y la División Cryptophyta (cryptomonadas). Cabe mencionar que los ficólogos no se han puesto de acuerdo con las divisiones taxonómicas mayores y las guías para identificación pueden diferir en cuanto a las divisiones taxonómicas descritas arriba.

El *zooplancton* está conformado por todos los organismos microscópicos de origen animal que flotan libres en el agua, principalmente protozoos, rotíferos y microcrustáceos (cladóceros y copépodos).

Debido a que la composición y la abundancia del plancton depende de factores como las condiciones físicas e hidrológicas (p.ej. luz, temperatura, turbulencia), la composición química del agua (nutrientes, materia orgánica, entre otros) y factores biológicos (relaciones ecológicas), el plancton es uno de los indicadores biológicos más comúnmente utilizado para determinar el estado ecológico de un cuerpo de agua; por lo que su monitoreo es necesario para comprender el comportamiento de los lagos.

Se puede trabajar cualitativamente o cuantitativamente. Para determinaciones rápidas se puede usar jalados verticales de profundidad determinada con red de plancton o muestras integradas de profundidad determinada. Para muestras cuantitativas en muchos lagos, incluyendo el Lago Atitlán es necesario concentrar las muestras para su conteo.

4. Referencias

Bellinger, E. C. & D. C. Sigeo. 2010. Freshwater algae Identification and use as bioindicators. Wiley-Blackwell. UK. 270p.


Confederación Hidrográfica del Ebro; URS; Vicente, E; de Hoyos, C; Sánchez, P; Cambra, J. (2005). *Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton*. España. 43 p.

González de Infante, A. 1988. El plancton de las aguas continentales. Serie de Biología Monografía No. 33. 130p. O.A. Washington D.C. USA.

Roldán Pérez, G. y Ramírez Restrepo, J.J. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical*. 2ª Ed. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.

Thorp, J.H. y A.P. Covich. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates.

Wehr, J. y R. Sheath. 2003. Freshwater Algae of North America Ecology and Classification. Academic Press. Nueva York.919p.

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 2 de 11</p>
	<p align="center">ANÁLISIS DE PLANCTON</p>	<p>Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix</p>

Eaton, A. D. et al. (eds.). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2005.

<http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>

<http://www.algaebase.org/>

5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras POE - 2

Procesamiento de muestras POE - 6

Guía de identificación de plancton del lago Atilán.

Hoja de datos y cálculos

6. Terminología y abreviaciones

Litros (L)

Mililitros (mL)

Milímetros cúbicos (mm³)

Micrómetros cúbicos (µm³)

Gramos (g)

Metros (m)

Centímetros (cm)

Milímetros (mm)

Horas (hrs.)

Onzas (oz)

Volumen (Vol.)

Células (Cel.)

Organismos (Org.)

Abundancia relativa (AR)


Cámara de Conteo Sedgewick- Rafter: Es ampliamente utilizada para conteo de fito- y zooplancton. El tamaño de la celda es de 50mm x 20mm x 1mm con un volumen de 1ml, y el fondo está dividido en cuadros de 1µL. Existen otras cámaras como Palmer- Maloney, hematocitómetro que pueden ser usadas (Ver Standard Methods).

7. Seguridad

Al momento de analizar las muestras, utilizar bata de laboratorio y guantes para evitar el contacto con la solución de Lugol que podría manchar o teñir piel y ropa y con el formol el cual es tóxico.

Es importante que las muestras se conserven siempre en oscuridad ya que el Lugol se degrada por foto-oxidación.

8. Materiales y Equipo

	Procedimiento Operacional Estándar ANÁLISIS DE PLANCTON	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 3 de 11 Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix
--	--	--

8.1 Reactivos

- Solución de Lugol (Solución diluida de yodo y yoduro potásico para microscopia).
- Solución de formaldehído

8.2 Equipo

- Microscopio óptico
- Cámara de Sedgewick-Rafter
- Contadores manuales Probetas (varios volúmenes)
- Filtros Whatman No. 1
- Cajas Petri o bandejas de pesaje
- Pinzas con punta plana
- Embudos (distintos tamaños)
- Papel aluminio
- Marcadores permanentes
- Cinta adherible de colores
- Guantes
- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad
- Mascarillas
- Jeringas con aguja (10 ml)
- Pizetas


8.3 Cristalería

- Pipetas de vidrio y pipetores
- Portaobjetos y cubreobjetos (22 x 50 mm, 22 x 40 mm, 22 x 22 mm, 24 x 24 mm)
- Viales de vidrio o tubos Vacutainer (15 ml aprox.)
- Frascos de vidrio (20 oz)

9. Preparación de soluciones

9.1 Solución de Lugol (preparación para 220 mL)

- Reactivos:
- Yodo (cristales) 10 g
 - Potasio Yoduro 20 g
 - Agua destilada 200 mL
 - Ácido acético glacial 20 mL

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 4 de 11</p>
	<p align="center">ANÁLISIS DE PLANCTON</p>	<p>Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix</p>

Procedimiento: Preparar una solución de 10 g de yodo y 20 g de yoduro de potasio en 200 mL de agua. Agite hasta disolver los sólidos.
 Agregar lentamente 20 mL de ácido acético. Agite nuevamente.

10. Procedimientos

10.1 Muestras integradas recolectadas con red de plancton. Análisis cualitativo.

Muestras vivas (frascos de 4 oz)

La muestra con organismos vivos se debe revisar e identificar el mismo día de la recolecta o antes de 24 hrs.

Antes de realizar los conteos se deberá hacer una revisión microscópica rápida de la muestra. Agitar cuidadosamente la muestra al menos tres veces y tomar una sub-muestra de aproximadamente 3 gotas con una pipeta de Pasteur y depositarla en un portaobjeto y cubreobjetos para identificar los organismos presentes, iniciar con un aumento de 40 x e ir aumentando hasta 400 x. Al finalizar, regresar la muestra cuidadosamente a su mismo frasco.

Luego de haber identificado y anotado los principales organismos presentes en la muestra, agitar nuevamente y cuidadosamente la muestra al menos tres veces y tomar una muestra de 1 mL con una pipeta de Pasteur. Depositar la muestra en la cámara de Sedgewick-Rafter y cubrir la cámara con un cubreobjetos, deslizándolo suavemente sobre los bordes de la cámara. Asegurar que no queden burbujas en la celda. Una vez montada la muestra en la cámara se procede, nuevamente, a revisar rápidamente con un microscopio los géneros presentes en la muestra. Se recomienda iniciar con un aumento de 40 x y aumentar a 100 x. Realizar este proceso por lo menos tres veces, antes de iniciar el conteo en los transectos. Antes de empezar el conteo se deja sedimentar la muestra ya montada por 15 minutos (con la luz del microscopio apagada para que no se caliente la muestra).

Posteriormente, iniciar la identificación y el conteo de los organismos con un microscopio, realizando transectos de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha (Fig. 1). Se recomienda iniciar con un aumento de 40 x aumentar luego a 100 x.

La identificación y conteo se debe suspender cuando se lleguen a contar por lo menos 100 organismos. Reportar el número de cuadros en los cuales se contaron los organismos. Al finalizar, regresar la muestra cuidadosamente a su mismo frasco. Este proceso se repite 3 veces. Se recomienda también anotar los nombres de lo identificado, así como dibujar o fotografiarlos para referencia futura.

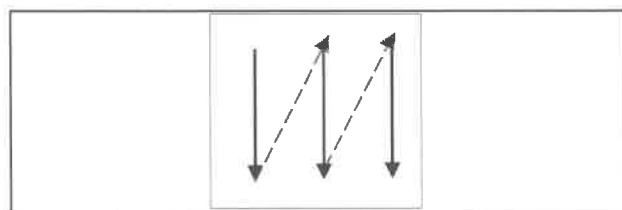
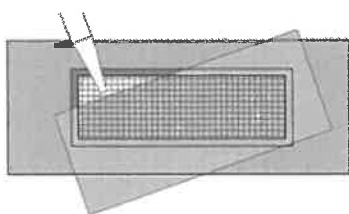




Figura 1.

Cámara de Sedgewick-Rafter y dirección de los transectos

 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 5 de 11
	ANÁLISIS DE PLANCTON	Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix

En el caso de ser organismos que forman colonias, se contarán únicamente las colonias, al igual los que forman filamentos. Al concluir el conteo, se debe revisar toda la cámara y anotar cualquier taxón que no se haya incluido en el conteo, pero que esté presente en la muestra. Se recomienda tomar fotografías de cada uno de los taxones encontrados.

Los vacutainers o las muestras deben colocarse en un sitio ventilado y sin influencia de luz solar.

Muestras fijadas en Lugol o en formaldehído (frascos de 4 oz)

Los frascos forrados con papel aluminio si tienen Lugol deberán ser almacenados en un lugar con nula o poca luz solar.

Se sigue el mismo procedimiento detallada arriba para muestras vivas. Frecuentemente es necesario concentrar las muestras por medio de sedimentación o filtración.

Nota: Si no cuenta con una cámara Sedgewick-rafter, la identificación y conteo se puede realizar solo en el portaobjeto.

10.2 Muestras integradas recolectadas con manguera (125 ml. Aprox.)

Sedimentación de muestras

Las muestras de 125 mL, colectadas con manguera y luego filtradas en campo con una red de plancton y fijadas con Lugol, al ingresar al laboratorio se deben colocar en una superficie plana, con nula o poca influencia de luz solar, por al menos 24 horas para que el proceso de sedimentación inicie. Las muestras no deben moverse para evitar la re-suspensión del plancton.

El volumen inicial se debe reducir a 50 mL para iniciar el segundo periodo de sedimentación (Fig. 2). Con ayuda de una pipeta, se debe extraer lenta y cuidadosamente el exceso de muestra, evite ocasionar algún disturbio que pueda re-suspender el plancton. Después de haber reducido el volumen, agitar cuidadosamente la botella y verter la muestra en una probeta de 50 mL (Fig. 2), correctamente etiquetada y dejar sedimentar por otras 24 horas. Las muestras deben quedarse nuevamente en una superficie plana, con poca o nula influencia de luz solar y sin moverse.

Después del segundo periodo de sedimentación, la muestra de la probeta debe decantarse con la ayuda de una pipeta hasta obtener un volumen final de 10 mL (Fig. 2). Este proceso debe realizarse lentamente y cuidadosamente para evitar extraer el material que se ha sedimentado. Inmediatamente, vierta el contenido de la probeta dentro del vial de vidrio o vacutainer (Fig. 2), previamente etiquetado, para su posterior identificación y análisis. La información que debe incluirse en la etiqueta es la siguiente: (localidad, profundidad, tipo de muestreo, fecha de muestreo y colector, hora de muestreo, método de fijación).


	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 6 de 11
	ANÁLISIS DE PLANCTON	Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix



Figura 2. Pasos para preparación de muestras.

Identificación y conteo de algas mediante cámara de Sedgewick-Rafter

Se sigue exactamente el mismo procedimiento detallado en 10.1.

Reportar el número de cuadros en los cuales se contaron los organismos. Al finalizar, regresar la muestra cuidadosamente a su mismo frasco.

En el caso de ser organismos que forman colonias, se contarán únicamente las colonias, al igual los que forman filamentos. Al concluir el conteo, se debe revisar toda la cámara y anotar cualquier taxa que no se haya incluido en el conteo, pero que esté presente en la muestra. Se recomienda tomar fotografías de cada uno de los taxa encontrados.

Los vacutainers o las muestras deben colocarse en un sitio ventilado y sin influencia de luz solar.



Nota: Si no cuenta con una cámara Sedgewick-rafter, la identificación y conteo se puede realizar solo en el portaobjeto.

Identificación y conteo de algas mediante portaobjetos

En un portaobjetos se colocan aproximadamente 2 gotas de muestra (~ 0.1 mL) previamente homogenizada (agitarla suavemente antes de montarla en el portaobjetos), se coloca el cubreobjetos y se procede a observar la muestra en el microscopio. Una vez montada la muestra se procede a hacer una revisión rápida de los taxa en la muestra. Se recomienda iniciar con un aumento de 40 x y luego aumentar a 400 x. Realizar este proceso por al menos tres veces, antes de iniciar el conteo.

Posteriormente, iniciar la identificación y el conteo de los organismos, realizando transectos de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha. Se recomienda realizar el conteo con un aumento de 100X. Se debe anotar cuántos organismos se contaron por taxa. El conteo se debe suspender cuando se lleguen a contar 400 organismos. Por cada ~ 0.1 mL se debe contar 100 organismos, es decir, que se deben montar cuatro submuestras en el portaobjetos.

En el caso de ser organismos que forman colonias, se contarán únicamente las colonias, al igual los que forman filamentos. Al concluir el conteo, se debe revisar todo el portaobjetos y anotar cualquier taxa que no se haya incluido en el conteo, pero que esté presente en la muestra. Se recomienda tomar fotografías de cada uno de los taxa encontrados.

 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 7 de 11
	ANÁLISIS DE PLANCTON	Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix

Nota: Anotar el tamaño del cubreobjetos para calcular el área y/o volumen examinado. Estos valores servirán para realizar los cálculos de densidad (cel./L).

10.3 Muestras a distintas profundidades en la columna de agua

Estas muestras frecuentemente necesitan ser concentradas por sedimentación (método igual a lo usada para las muestras integradas) o por filtración.

Muestra con Lugol (Botella de 500 mL)

Método de filtración.

Al ingresar las muestras al laboratorio, se deben colocar las muestras en un área con nula o poca influencia de luz solar. Antes de iniciar el filtrado de las muestras, preparar el equipo para filtrar, de la siguiente forma:

- Doblar el filtro cuidadosamente sobre sí mismo cuatro veces. Evitar doblar más de una vez el centro del filtro. Al finalizar extender el filtro.
- Luego de extender el filtro juntar dos lados del mismo y acomodar sobre el embudo, de manera que queden solo 6 o 4 lados (esto depende del tamaño del embudo o del filtro).
- Una vez listo el embudo con el filtro, colocar sobre el frasco para proceder al filtrado de la muestra por gravedad.

Antes de proceder al filtrado, agitar cuidadosamente tres veces la botella y verter el contenido lentamente sobre las paredes del papel filtro, hasta que se termine la muestra. Evite verter la muestra en el centro del embudo, ya que se puede romper el filtro.


Al finalizar el vertido de la muestra, tome aproximadamente 50 mL del agua de la muestra ya filtrada y viértalos en la botella de 500 mL para lavar lo que haya podido quedarse en las paredes de la botella. Realizar este último procedimiento tres veces.

Medir el volumen que fue filtrado, vertiendo el agua del frasco en una probeta de 500 mL. Anotar el volumen medido.

En seguida proceda al lavado del filtro. Tome 10 mL del agua de la muestra filtrada con una jeringa sin aguja. Extienda cuidadosamente el filtro con las pinzas sobre la caja Petri o la bandeja de pesaje. Posteriormente coloque la aguja a la jeringa e inicie el lavado del filtro. El lavado deberá realizarse desde arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, cuidando que el líquido caiga dentro de la caja Petri o la bandeja de pesaje. Guarde un poco del agua de la muestra filtrada en la jeringa (1 a 2 mL).

Inmediatamente vierta el contenido de la caja Petri o la bandeja de pesaje dentro del vial de vidrio previamente cubierto con papel aluminio y etiquetado. Lave la caja de Petri o la bandeja de pesaje con el agua de la muestra filtrada (1 a 2 mL) que se guardó en la jeringa y agregue esto al vial.

La información que debe incluirse sobre la tapadera del vial y en la cinta adhesiva es la siguiente: localidad, profundidad, fecha, hora, modo de preservación (L de Lugol o F de Formaldehido), volumen de la muestra inicial y volumen de la muestra final (Fig. 3).

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 8 de 11
	ANÁLISIS DE PLANCTON	Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix

Tapadera



Cinta adhesiva

C-WG 10 m	<u>450 ml</u>
2 - X - 2015 L	10 ml
Hora	

Figura 3. Etiquetado de las muestras colectadas.

Finalmente, almacenar adecuadamente el vial en un lugar con nula o poca influencia de luz solar, para su posterior identificación y conteo.

Muestra con formaldehído (Botella de 500 mL)

Método de sedimentación

Se aconseja usar una campana de extracción de gases para este proceso para muestras fijadas con formaldehído.

Al ingresar las muestras al laboratorio, se deben colocar las botellas de 500 mL en una superficie plana, con nula o poca influencia de luz solar, por al menos 24 horas para que el proceso de sedimentación inicie. Las muestras no deben moverse para evitar la resuspensión del plancton.

El volumen inicial se debe reducir a la mitad para iniciar el segundo periodo de sedimentación. Con ayuda de una pipeta, se debe extraer cuidadosamente el exceso de muestra. Se debe pipetear lentamente para evitar ocasionar algún disturbio que pueda resuspender las algas. Después de haber reducido el volumen, agitar cuidadosamente y verter la muestra en una probeta con un volumen menor a 250 mL, correctamente etiquetada por otras 24 horas. Las muestras deben quedarse nuevamente en una superficie plana, con poca o nula influencia de luz solar y sin moverse.

Después del segundo periodo de sedimentación, la muestra debe decantarse nuevamente con la ayuda de una pipeta hasta obtener un volumen final de 10 mL. Este proceso debe realizarse lentamente y cuidadosamente para evitar extraer el material que se ha sedimentado. Inmediatamente, vierta el contenido de la probeta dentro del vial de vidrio previamente etiquetado, para su posterior identificación y análisis. La información que debe incluirse sobre la tapadera del vial y en la cinta adhesiva es la misma que la de Lugol (Fig. 2), exceptuando la “L” de lugol que deberá ser reemplazada por una “F” de formol.


Finalmente, almacenar adecuadamente el vial en un lugar con nula o poca influencia de luz solar, para su posterior identificación y conteo.

Conteo e identificación de plancton

El método de contar el plancton es exactamente igual a lo descrito en 10.1.

Realizar el mismo procedimiento para ambas muestras, las fijadas con Lugol y con formol.

Notas

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 9 de 11
	ANÁLISIS DE PLANCTON	Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix

Además de la cámara de conteo de Sedgewick-Rafter y los portaobjetos, también se puede usar una celda de conteo Palmer- Maloney, que permite llegar a un aumento de 400 x. Las medidas de la celda Palmer son 17.5 mm diámetro, 0.04 mm de profundidad y 0.1 mL de volumen.

Al almacenar las muestras, se le debe agregar formaldehído (3 gotas por cada 10 mL), para preservar la muestra y evitar el crecimiento de hongos.

Si en un conteo en un portaobjetos, no logra contar el número de individuos indicado, preparar nuevamente una muestra. Reportar el número de organismos y cuantos mililitros en total de la muestra analizó.

Cuando se esté revisando una muestra en el microscopio no debe pasar por el mismo transecto dos veces.

Revisar los bordes de la cámara de Sedgewick-Rafter o de los porta- y cubre- objetos, para observar si hay algún otro taxón que no haya sido antes visto en el resto de la muestra.

Los desechos de Lugol y formaldehído deberán disponerse adecuadamente.

La identificación de las muestras lo puede realizar con guías o manuales de plancton que han sido publicados para regiones tropicales o consultando páginas oficiales de internet.

11. Conteo de células

Para la enumeración de cianobacteria es importante poder convertir las colonias a células. Para esto se toma muestras representativas del organismo y se determina el número de células en un área determinada (*Microcystis*) o el número de células en un largo del filamento (cianobacterias filamentosas como *Limnoraphis*) o el promedio por filamento si son filamentos cortos (*Dolichospermum*). Para *Aphanizomenon* se toma el número promedio por tricoma (filamento corto). Otra manera es usar el campo visual del microscopio y medir su ancho, calculando cuántos anchos de campo ocupa un filamento y calcular cuántas células por una unidad de medición.


12. Presentación y análisis de resultados

Posterior a la identificación y conteo de los géneros de algas presentes en las muestras, se procederá a analizar los resultados. Elaborar las bases de datos en las cuales se incluya la siguiente información: localidad, profundidad, taxón, abundancia relativa, número de organismos por taxón, volumen inicial de la muestra de agua, volumen contado, volumen final, número de sub-muestra, cuadros contados, clase, tamaño, número de células por organismo, células por litro (cel/L), fecha de muestreo, número de transectos y/o cuadrantes y biovolumen.

12.1 Cálculo para abundancia relativa

Se debe presentar el cuadro taxonómico con el número de individuos por taxa y la abundancia relativa. El cálculo de la abundancia relativa por clase de algas se obtiene con la siguiente formula

$$(AR = (n / N) * 100)$$

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 10 de 11
	ANÁLISIS DE PLANCTON	Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix

Donde n es el número de organismo por taxa, N es el número total de organismos de la muestra. Solo se puede analizar la abundancia relativa, ya que se cuentan únicamente los primeros 400 y/o 100 organismos.

12.2 Cálculo organismos por litro

Los datos de conteo por género o por taxa sirven para realizar el cálculo de organismos presentes en un litro de agua recolectada. Para determinar la densidad se utiliza la siguiente formula:

$$\text{Densidad (Org./L)} = \frac{\text{Cantidad de organismos} * \text{Vol. Final} * 1000}{\text{Vol. Contado} * \text{Vol. Inicial}}$$

12.3 Cálculo para células por litro

Cuando hay florecimientos de cianobacteria es costumbre convertir los conteos a células por litro, ya que una definición mundial de un florecimiento es una concentración de 2 millones de células por litro.

Para determinar el número de células por litro realizar los cálculos con las siguientes fórmulas:

$$\text{Densidad (Org./L)} = \frac{\text{Cantidad de organismos} * \text{Vol. Final} * 1000}{\text{Vol. Contado} * \text{Vol. Inicial}}$$

$$\text{Cel./L} = \text{Densidad} * \text{Número de células por organismo}$$

Muchas veces es conveniente convertir las densidades en porcentajes por taxón.



12.4 Cálculo para biovolumen

La abundancia de las algas expresada como biovolumen (mm^3/L) permite una mejor comparación con la concentración de clorofila "a" (la cual se usa habitualmente como indicador de la biomasa del fitoplancton).

$$\text{Biovolumen por especie (mm}^3/\text{L)} = (\text{cel./L}) * (\text{Vol. medio por célula (}\mu\text{m}^3)) * (10^{-9})$$

Existen cuadros desarrollados para la mayoría de las especies comúnmente encontradas.


Luego de los cálculos se debe graficar los resultados, para establecer los grupos dominantes y poder correlacionarlos con las condiciones ambientales presentes al momento del monitoreo.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 12 Versión: 3 Fecha: 01/03/2017 Página 11 de 11
	ANÁLISIS DE PLANCTON	Preparado por: I. Arriola, F. Reyes, P. Javier Revisado por: M. Dix Aprobado por: M. Dix

13. Zooplancton

El zooplancton se trabaja de manera muy similar al fitoplancton. Se debe tomar en cuenta que las densidades serán mucho menores y es necesario contar por lo menos un mililitro y a veces hasta 5 mL para lograr números significativos. La revisión de halados de plancton muchas veces da buenos resultados.

Algunos investigadores recomiendan agregar azúcar al formol al momento de muestreo para prevenir la deformación de los organismos. Otros sugieren agregar dióxido de carbono para anestesiarse al zooplancton antes de fijar. Todo depende del objetivo del estudio de zooplancton.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 13 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 1 de 7
	CLOROFILA - A	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

1. Propósito

Determinar concentración de clorofila-a como $\mu\text{g/L}$ Chl-a en muestras de agua.

2. Aplicación

Muestras de agua de cualquier origen. Los métodos descritos son análogos a SM 10-19.2 y SM 10-19.3.

Para la determinación de clorofila a (Chl-a) pueden utilizarse diferentes metodologías. En este documento se describirán dos métodos que permiten la determinación de Chl-a en presencia de Feofitina (Pheo), un producto de la degradación de la Chl-a: (1) El método espectrofotométrico; y (2) el método fluorométrico.

Ambos métodos permiten la medición de clorofila a en intervalos de medición comparables: 0.1-1000 $\mu\text{g/L}$ en la muestra. El método fluorométrico es preferido para concentraciones mayores a 1 $\mu\text{g/L}$ y el espectrofotométrico para concentraciones mayores a 1 $\mu\text{g/L}$, donde el mejor rendimiento es alcanzado.

El solvente y la metodología a utilizar para la extracción dependen de la elección del laboratorio. Según la referencia 4.2, el solvente en el cual se recupera mayores porcentajes de Chl-a es metanol al 99%. Otros solventes podrían utilizarse, como acetona, etanol y metanol con agua al 10%, siempre y cuando se consideren estos cambios en los cálculos.

3. Principio

Las clorofilas forman una familia de pigmentos de color verde utilizado en el proceso de fotosíntesis por la mayoría de especies del fitoplancton. La clorofila a tiene un espectro de absorción en el rango visible, con la mayor absorbancia en los intervalos 400-500 nm y 600-700 nm; además, es fluorescente, con emisión en 663 nm cuando se excita con luz de 430 nm. Dos productos de la degradación de la clorofila a, feofitina a y feoforbida a, así como otras clases de clorofila, pueden interferir en la determinación de clorofila a. Para eliminar la interferencia de feofitina a puede calcularse su concentración en conjunto con la de clorofila a, resultando en métodos de determinación combinados.

Las clorofilas se degradan muy fácilmente por la luz, entonces se recomienda trabajar con iluminación baja evitando la luz solar directa.

4. Referencias

Eaton, A. D. et al. (eds.). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Henriques, M., A. Silva & J. Rocha. 2007. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology


Lichtenthaler, H. & A. Wellburn. 1983. Biochemical Society Transactions, London, 11, 591

Lichtenthaler, H. & C. Buschmann. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS. En: Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Supplement 1.

5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras POE - 2

Seguridad en el Laboratorio POE - 4

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 13 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 2 de 7</p>
	<p align="center">CLOROFILA - A</p>	<p>Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix</p>

Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5

Procesamiento de muestras POE - 6

6. Terminología y abreviaciones

Clorofila *a* (Chl *a*)

Feofitina (Pheo)

Litros (L)

Mililitros (mL)

Micro litros (μ L)

Gramos (g)

Miligramos (mg)

Microgramos (μ g)

Nanómetros (nm)

Milímetros (mm)

Normal (N)

Grados centígrados ($^{\circ}$ C)

Ultra violeta (UV)

Volumen filtrado (V_f)

Volumen extraído (V_e)

Florescencia antes de acidificar (F_b)

Florescencia después de acidificar (F_a)

Constante de calibración (r)

Factor de calibración (K)

Razón clorofila /feofitina teórica (R)

Coefficiente de extinción (S)

Tamaño de celda (L)

Absorbancias antes de acidificar (B)




Absorbancias después de acidificar (A)

Concentración (C)

7. Materiales y Equipo

7.1 *Reactivos*

Metanol 99% C_6H_5OH (Nro. CAS: 67-56-1)

  	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 13 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 3 de 7
CLOROFILA - A		Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

Ácido clorhídrico HCl al 37% (Nro. CAS: 7647-01-0)

Clorofila a liofilizada en ampolla de 1 mg.

Agua grado reactivo

7.2 *Cristalería*

100 recipientes oscuros

2 Balones aforados 100 mL

7.3 *Equipo*

Pipetas 10-2 mL, 100-1000 μ L, 20-200 μ L

Puntas para pipetas, varios volúmenes

Espectrofotómetro UV-visible

Celda de espectrofotómetro de 50 mm

Fluorómetro

Celdas para fluorómetro de 10 mm

8. Seguridad

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

Al utilizar metanol utilice anteojos de seguridad.

Limpiar inmediatamente con toalla de papel toalla los derrames de reactivo inmediatamente.

9. Prueba estándar

9.1 *Estándares de referencia*

Para preparar la curva de calibración de Chl a, es necesario contar con un estándar de referencia. En el mercado están disponibles ampollas de Chl a liofilizada de espinaca, *Spinacia oleracea* o de la cianobacteria *Anacystis nidulans*, además de soluciones preparadas con concentración conocida.

Cualquiera de las dos presentaciones es aceptable. El procedimiento para realizar la curva es descrito en el inciso 10.4.


10. Soluciones necesarias para el análisis (para 100 muestras)

10.1 *Solución ácido clorhídrico 2.00 N (preparación para 100 mL)*

Reactivos: 16.6 mL de ácido clorhídrico

100 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Coloque 50 mL de agua en un balón aforado de 100 mL. Agregue lentamente 16.6 mL de ácido clorhídrico y agite suavemente. Luego, aforar con agua. Utilice la campana de extracción de gases encendida y guantes.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 13 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 4 de 7
	CLOROFILA - A	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

Almacenamiento Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

10.2 *Solución ácido clorhídrico 4.00 N (preparación para 100 mL)*

Reactivos: 33.2 mL de ácido clorhídrico
100 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Coloque 50 mL de agua en un balón aforado de 100 mL. Agregue lentamente 33.2 mL de ácido clorhídrico y agite suavemente. Luego, aforar con agua. Utilice la campana de extracción de gases encendida y guantes.

Almacenamiento Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

10.3 *Solución estándar 1 mg/L Chl a (1000 µg/L Chl a) (preparación para 100 mL)*

Reactivos: 1 ampolla de 1 mg Chl-a liofilizada
200 mL metanol al 99%

Procedimiento: Coloque 50 mL de metanol en un balón aforado de 100 mL. Agregar y disolver la ampolla de 1 mg Chl a en el balón, de preferencia ámbar o forrado con papel aluminio. Aforar con metanol al 99%. Agitar la solución por 1 hora.

Coloque 50 mL de metanol en un balón aforado de 100 mL. Agregar 10 mL de la solución anterior en el balón, de preferencia ámbar o forrado con papel aluminio. Aforar con metanol al 99%.


Almacenamiento Almacenar ambas soluciones en botellas ámbar o forradas con papel aluminio y en el congelador. Esta solución es muy sensible a la luz por lo que debe realizarse en un entorno con luz disminuida.

10.4 *Estándares de calibración*

Reactivos: 20.0 mL de Solución estándar 1 mg/L Chl a
100 mL de metanol 99%

Procedimiento: Partiendo de la solución estándar 1 mg/L Chl a, preparar (por duplicado) 14 tubos con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:

<i>Concentración</i>	<i>Vol. solución estándar</i>	<i>Vol. de etanol</i>
<i>[µg/L Chl a]</i>	<i>(µL)</i>	<i>(mL)</i>
0	0	20.00
5	100	19.90
10	200	19.80
25	500	19.50
50	1000	19.00
100	2000	18.00

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 13 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 5 de 7
	CLOROFILA - A	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

250

5000

15.00

11. Procedimiento para extracción:

Filtrar una cantidad conocida de muestra (V_f) con un filtro Whatman GF/F o equivalente, según el procedimiento del POE-6.

Con ayuda de un par de pinzas, doblar el filtro a la mitad de tal manera que el contenido filtrado no toque las paredes del sobre de papel aluminio en donde será almacenado.

Almacenar el filtro en sobre de papel aluminio por al menos una noche en un congelador. Es recomendable no exceder el tiempo de almacenamiento más allá de 1 mes.

Colocar el filtro en un recipiente oscuro sumergido en 20 mL de solvente. Un frasco plástico ámbar, un tubo de ensayo con rosca cubierto con cinta o una caja negra de película fotográfica pueden ser utilizados.

Mover muy suavemente el recipiente SIN AGITAR. Al agitar el filtro de fibra de vidrio puede destruirse liberando trazas de material que enturbian la muestra dificultando la determinación de clorofila a.

Almacenar los recipientes en el congelador. Dependiendo el solvente utilizado, el tiempo de extracción es de al menos 4 horas para acetona y 24 horas para los demás solventes. No exceder el tiempo de extracción de 48 horas.

12. Procedimiento de análisis espectrofotométrico

Con unas pinzas, remover el filtro del recipiente oscuro y colocar 15 mL del extracto (V_e) en una cubeta de 50 mm.

Leer la absorbancia en las longitudes de onda 664 nm, 665 nm y 750 nm (absorbancias antes de acidificar, B_{664} , B_{665} y B_{750})

Añadir 25 μ L de solución HCl 2.00 N. Esperar 1 minuto.

Leer la absorbancia en las longitudes de onda 664 nm, 665 nm y 750 nm (absorbancias después de acidificar, A_{664} , A_{665} y A_{750})

Desechar el contenido de la cubeta y enjuagar con metanol.

13. Procedimiento de análisis fluorométrico

Con unas pinzas, remover el filtro del recipiente oscuro y colocar 6 mL de extracto en una cubeta de fluorómetro de 10 mm.

Medir la fluorescencia con los filtros adecuados (fluorescencia antes de acidificar, F_b).


Añadir 20 μ L de solución HCl 4.00 N.

Agitar suavemente la cubeta cubriéndola con parafilm.

Medir la fluorescencia con los filtros adecuados (fluorescencia después de acidificar, F_a).

Desechar el contenido de la cubeta y enjuagar con metanol.

14. Cálculos

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 13 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 6 de 7
	CLOROFILA - A	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

14.1 *Constantes de calibración método fluorométrico*

En una hoja electrónica calcular la función regresión lineal de curva Concentración nominal vs. Fluorescencia antes de acidificar de los estándares de calibración (10.4). La pendiente de esta ecuación es el factor de calibración K .

Calcular la función regresión lineal de curva Fluorescencia antes de acidificar vs. Fluorescencia después de acidificar. La pendiente de esta ecuación es el factor de calibración r .

14.2 *Concentración método fluorométrico*

Con los factores de calibración calculados en (10.4), calcular la concentración de Chl a y Pheo de cada muestra según sea las lecturas del fluorómetro (13.2 y 13.5), utilizando las ecuaciones:

$$C_{\text{Chl-a}} (\mu\text{g/L}) = \frac{V_e}{V_f} \frac{K r}{r - 1} (F_b - F_a)$$

$$C_{\text{Pheo}} (\mu\text{g/L}) = \frac{V_e}{V_f} \frac{K r}{r - 1} (r F_a - F_b)$$

14.3 *Concentración método espectrofotométrico*

Calcular la concentración de Chl-a y Pheo de cada muestra según sea las lecturas espectrofotómetro (12.2 y 12.4), utilizando las ecuaciones:

$$C_{\text{Chl-a}} (\mu\text{g/L}) = 1000 S \frac{V_e}{LV_f} [(B_{664} - B_{750}) - (A_{665} - A_{750})]$$

$$C_{\text{Pheo}} (\mu\text{g/L}) = S V_e [R(A_{665} - A_{750}) - (B_{664} - B_{750})]$$

S y R son factores que dependen del solvente.

Si se utiliza acetona al 100% $S = 26.7$ y $R = 2$.


Si se utiliza acetona al 90% $S = 26.7$ y $R = 1.7$.

Si se utiliza metanol al 99% $S = 78.74$ y $R = 2$.

15. **Control de calidad**

15.1 *Blancos*

Deben realizarse al menos 2 muestras con metanol (blanco) o el 5% del total de las muestras. Los blancos deberán ser preparados tal como se haría con cualquier otra muestra (mismos reactivos, mismos tiempos de reacción). Esta prueba sirve para asegurar que los reactivos y la cristalería no están contaminados. Si se encuentra una cantidad detectable de clorofila-a en un blanco la corrida se debe desechar y el análisis debe ser repetido con nuevos reactivos.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 13 Versión: 4 Fecha: 01/03/2017 Página: 7 de 7
	CLOROFILA - A	Preparado por: O. García Revisado por: F. Reyes Aprobado por: M. Dix

16. Reporte

16.1 *Constantes de calibración*

Grafique las curvas Concentración nominal vs. Fluorescencia antes de acidificar y Fluorescencia antes de acidificar vs. Fluorescencia después de acidificar. Incluya el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto de cada gráfica. Reporte los factores de calibración calculados.

16.2 *Concentración de muestras*

Reporte la absorbancia y concentración de cada muestra (como $\mu\text{g/L Chl}_a$ y $\mu\text{g/L Pheo}$).

16.3 *Control de calidad*

Reporte los valores del control de calidad.

17. Notas


Si la concentración de la muestra es mayor a la máxima concentración considerada en la curva de calibración es necesario hacer una dilución de la muestra. Las diluciones más comunes son:

1:2 (5 mL de muestra en 5 mL de solvente);

1:5 (2 mL de muestra en 8 mL de solvente) y;

1:10 (1 mL de muestra en 9 mL de solvente).

Elegir la dilución más conveniente según la lectura de la absorbancia o fluorescencia.

	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 1 de 16</p>
<p align="center">RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO</p>		<p>Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes</p>

1. Propósito

Recolección de muestras de agua y biológicas, procesamiento, almacenamiento, conteos de células de fitoplancton, cianobacterias y detección de cianotoxinas. Así mismo, tomar las medidas de acción durante un florecimiento de algas y/o cianobacterias, mediante la activación del Sistema de alerta relacionados a florecimiento de algas y cianobacterias (ver Anexo 1).

2. Aplicación

Este procedimiento es aplicable cuando se activa el Sistema de alerta relacionados a florecimiento de algas y cianobacterias para el muestreo de agua en lagos con un potencial florecimiento de fitoplancton. Los métodos de preservación están diseñados para realizar posteriormente análisis, conteo de células de fitoplancton, cianobacterias y detección de cianotoxinas.

3. Referencias

Bonilla, S. (ed.) 2009. Cianobacterias planctónicas del Uruguay: manual para la identificación y medidas de control. Programa hidrológico de la UNESCO para América Latina y el Caribe. Documento Técnico 16.

Chorus, J. y J. Bartram. 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO. Londres, Reino Unido.

Farrer, D., M. Counter, R. Hillwig y C. Cude. 2015. Health-based cyanotoxin guideline values allow for cyanotoxin -based monitoring and efficient public health response to cyanobacterial blooms.

4. Terminología y abreviaciones

Metros (m)

Grados centígrados (°C)

Litro (L)

Mililitros (mL)

Gramos (g)

Onzas (oz)

Microgramos (µg)


Células (Cel.)

Organismos (Org.)

Milímetros (mm)

Botella van Dorn: Es un dispositivo de plástico (usualmente PVC o PP) que sirve para extraer muestras de agua a distintas profundidades. Las tapas son herméticas para evitar pérdidas o contaminaciones con otros estratos. Está equipada con un sistema de cerrado que se activa al enviar un “mensajero” por la cuerda.

Fitoplancton o microalgas: conjunto de organismos fotosintéticos, principalmente microscópicos, que flotan en aguas saladas o dulces.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 2 de 16
	RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO	Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

Cianobacterias: Son bacterias capaces de realizar fotosíntesis, algunas son capaces de producir cianotoxinas dañinas para la salud.

Cianotoxinas: Son toxinas producidas por cianobacterias. Tienen efectos nocivos sobre el ser humano y animales. Sus efectos agudos dependen del tipo de toxina, pueden afectar al hígado (microcistinas), sistema nervioso (anacistinas, saxitoxinas).

5. Principio

Los florecimientos de microalgas, sobre todo aquellos dominados por cianobacterias necesitan de un seguimiento especial, dado que tienen el potencial de producir toxinas y afectar a la salud humana. La recolección de muestras de agua y su preservación para su posterior análisis es fundamental para el estudio de los florecimientos de microalgas predominantes y la determinación de la presencia o ausencia de cianobacterias y cianotoxinas. Una incorrecta técnica de recolección de muestras puede alterar el resultado y conducir a una alerta equivocada.

6. Documentos asociados

Sistema de alerta relacionados a florecimiento de algas y cianobacterias

Seguridad en viajes en lancha POE - 1

Seguridad en el laboratorio POE - 4

Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería y materiales POE - 5

Procesamiento de muestras POE - 6

Análisis de plancton POE - 12

Análisis de clorofila *a* POE - 13

Clorofila *a*: extracción con etanol POE – 25

Análisis de cianotoxinas POE - 14B

7. Seguridad

Además de las consideraciones generales de seguridad en el campo y en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:


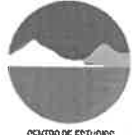
- Siempre usar guantes para manejar cianobacterias potencialmente tóxicas. Tener cuidado de no tocar boca, ojos, nariz, cara mientras se trabajan las muestras.
- Después del muestreo lavarse sus manos con agua limpia.
- Después de cada sitio de muestreo lavar siempre todo el equipo con agua limpia (no del lago).
- Seguir las instrucciones para el uso de cada uno de los equipos utilizados en campo.
- No sumergir ningún equipo al agua mientras la embarcación está en movimiento.

8. Materiales y equipos

8.1 Reactivos

Ácido acético glacial CH_3COOH (Nro. CAS: 64-19-7)

Yodo cristalizado I_2 (Nro. CAS: 7553-56-2)

 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 3 de 16
RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO		Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

Yoduro potasio KI (Nro. CAS: 7681-11-0)

Solución de Lugol

Agua desmineralizada

Diluyente de muestra (10x) concentrado (Ver kit de Anatoxina *a*)

8.2 *Cristalería*

Botes plásticos 120 mL con Lugol (muestras fijadas)

Frasco de vidrio color ámbar o forrados con papel aluminio de 120 mL

Frasco de vidrio de 4 oz sin Lugol (muestras vivas)

Probeta de vidrio de 100 mL

8.3 *Equipo*

Portaobjetos y cubreobjetos (22 x 50 mm, 22 x 40 mm, 22 x 22 mm, 24 x 24 mm)

Cámara de Sedgewick-Rafter

Microscopio

Viales de vidrio o tubos Vacutainer (15 mL aprox.)

Botella van Dorn y mensajero

Lazo o cuerda graduada de un mínimo de 30 m

Red para plancton 20 µm

Paquetes refrigerantes

Hielera

Papel aluminio

Guantes de nitrilo

Pichel graduado de 1 L

Cubeta limpia para realizar la mezcla para muestras compuestas

Piseta


Pipeta

Papel limpia lentes

Sonda multiparamétrica (que incluya sensor de clorofila *a* y ficocianinas)

GPS

Disco Secchi

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 4 de 16 Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes
RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO		

9. Preparación de soluciones

9.1 *Solución de Lugol (preparación para 220 mL)*

Reactivos:

- Yodo (cristales) 10 g
- Potasio Yoduro 20 g
- Agua desmineralizada 200 mL
- Ácido acético glacial 20 mL

Procedimiento: Disolver 10 g de yodo y 20 g de yoduro de potasio en 200 mL de agua desmineralizada. Agitar hasta disolver los sólidos y agregar lentamente 20 mL de ácido acético. Agitar nuevamente.

10. Procedimiento para recolecta de muestras de agua

Previo a salir a campo se debe preparar el material y equipo de campo que va a utilizar.

Para asegurarse que todos los materiales y equipos se encuentran antes de salir se debe revisar la lista de cotejo (check list) (ver Anexo 2).

10.1 *Selección de sitios para muestrear.*

La selección de los sitios de muestreo, en caso de florecimiento, será con base en la alerta recibida o en sitios con potenciales riesgos de salud que pueden representar para los habitantes.

Se deben incluir sitios en donde haya tomas de agua para el consumo humano y sitios cercanos a playas recreativas.

10.2 *Etiquetado y rotulación de recipientes para muestras*



Antes de salir a campo se recomienda etiquetar y rotular los recipientes que se utilizarán para coleccionar las muestras.

La identificación de cada sitio debe ser única y debe coincidir con la boleta de campo.

Es recomendable el uso de doble etiqueta: una etiqueta con cinta adhesiva y otra con marcador permanente en cada botella de muestreo.

La codificación e identificación de cada sitio muestreado queda a discreción de los interesados, sin embargo, existe información básica que cualquier etiqueta debería incluir: sitio de muestreo, fecha de muestreo, profundidad de muestreo, tipo de muestras y preservante utilizado (si aplica). El responsable de recolectar las muestras deberá llenar una boleta de campo o formulario digital que acompañará las muestras (ver Anexo 3).

Una correcta identificación de muestras es el primer paso para la construcción de una base de datos confiable.

 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 5 de 16
RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO		Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

10.3 *Recolecta de muestras de agua para la identificación de fitoplancton y cianotoxinas*

Previo a recolectar las muestras de agua medir la transparencia con el disco Secchi y anotar el valor en la boleta de campo (ver Anexo 3). Si se cuenta con sonda multiparamétrica, medir los parámetros *in situ*, principalmente ficocianinas y clorofila *a* de la columna de agua, desde la superficie hasta 30 m de profundidad. Anotar los valores máximos de concentración y la profundidad correspondiente en la boleta de campo (ver Anexo 3).

10.3.1 Sí hay una nata visible de microalgas, en la nata tomar directamente cuatro muestras de agua de 100 mL cada una, tal cómo se describe a continuación:


- a. La primera muestra se debe almacenar en un frasco de vidrio de 4 oz (viva)
- b. La segunda muestra almacenar en un bote plástico de 120 mL con 1 mL de Lugol (fijada).
- c. La tercera muestra se debe almacenar en un frasco de vidrio color ámbar o forrado con papel aluminio (cianotoxinas)
- d. La cuarta muestra se debe almacenar en un frasco de vidrio color ámbar o forrado con papel aluminio y añadir el Diluyente de muestra (10x) concentrado (Kit Anatoxina *a*)
- e. Almacenar todas las muestras en un lugar oscuro a 4°C.

10.3.2 Si no hay una nata o masa visible en la superficie tomar una muestra de agua con una botella de van Dorn a la profundidad de mayor concentración de ficocianinas (>600 cel./L o > 100 mg/L) o clorofila *a* (>10 mg/L) indicada por la sonda multiparamétrica. De la botella van Dorn tomar cuatro muestras de 100 mL cada una como se describe a continuación:

- a. Para la primera muestra, tomar 100 mL de la botella de van Dorn y almacenar en un frasco de vidrio color ámbar o forrado con papel aluminio (cianotoxinas)
- b. Para la segunda muestra, tomar 100 mL de la botella de van Dorn y almacenar en un frasco de vidrio color ámbar o forrado con papel aluminio. Añadir el Diluyente de muestra (10x) concentrado (Anatoxina *a*)
- c. Para la tercera muestra, tomar 1 L de agua de la botella de van Dorn y filtrar el volumen por una red de plancton de 20 µm para concentrar la muestra, hasta obtener 100 mL aproximadamente.
- d. Depositar la muestra concentrada en un frasco de vidrio 4 oz (viva).
- e. Para la cuarta muestra, repetir los pasos del inciso “c” y depositar la muestra en un bote plástico de 120 mL con 1 mL de Lugol (fijada).
- f. Almacenar todas las muestras en un lugar oscuro a 4°C.

10.3.3 Si no hay una nata o masa visible en la superficie y no se cuenta con lectura de ficocianinas o clorofila *a*, tomar una muestra compuesta de 4 L. Con una botella de van Dorn se debe tomar 1 L de agua en cada una de las siguientes profundidades: 0 m, 5 m, 10 m y 15 m, y mezclarlas en la cubeta limpia. Luego de mezclar las cuatro muestras de un litro, tomar cuatro muestras de 100 mL cada una como se describe a continuación:

- a. Para la primera muestra, tomar 100 mL de la muestra compuesta y almacenar en un frasco de vidrio color ámbar o forrado con papel aluminio (cianotoxinas)

	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 6 de 16
	RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO	Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

- b. Para la segunda muestra, tomar 100 mL de la muestra compuesta y almacenar en un frasco de vidrio color ámbar o forrado con papel aluminio. Añadir el Diluyente de muestra (10x) concentrado (Kit de Anatoxina *a*)
- c. Para la tercera muestra, tomar 1 L de agua de la muestra compuesta y filtrar el volumen por una red de plancton de 20 μm para concentrar la muestra, hasta obtener 100 mL aproximadamente.
- d. Depositar la muestra concentrada en un frasco de vidrio 4 oz (viva).
- e. Para la cuarta muestra, repetir los pasos del inciso “c” y depositar la muestra en un bote plástico de 120 mL con 1 mL de Lugol (fijada).
- f. Almacenar todas las muestras en un lugar oscuro a 4°C.

Nota: Si la profundidad no es mayor a los 15 m las submuestras se deberán tomar hasta donde la profundidad lo permita.

Adicionalmente se puede recolectar una muestra viva. Para esto se debe realizar un arrastre con la red de plancton desde los 30 m de profundidad hasta la superficie. Depositar en una botella o frasco de 4 oz (120 mL). Almacenar las muestras en un lugar oscuro a 4°C.

Después de muestrear y antes de ir a otro sitio, es importante lavar el equipo con agua desmineralizada y descartar los guantes.

11. Procedimiento para conteo de fitoplancton y cianobacterias

Nota: si la muestra proviene de una nata visible de microalgas pasar directamente al inciso 11.2.

11.1 Identificación y conteo de muestras (vivas) mediante cámara de Sedgewick-Rafter

La identificación y conteo de la muestra viva servirá para identificar las algas presentes en las muestras y determinar si hay o no florecimiento de cianobacterias.

Agitar cuidadosamente la muestra al menos tres veces y tomar una muestra de 1 mL con una pipeta de pasteur. Depositar la muestra en la cámara de Sedgewick-Rafter y cubrir la cámara con un cubreobjetos, deslizándolo suavemente sobre los bordes de la cámara (Fig. 1). Asegurar que no queden burbujas en la celda. Una vez montada la muestra en la cámara se procede a revisar rápidamente los géneros presentes en la muestra. Se recomienda iniciar con un aumento de 40 x y aumentar a 100 x.

Posteriormente, iniciar la identificación y el conteo de las algas con un microscopio, realizando transectos de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha (Fig. 1). La identificación y conteo se debe hacer con un aumento de 100x y se debe suspender cuando se lleguen a contar 100 organismos o el contenido de 1 mL. Repetir tres veces para llegar a un mínimo de 300 organismos.

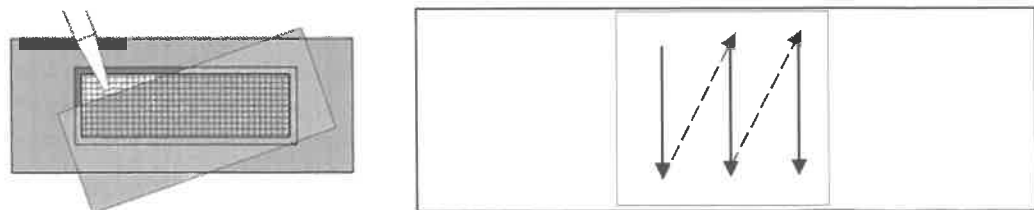



Figura 1. Cámara de Sedgewick-Rafter y dirección de los transectos

 <p>AMSCLAE CENTRO DE ESTUDIOS ATLÁN-CEA</p>	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p> <p align="center">RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO</p>	<p>POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 7 de 16</p> <p>Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes</p>
---	---	---

Para evaluar si hay florecimiento de cianobacterias realizar lo siguiente:

- a. Para cada grupo de algas (Bacillariophyta, Chlorophyta, Charophyta, Dynophyta y Cyanophyceae) contabilizar el total de organismos presentes en la muestra analizada.

El cálculo de la abundancia relativa por clase de algas se obtiene con la siguiente formula

$$AR = (n / N) * 100$$

Donde n es el número de organismo por grupo y N es el número total de organismos de la muestra.

- b. Si la abundancia relativa del grupo de cianobacterias es igual o menor a 10, no se considera un florecimiento de cianobacterias, pero sí de otro grupo de algas. Realizar el conteo de la muestra siguiendo el POE – 12. Para generar el reporte del florecimiento de otras algas, pasar al inciso 14 del POE – 14 “Recolección, procesamiento y análisis durante un florecimiento”.
- c. Si la abundancia relativa del grupo de cianobacterias es mayor a 10 se considera un potencial florecimiento. Continuar los siguientes pasos para obtener datos de densidad (cel/L).

Nota: La muestra con organismos vivos se debe revisar e identificar el mismo día de la recolecta o antes de 24 hrs. Descartar la muestra en lavael desagüe luego del análisis.


11.2 Identificación y conteo de muestras (fijadas) mediante cámara de Sedgewick-Rafter

Las muestras (fijadas) al ingresar al laboratorio se deben trasvasar a una probeta de 100 mL para medir el volumen e inmediatamente iniciar el conteo en la cámara Sedgewick-Rafter.

Agitar cuidadosamente la muestra al menos tres veces y tomar una muestra de 1 mL con una pipeta de pasteur. Depositar la muestra en la cámara de Sedgewick-Rafter y cubrir la cámara con un cubreobjetos, deslizándolo suavemente sobre los bordes de la cámara. Asegurar que no queden burbujas en la celda. Una vez montada la muestra en el microscopio, dejar sedimentar por 15 minutos (con la luz del microscopio apagada para que no se caliente). Luego proceder a revisar rápidamente los **géneros de cianobacterias** presentes. Se recomienda iniciar con un aumento de 40 x y aumentar a 100 x.

La identificación y conteo es específicamente para colonias de cianobacterias. Este se realiza en aumento 100 x, recorriendo transectos de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha (Fig. 1). La identificación y conteo se debe suspender cuando se lleguen a contar el contenido de 1 mL o 100 colonias. Reportar el número de cuadros en los cuales se contaron los organismos. Al finalizar, regresar la muestra cuidadosamente a su mismo frasco y se toma otra muestra para repetir el proceso. Este proceso se repite 3 veces. Anotar para cada género el número de colonias según la hoja de datos (ver Anexo 4).

Nota: después de finalizar el conteo, la muestra debe ser concentrada a un volumen mínimo de 10 mL, etiquetada y almacenada según POE-12 “Análisis de plancton”.

	Procedimiento Operacional Estándar RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 8 de 16 Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes
---	--	---

Nota: Si la densidad de la cianobacterias en la muestra es muy alta, se recomienda diluir la muestra (1:2 a 1:5), es decir, para una dilución 1:5 mezclar 1 mL de la muestra en 4 mL de agua desmineralizada y realizar el conteo. Al finalizar multiplicar los datos de densidad por el factor de dilución.

12 Conteo de células

Para la enumeración de cianobacterias es importante poder convertir las colonias a células. Para esto se toman muestras representativas del organismo y se determina el número de células en un lóbulo u área determinada (ej. *Microcystis*) o el número de células en un largo del filamento (cianobacterias filamentosas como *Limnoraphis*) o el promedio por filamento si son filamentos cortos (*Dolichospermum*). Para *Aphanizomenon* se toma el número promedio por tricoma (filamento corto) (ver Anexo 4).

Otra manera es usar el campo visual del microscopio y medir su ancho, calculando cuántos anchos de campo ocupa un filamento y calcular cuántas células por una unidad de medición.

13 Cálculo de resultados de cianobacterias

Posterior a la identificación y conteo de las colonias de cianobacterias presentes en las muestras, se procederá a analizar los resultados. Elaborar las bases de datos en las cuales se incluya la siguiente información: localidad, profundidad, taxa, abundancia relativa, cantidad de colonias por taxa, volumen inicial de la muestra de agua, volumen contado, volumen final, número de submuestra, cuadros contados, clase, tamaño, número de células por organismo, células por litro (cel/L), fecha de muestreo, número de transectos y/o cuadrantes (ver Anexo 4).

13.1 Cálculo para células por litro

Cuando hay florecimientos de cianobacterias se convierten los conteos a células por litro, ya que una definición mundial de un florecimiento es una concentración de 2 millones de células por litro.

Para determinar el número de células por litro realizar los cálculos con las siguientes fórmulas:

$$\text{Densidad (Col./L)} = \frac{\text{Cantidad de colonias de cianobacterias} \times \text{Vol. Final} \times 1000}{\text{Vol. Contado} \times \text{Vol. Inicial}}$$



$$\text{Cel./L} = \text{Densidad} * \text{Número de células por colonia}$$

Nota: Si la densidad de una cianobacteria con potencial capacidad de producir cianotoxinas es mayor o igual a 20,000,000 cel./L realizar el análisis correspondiente de cianotoxinas (ver inciso 15.1).

13.2 Enumeración del número de células en los diferentes géneros.

Limnoraphis: tamaño “1” cuando la longitud del filamento es menor de un cuarto del cuadro de la cámara a una magnificación de 40x, (promedio 75 células); “2” entre $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ de largo de un cuadro (promedio 150 células); “3” entre de $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ de largo del cuadro (promedio 225); y “4” mayor a $\frac{3}{4}$ de largo del cuadro hasta el largo total (promedio 300 células) (Cuadro 1).

Aphanizomenon: tamaño “P” cuando la longitud del filamento es de 11 células y “G” cuando la longitud es de 22 células, aproximadamente (Cuadro 1).

 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 9 de 16
	RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO	Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

Dolichospermum: tamaño “P” cuando la longitud del filamento es de 11 células y “G” cuando la longitud es de 22 células, aproximadamente (Cuadro 1).

Microcystis: Determinar para cada colonia el número de lóbulos. Luego, tomando como submuestra un lóbulo, contar el número aproximado de células. Se calcula el número total de células de *Microcystis* multiplicando el número de lóbulos observados por el número de células (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de células por colonia


Género	Tamaño			
	1	2	3	4
<i>Limnoraphis</i>	75	150	225	300
		P		G
<i>Dolichospermum</i>		11		22
<i>Aphanizomenon</i>		11		22
<i>Microcystis</i>	Cálculo por lóbulo			

14 Determinación del nivel de alerta

Con base en los resultados obtenidos en los incisos 11.1 y 13 determinar el nivel de alerta según el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Nivel de alerta para florecimiento de cianobacterias según densidad (cel./L) y abundancia relativa (AR).

Nivel de la alerta	Color	Parámetro
Normal	Verde	Cianobacterias < 500,000 cel./L AR de cianobacterias ≤ 10
Bajo	Amarillo	Cianobacterias < 2,000,000 cel./L AR de otras algas > 10
Medio	Anaranjado	Cianobacterias > 2,000,000 cel./L
Alto	Rojo	Cianobacterias > 20,000,000 cel./L

	Procedimiento Operacional Estándar RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 10 de 16 Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes
---	--	--

15 Presentación de resultados

15.1 Florecimiento de cianobacterias

- Presentar la densidad de todos los géneros de cianobacterias, de mayor a menor dominancia. Así mismo, presentar la densidad total de cianobacterias. Los resultados se deberán reportar en cel./L. El reporte se deberá realizar según el formato de informe del sistema de alerta relacionados a florecimiento de algas y cianobacterias (ver Anexo 5 y 6).

- Adicionalmente, reportar el valor de ficocianinas (Cel./L), si se cuenta con el registro.

- Los análisis de cianotoxinas (microcistina, anatoxina, saxitoxina y cilindropermopsina) se realizarán siguiendo el método establecido en cada kit o el POE correspondiente. Los resultados se deberán reportar en µg/L.

Se tomarán como valores guías de cianotoxinas para agua potable para el ser humano los siguientes (Ferrer et al. 2015):

1 (µg/L) Microcistina

1 (µg/L) Saxitoxina

3 (µg/L) Anatoxina-a


1 (µg/L) Cylindropermopsina

15.2 Florecimiento de otras algas

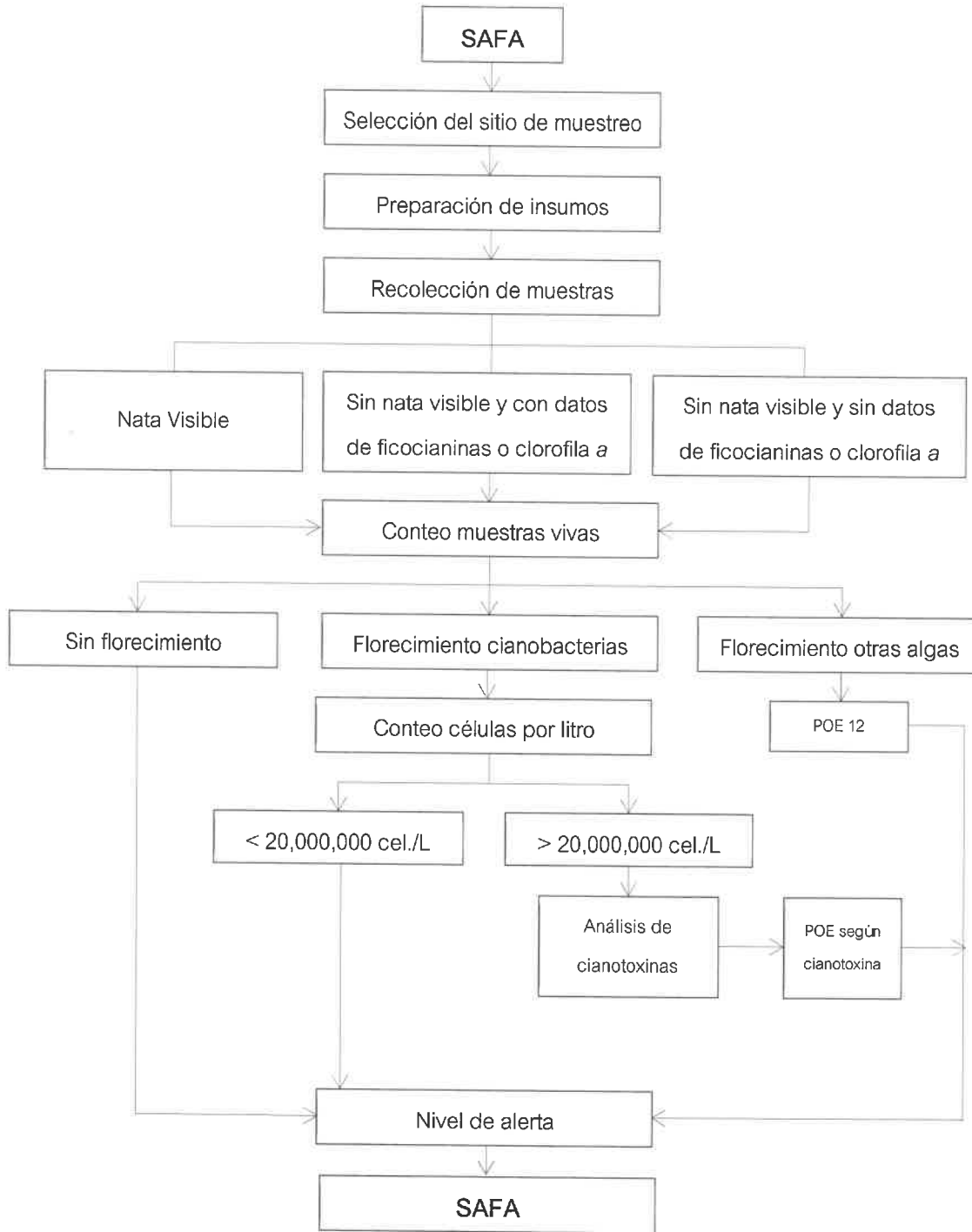
- Presentar la densidad del género del alga dominante en Col./L.



- Adicionalmente, reportar el valor de clorofila *a* (mg/L), si se cuenta con el registro.

Nota: se deberá seguir la ruta de acción hasta que se llegue a un nivel de alerta verde.



	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p>	<p>POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 11 de 16</p>
<p align="center">RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO</p>		<p>Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes</p>

Anexo 1. Flujograma para la recolección, procesamiento y análisis durante un florecimiento



 	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 12 de 16
	RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO	Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

Anexo 2. Check list

 CHECK LIST DE FLORECIMIENTOS 		
Ítem	Estado	Comentario
Botella de Van Dorn + mensajero		
Disco Secchi		
Sonda multiparamétrica (Oxígeno, Temperatura, pH, Conductividad, clorofila <i>a</i> y ficocianina)		
Red de Plancton		
Frascos de 120 mL con 1mL de Lugol		1 por sitio
Frascos de vidrio color ámbar de 120 mL		2 por sitio
Frasco de vidrio de 4 oz sin preservantes		1 por sitio
Diluyente de muestra (Kit de anatoxina <i>a</i>)		
Pichel de 1 L		
GPS		
Cámara fotográfica		
Marcadores permanentes indelebles		
Boleta de campo		
Cuaderno de notas		
Pesos		
Lazos graduados (min. 30 m)		
Guantes de nitrilo o látex		
Baterías AA, C, D		
Masking Tape		
Goteros		
Solución de Lugol		
Hieleras con hielo		
Embudo para filtrar		
Baterías Extras		
Termómetro ambiental		
Lápices		
Cubeta limpia		
Pisetas con agua desmineralizada		



Procedimiento Operacional Estándar

RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO

POE - 14
Versión: 4
Fecha: 14/Nov/2024
Página: 14 de 16

Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez
Revisado por: M. Martínez y F. Reyes
Aprobado por: F. Reyes

Anexo 4. Formulario para ingreso de datos.

Género	Tamaño	Abundancia	A.R.	Densidad # col/orge	Co/L
Aphanizomenon	m	18	6.0	19,149	421,277
Aphanizomenon	p	18	6.0	19,149	210,688
Dolichospermum	m	3	1.0	3,191	70,213
Dolichospermum	p	3	1.0	3,191	35,106
Dolichospermum	p	90	30.0	95,745	7,180,851
Limnoraphis	3	45	15.0	47,872	225
Limnoraphis	2	57	19.0	60,688	150
Limnoraphis	4	63	21.0	67,021	300
Microcystis	1	3	1.0	3,191	75
0	-	0	0.0	0	0
0	-	0	0.0	0	0
Total					300

Cuadros
SM1
SM2
SM3
Total

Género	Tamaño	Cantidad
Aphanizomenon	m	18
Aphanizomenon	p	3
Dolichospermum	m	3
Dolichospermum	p	90
Limnoraphis	3	45
Limnoraphis	2	57
Limnoraphis	4	63
Microcystis	1	3

Fitoplancton	
Cod. Lab.	2022-F-24
Sitio:	Santiago
Fecha muestreo	16-05-23
Hora:	11:36
Tipo:	Bloom
Profundidad: (m)	0-15
Vo: (ml)	1000
Vf: (ml)	100
V contado: (ml)	0.094
Fecha conteo	17-05-23

No.	Género	Tamaño
1	Limnoraphis	1
2	Limnoraphis	2
3	Limnoraphis	3
4	Limnoraphis	4
5	Aphanizomenon	p
6	Aphanizomenon	m
7	Dolichospermum	p
8	Dolichospermum	m
9	Microcystis	1
10	Limnoraphis	1
100	Limnoraphis	4
200	Limnoraphis	4
298	Limnoraphis	2
299	Limnoraphis	4
300	Limnoraphis	3

CALCULO VOLUMEN CONTADO

Camara Sedgewick Rafter


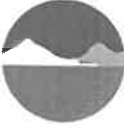
Número de cuadros Camara Sedgewick Rafter = 1000
 Volumen Camara Sedgewick Rafter = 1 ml

1000 cuadros → 1 ml
 x cuadros → ?

Vol. Contado = [X cuadros * 1 ml]
 (1000 cuadros)

NÚMERO DE CÉLULAS POR COLONIA

Género	Tamaño			
	1	2	3	4
Limnoraphis	75	150	225	300
Dolichospermum		P		G
Aphanizomenon		11		22
Microcystis		11		22
				Cálculo por lóbulo

  <p>AMSCLAE CENTRO DE ESTUDIOS ATITLÁN-CEA</p>	<p align="center">Procedimiento Operacional Estándar</p> <p align="center">RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO</p>	<p>POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 15 de 16</p> <p>Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes</p>
--	---	--


Anexo 5. Formato de informe del sistema de alerta relacionados a florecimiento de algas y cianobacterias.

LOGO AMSCLAE LOGO CEA-UVG

MESA TÉCNICO - CIENTÍFICA
INFORME DE FLORECIMIENTO
(Fecha de elaboración)

ANTECEDENTES: (valor de alerta de la alerta, acciones de monitoreo (frecuencia y muestreo) y las acciones antes del florecimiento de Cyanobacterias)

Con base en el sistema de alerta por florecimientos en el lago Atitlán se establece lo siguiente:

NIVEL DE ALERTA	PARÁMETRO
(Amarillo, Atenuación: agua)	(con Sistema de alerta por (Cianobacterias, algas))
RECOMENDACIONES	
Medidas (cuando sistema de alerta por florecimiento algas)	
Conjuntos de la alerta (por contaminación)	
	
Después de liberación de la alerta de monitoreo	
(Página: InformeAlerta)	

Color del cuadro según la alerta

LOGO AMSCLAE LOGO CEA-UVG

MESA TÉCNICO - CIENTÍFICA


**CONOCE LAS CONDICIONES DEL LAGO ATITLÁN,
RESPECTEMOS EL CUANTO SEMÁFORO**

NIVEL DE ALERTA

Normal

Color y apariencia


Olutas y recomendaciones



Bajo

Color y apariencia


Olutas y recomendaciones



Medio

Color y apariencia


Olutas y recomendaciones



Alto


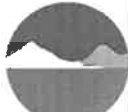
Color y apariencia

Olutas y recomendaciones



Conoce más en: [https://www.amsclae.org](#)
 o también en: [https://www.ceauvg.org](#)

NO TEMAS MIEDO, TEN CUIDADO

 AMSCLAE	 CENTRO DE ESTUDIOS ATITLÁN-CEA	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 14 Versión: 4 Fecha: 14/Nov/2024 Página: 16 de 16
RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DURANTE UN FLORECIMIENTO			Preparado por: J. Rodríguez y M. Martínez Revisado por: M. Martínez y F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

Anexo 6. Ciano semáforo

**CONOCE LAS CONDICIONES DEL LAGO ATITLÁN,
RESPETEMOS EL CIANO SEMÁFORO**

Recomendaciones durante florecimientos

NIVEL DE ALERTA

Normal



Color y apariencia:
El agua tiene un aspecto limpio y transparente.

Efectos y recomendaciones:
Agua apta para uso recreativo.
Apta para consumo humano con tratamiento previo.





Bajo



Color y apariencia:
Apariencia del agua turbia.
Presencia del algas en forma de filamentos.

Efectos y recomendaciones:
Evitar el uso recreativo o lavarse con agua limpia al salir del lago.
Apta para consumo humano con tratamiento previo.





Medio



Color y apariencia:
Color del agua verdosa.
Presencia de manchas evidentes en la superficie.

Efectos y recomendaciones:
Agua no apta para consumo humano ni para animales.
No se recomienda para uso recreativo.
Si consume pescado, limpiar adecuadamente.





Alto



Color y apariencia:
Masa pastosa y densa de color amarillenta o marrón.

Efectos y recomendaciones:
Agua no apta para consumo humano.
Riesgo alto para la salud, no bañarse con agua del lago.
No secar la cianobacteria, ni realizar jornadas de limpieza acuática.
No comer pescado, cangrejo, ni caracoles.







AMSCLAE

Cualquier señal de florecimiento informar a la AMSCLAE
al teléfono 79616464 ext. 113 o al correo dica@amsclae.gob.gt

NO TENGAS MIEDO, TEN CUIDADO


 CENTRO DE ESTUDIOS
 ATITLÁN-CEA

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 1 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Evaluar la calidad del agua a través del ensamble de macroinvertebrados acuáticos, mediante el índice BMWP/Atitlán.

2. Aplicación

El método es aplicable a sistemas lóticos, el cual evalúa el impacto debido a la contaminación orgánica e inorgánica en el sistema.

3. Referencias

Metodología estandarizada de muestreo multi-hábitat de macroinvertebrados acuáticos mediante el uso de la red "D" en ríos de El Salvador.

Sermeño Chicas, J.M., Pérez, D., Muños Aguillón, S.M., Serrano Cervantes, L., Rivas Flores, A. W. & A.J. Monterrosa Urias. 2010. Metodología estandarizada de muestreo multi-hábitat de macroinvertebrados acuáticos mediante el uso de la Red "D" en ríos de El Salvador. Proyecto Universidad de El Salvador (UES)-Organización de los Estados Americanos (OEA). Editorial Universitaria UES, San Salvador, El Salvador. 26 pág.

4. Terminología y abreviaciones

Índice BMWP/Atitlán (Biological monitoring working party adaptado para la cuenca del lago Atitlán)

Micrómetro (μm)

Metro (m)

Mililitro (mL)

Litro (L)

Minutos (min.)

Horas (hrs)

Onza (Oz)


Galón (Gal.)

Organismos (Org.)

Abundancia relativa (AR)

5. Principio

El índice BMWP fue establecido en Inglaterra en 1970 (Roldan 1999), como un método sencillo y rápido para evaluar la calidad del agua usando los macroinvertebrados acuáticos como bioindicadores. Este índice ha sido muy utilizado en Europa y ha sido modificado y adaptado para algunos países en América. El método solo requiere llegar hasta nivel de familia y los datos son cualitativos (presencia/ausencia). Cada familia tiene un valor de tolerancia que va de 1 (tolerantes) a 10 (sensibles) según la contaminación orgánica. El valor total del índice se obtiene sumando los puntajes de cada familia presente, independientemente de su abundancia o diversidad.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 2 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

6. Documentos asociados

Seguridad en el Laboratorio POE - 4
Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5
Medición *in situ* POE - 3
Boleta de campo
Claves taxonómicas
Hoja de datos y cálculos

7. Recomendaciones

Considerar las siguientes normas como importantes y obligatorias:

No ingresar a los cuerpos de agua cuando su cauce este en su nivel máximo durante la temporada lluviosa

Tomar en cuenta las posibilidades de acceso, transporte adecuado, estado del tiempo, etc

Cuando en condiciones de estiaje el ancho, profundidad y corrientes del río, sean demasiado fuertes, se debe muestrear cerca de la orilla (hasta donde la fuerza de la corriente lo permita) siempre procurando tomar en cuenta la mayor cantidad de hábitats.

Usar guantes para evitar el contacto con las aguas contaminadas y protegerse de algún peligro físico al introducir las manos en el río para lavar piedras o remover material.

8. Equipos, materiales y reactivos

8.1 *Reactivos*

Etanol, solución acuosa al 95%

Etanol, solución acuosa al 70%

Agua pura

Hipoclorito de sodio al 10%

8.2 *Cristalería*

Viales (varios volúmenes)


Probeta 250 mL

Balón aforado (1 L)

Cajas de Petri

8.3 *Equipo*

Red marco D con apertura de malla de 500 μm

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 3 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

Fascos de plástico de 1 oz

Pinzas entomológicas

Pisetas

Guantes de nitrilo, varios tamaños

Botas de hule

Etiquetas de campo

Lápiz

Bolsas con cierre hermético (1 Gal. aprox.)

Rapidógrafo con tinta indeleble

Bandejas de 3 L aproximadamente

Microscopio estereoscopio

GPS

Cronómetros

Cámara digital

Cinta métrica

Cajas plásticas o hieleras

Equipo multiparamétrico

Caudalímetro

9. Preparación de soluciones


9.1 *Solución de alcohol al 70% (preparación para 1 L)*

Reactivos 737 mL de alcohol al 95%

263 mL de agua grado reactivo

Procedimiento Colocar 100 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 1 L. Agregar lentamente los 737 mL de alcohol al 95%, sea cuidadoso ya que este procedimiento eleva la temperatura. Mezclar y dejar que la solución se enfríe. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento Mantener a temperatura ambiente por un máximo de 6 meses para evitar evaporación del alcohol.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 4 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

10 Procedimiento

10.1 Procedimiento para la recolección de las muestras en campo

Previo a realizar la recolecta, en la boleta de campo (anexo 1) registrar las condiciones particulares de cada sitio (parámetros fisicoquímicos, caracterización de hábitat, caudal, etc), garantizando de esta manera obtener la misma información ambiental o geográfica de los sitios de muestreo.

Hay dos tipos de muestreo *in situ* y por tiempo, el investigador deberá escoger el procedimiento de recolección de las muestras en campo de acuerdo a sus objetivos, diseño experimental y disponibilidad de tiempo y recursos.

10.1.1 Muestreo *in situ*

- En cada sitio de muestreo se debe elegir un tramo no superior a 50 m de largo, en el cual se identificaran distintos micro hábitats, como: zonas con corriente suave, corriente fuerte, sustrato duro, sustrato suave, vegetación acuática emergida, tanto dentro del río como en sus orillas, presencia de materia orgánica en descomposición (hojarasca, madera, troncos), contenidos de lodos y/o arenas, evidencia de algas (perifiton) u otras condiciones que tiendan a favorecer la biodiversidad de organismos presentes en el tramo seleccionado.
- Una vez identificado los distintos micro-hábitats, se procederá a realizar el muestreo de los macroinvertebrados, para lo cual se deberá muestrear intensivamente durante un periodo de 2 hrs (efectivas). Nota: Las dos horas podrán distribuirse entre las personas que estén realizando el muestreo, es decir, si van cuatro personas, el muestreo se podrá realizar durante 30 min, para un total de 2 hrs.

Dentro de los 30 min, los arrastres con la red “D” pueden realizarse en lapsos de 10 a 15 min, esto con el fin de que no se sature la red y se escapen los organismos. Durante cada lapso de tiempo se podrá hacer la recolección *in situ* de los macroinvertebrados, con la ayuda de pinzas y una bandeja.


- Para los arrastres se debe colocar la red “D” aguas abajo (en contra de la corriente) del micro hábitat y/o sustrato identificado. Luego se deberá iniciar a patear o mover la arena, hojarasca, grava, piedras, etc, a lo largo de los 50 m, procurando que el material o los macroinvertebrados que están a la deriva queden atrapados dentro de la red “D”.

Para los microhábitats correspondientes a vegetación acuática emergente o sumergida en los márgenes del río, pasar la red por entre la vegetación, las raíces sumergidas y las macrófitas.

Para los micro hábitats de arena, grava o barro, remover el fondo con los pies y procurar que el material que flote o arrastra la corriente sea atrapado en la red “D”

Cuando la red “D” es pasada por lugares con abundante hojarasca, tenderá a acumular gran cantidad de esta, por lo que será necesario introducir la red con la hojarasca en el agua y lavar cuidadosamente el material tratando que los insectos queden dentro y de esta forma poder remover con la mano, la mayor parte de material sin perder los organismos vivos acumulados en ella.

- Depositar el material recolectado en una bandeja, preferiblemente de color blanco, donde con unas pinzas entomológicas se procederá a recolectar *in situ* los organismos. Sí hay mucha hojarasca o ramas grandes dentro de la bandeja, se recomienda lavar cuidadosamente con un poco de agua el material y removerlo, para tener una mejor visión de los organismos.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 5 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

- Seleccionar al azar los organismos, tratando de que los organismos recolectados sean representativos del total de la muestra.
- Los organismos deberán ser depositados en frascos de 1 oz con alcohol al 70%, los cuales deben estar debidamente etiquetados y rotulados con la información sugerida en el numeral 10.2. Este proceso se repetirá hasta completar las 2 hrs preestablecidas.
- Finalmente, colocar los frascos en una caja plástica o bolsa con cierre hermético para su traslado al lugar de procesamiento e identificación.

10.1.1 *Muestreo por tiempo*


- En cada sitio de muestreo se debe elegir un tramo no superior a 50 m de largo, en el cual se identificaran distintos micro hábitats, como: zonas con corriente suave, corriente fuerte, sustrato duro, sustrato suave, vegetación acuática emergida, tanto dentro del río como en sus orillas, presencia de materia orgánica en descomposición (hojarasca, madera, troncos), contenidos de lodos y/o arenas, evidencia de algas (perifiton) u otras condiciones que tiendan a favorecer la biodiversidad de organismos presentes en el tramo seleccionado.
- Una vez identificado los distintos micro hábitats se procederá a realizar la recolecta de tres submuestras. Cada submuestra debe incluir todos los tipos de microhábitats.
- Previo a la recolecta se deberán rotular las tres bolsas con cierre hermético con un marcador indeleble con la información sugerida en el numeral 10.2
- Colocar la red “D” aguas abajo (en contra de la corriente) del micro hábitat y/o sustrato identificado. Luego se deberá iniciar a patear o mover la arena, hojarasca, grava, piedras, etc, a lo largo de los 50 m, procurando que el material o los macroinvertebrados que están a la deriva queden atrapados dentro de la red “D”.

Para los microhábitats correspondientes a vegetación acuática emergente o sumergida en los márgenes del río, pasar la red por entre la vegetación, las raíces sumergidas y las macrófitas.

Para los micro hábitats de arena, grava o barro, remover el fondo con los pies y procurar que el material que flote o arrastra la corriente sea atrapado en la red “D”

Cuando la red “D” es pasada por lugares con abundante hojarasca, tenderá a acumular gran cantidad de esta, por lo que será necesario introducir la red con la hojarasca en el agua y lavar cuidadosamente el material tratando que los insectos queden dentro y de esta forma poder remover con la mano, la mayor parte de material sin perder los organismos vivos acumulados en ella.

- Muestrear intensivamente durante un período de 3 minutos (por sub-muestra) para un total de 9 minutos.
- Depositar el material recolectado en la red “D” en las bolsas con cierre hermético, con capacidad de 1 Gal. aproximadamente. Se recomienda colocar la muestra en doble bolsa, para evitar rompimiento de la bolsa y derrame del alcohol.
- Inspeccionar detenidamente la red “D” para atrapar con una pinza entomológica los organismos que hayan quedado adheridos a la red y colocarlos en su respectiva bolsa.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 6 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

- Luego de haber depositado en la bolsa todo el material recolectado agregar alcohol al 95%, procurar que éste quede cubierto. Nota: Cada submuestra debe contener su respectiva etiqueta de identificación (10.2).
- Continuar con el muestreo hasta completar las tres submuestras de tres minutos cada una, siguiendo el mismo proceso señalado para la submuestra uno.
- Al finalizar la recolecta de las tres submuestras, lavar la red “D” con hipoclorito de sodio al 10% para evitar el traslape de organismos de un punto con otro y/o contaminación cruzada.
- El material recolectado se mantendrá por separado en bolsas con cierre hermético.
- Finalmente, colocar las submuestras en una caja plástica o hielera para su traslado al lugar de procesamiento.

10.2 *Etiquetado de las muestras*

- Todas las muestras, submuestras y bolsas con cierre hermético deben tener su respectivo rotulado y etiqueta de identificación, la cual debe contener la siguiente información:

Nombre del sitio, fecha (día/mes/año), hora, recolector y número de submuestra (Fig. 1). El tamaño de la letra deberá ser de # 4

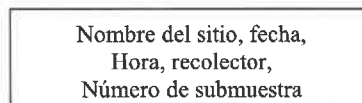


Figura 1. Etiquetado de las muestras colectadas

Nota: el mes deberá ser en numeración romana.

- Almacenar adecuadamente las muestras para su transporte y posterior limpieza, separación e identificación de los organismos en el laboratorio.


10.3 *Procedimiento para la limpieza y separación de las muestras en el laboratorio*

10.3.1 *Muestras recolectadas por tiempo*

- Depositar en la bandeja plástica color blanco, la muestra recolectada en el sitio de muestreo.
- Lavar cuidadosamente el material de la muestra (hojas, restos de vegetación, ramas, piedras) con agua del chorro, para desprender los organismos que pudieran estar adheridos. Luego de lavar el material, removerlo de la bandeja.
- Luego de haber removido el material grande de la muestra, con unas pinzas, retirar cada uno de los organismos y depositarlos en un frasco de 1 oz con alcohol al 70%, para su posterior almacenamiento e identificación.
- La etiqueta de la muestra debe depositarse en el frasco donde están los organismos para no perder información.

10.4 *Procedimiento para la identificación de las muestras en el laboratorio*

- Depositar la muestra limpia en cajas de petri con alcohol al 70%.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 7 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

- Separar e identificar cada organismo al nivel taxonómico máximo posible (se recomienda a nivel de familia), con la ayuda de claves taxonómicas, afines a la región.
- Luego de haber identificado todo el material recolectado deberán almacenarse los organismos en viales según el grupo taxonómico al que pertenezca. Cada vial deberá contener dos etiquetas, una taxonómica y otra geográfica.
- La información que debe incluirse en la etiqueta geográfica es la siguiente: nombre del sitio (país, departamento, municipio, localidad, nombre del río), coordenadas, altitud, fecha (día/mes/año), recolector (Fig. 2). El tamaño de la letra deberá ser de # 4.



Figura 2. Etiqueta geográfica de las muestras colectadas

- La información que debe incluirse en la etiqueta de información taxonómica es la siguiente: orden, familia, nombre de la persona que identificó el material y fecha (día/mes/año) (Fig. 3). El tamaño de la letra deberá ser de # 4.

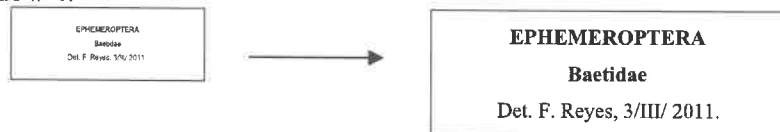


Figura 3. Etiqueta de identificación taxonómica

Nota: el mes deberá ser en numeración romana.

- Todos los viales deben preservarse y almacenarse en frascos de vidrio con tapadera, debidamente etiquetados y en alcohol al 70%. Los frascos deben almacenarse en un ambiente con poca o nula influencia de luz y a una baja temperatura, para evitar la evaporación del alcohol y daño del material de referencia, hasta que sean depositados en una colección de referencia debidamente autorizada.

La información que debe incluirse en el frasco es la siguiente: logo, nombre del laboratorio (de la muestra) y nombre del sitio (país, departamento, municipio, localidad, río), coordenadas, altitud, fecha (día/mes/año), responsable y observaciones.



	Nombre del laboratorio
Fecha _____	Código: _____
Sitio: _____	
_____	Altitud _____ msnm
Coordenadas: N _____ O _____	
Responsable _____	
Observaciones: _____	

Figura 4. Etiqueta de identificación de los frascos.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 8 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

- Una vez identificados y contados los organismos se procederá a digitalizar la información para realizar los cálculos y el reporte final.

11. Cálculos

11.1 *Cálculo para abundancia relativa*

Elaborar un listado taxonómico (cuadro 2) que incluya el número de individuos por taxa, abundancia relativa y valor de tolerancia (Anexo 2). El cálculo de la abundancia relativa por taxa se obtiene con la siguiente fórmula:

$$AR = (n / N) * 100$$

Donde n es el número de organismo por taxa, N es el número total de organismos de la muestra.

11.2 *Cálculo para el índice BMWP/Atitlán*

Los valores de tolerancia por familia que se incluyeron en el listado taxonómico servirán para el cálculo del Índice BMWP/Atitlán. El cálculo del índice se obtiene con la siguiente fórmula:

$$BMWP/Atitlán = (\Sigma ti)$$


En donde, *ti* es el puntaje de tolerancia por ese taxón.

11.3 *Calculo de la calidad del agua según el índice BMWP/Atitlán*

Con el valor del índice BMWP/Atitlán obtenido en el inciso anterior, determinar la calidad del agua con los valores del cuadro siguiente:

Cuadro 1. Valoración de calidad de agua para la obtención del BMWP/Atitlán.

Clase	BMWP /Atitlán	Calidad del agua	Significado	Color
I	> 120	Excelente	Aguas de calidad excelente.	Azul
II	91 - 120	Buena	Aguas de calidad buena, no contaminadas.	Azul
III	61 - 90	Regular	Aguas de calidad regular, contaminación moderada.	Verde
IV	36 - 60	Mala	Aguas de calidad mala, contaminadas.	Amarillo
V	16 – 35	Muy Mala	Aguas de calidad mala, muy contaminadas.	Naranja
VI	< 16	Pésima	Aguas de calidad muy mala, extremadamente contaminadas.	Rojo

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 9 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

12 Reporte

12.1 Presentación de los resultados

Los resultados obtenidos de los cálculos realizados se deberán presentar de la siguiente forma:

Cuadro 2. Listado taxonómico, riqueza, abundancia relativa y calidad del agua del sitio de muestreo según el BMWP/Atitlán.

Orden	Familia	Valor de tolerancia	Sitio de muestreo	
			Numero de organismos	Abundancia Relativa
Coleoptera	Elmidae	5	57	21
Ephemeroptera	Baetidae	4	10	4
Megaloptera	Lepidostomatidae	9	96	35
Odonata	Calopterygidae	4	113	41
Cantidad de organismos			276	
Número de taxa			4	
Valor de BMWP-Atitlán			22	
Calidad del Agua			Muy Mala	
Color			Naranja	

12.2 Presentación gráfica de los resultados

Todos los resultados generados se pueden presentar de forma gráfica de la siguiente manera.

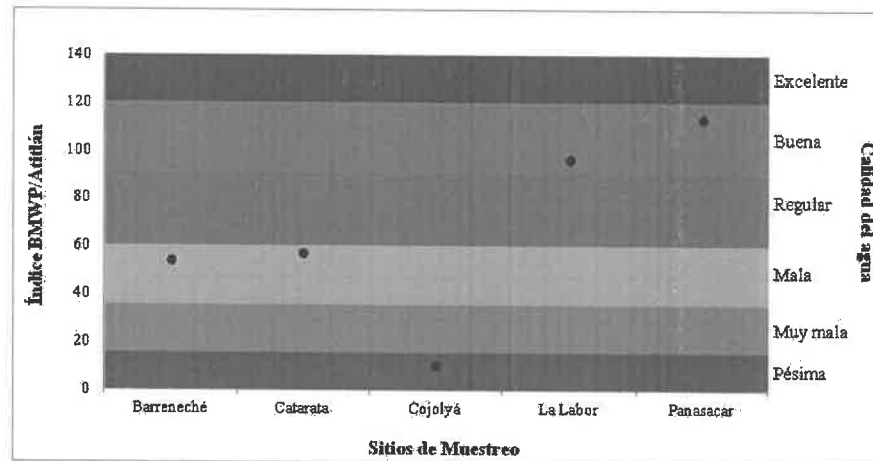



Figura 4. Representación gráfica de los valores del índice BMWP/Atitlán

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017 Página 10 de 14
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes


Anexo 1. Plantilla para evaluación de las características del sitio de muestreo.

BOLETA DE CAMPO -RÍOS-	
No. _____	Nombre del sitio: _____
Fecha: (D/M/A) _____	hora de muestreo: _____
Coordenadas: _____ y _____	Altitud _____ msnm

Tipo de curso: __ Inicial __ Medio __ Bajo __ Desembocadura __ Lago __ No identificada. Ancho aproximado: ____ m. Profundidad aproximada: ____ m. Velocidad del agua: __rápida __ moderado __ lento __ estancado. Si es medida la velocidad ____ m/s. Tipo de sustrato: __ concreto __ piedras-arena gruesa __ arena __ arcillo-lodoso. Rocas: __ muy grandes __ grandes __ medianas __ pequeñas. Superficie de las rocas: __ limpia __ con crecimiento de perifiton (algas) __ musgo. En el sitio hay: __ horajasca __ troncos y ramas sumergidas __ raíces sumergidas. Otra fauna: __ renacuajos, __ peces, _____ otro. Color del agua: _____ Olor del agua: _____ Presencia de: __ des. Orgánicos __ espuma __ aceites __ org. muertos __ des. sólidos. Otra observación: _____
--


Temperatura del agua: _____ °C Temperatura ambiental: _____ °C Secchi _____ pH: _____ Conductividad: _____ (µS/cm) TDS: _____ (mg/L) Salinidad: _____ (mg/L) Oxígeno disuelto: _____ (mg/L) _____ (% saturación). Sol. Sed.: _____ (mg/L). Condiciones ambientales: __ Soleado __ Lluvioso __ Nublado _____ otros Otras medidas: _____
--

Vegetación de la orilla: _____ _____ Vegetación dentro del agua: _____ Exposición: __ 100% sombra __ sombra con ventanas __ grandes claros __ 100% expuestos. Comentarios/observaciones: _____
--

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 11 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

Anexo 1. (Continuación) Planilla para evaluar y caracterizar la calidad de hábitat en ríos (Modificada de Barbour et al. 1999).

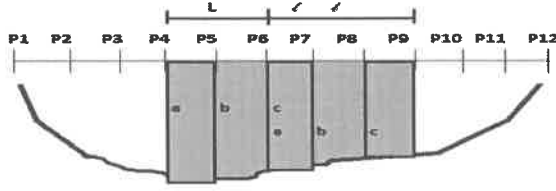
Parámetro	Óptimo	Subóptimo	Marginal	Pobre
1. Heterogeneidad de sustratos disponibles para la epifauna	Más de 70% del sustrato es estable y puede ser colonizado por la epifauna (El trecho presenta una mezcla de piedras, troncos sumergidos o superficiales o cualquier otro sustrato estable)	Entre 40 y 70% del sustrato es estable. Además, existe un sustrato nuevo aun sin condiciones para ser habitado	Entre 20 y 40% del sustrato es estable. Frecuentemente perturbado o removido	Menos de un 20% del sustrato es estable. Ausencia de hábitats adecuados.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
2. Empotramiento del sustrato	Entre 0 y 25% de la superficie de rocas, piedras y grava está rodeada de sedimento fino.	Entre 25 y 50% de la superficie de rocas, piedras y grava rodeadas de sedimento fino	Entre 50 y 75% de la superficie de rocas, piedras y grava rodeadas de sedimento fino	Más de un 75% de la superficie de rocas, piedras y grava rodeadas de sedimento fino
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
3. Relación profundidad y velocidad	El trecho del río presenta las cuatro combinaciones siguientes: a) lento/profundo, b) lento/bajo, c) rápido/profundo, d) rápido/bajo	Sólo tres combinaciones. La ausencia de rápido/bajo determina el menor puntaje	Sólo dos combinaciones. La ausencia de rápido bajo y lento/bajo determina el menor puntaje	Una sola combinación presente. Usualmente lento/profundo)
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
4. Deposición de sedimentos	Ausencia de islas o bancos de arenas. Menos del 5% del fondo afectado por la deposición de sedimentos	Reciente y escasa formación de bancos de piedras, arena o sedimento fino. Entre el 5 y el 30% del fondo afectado por la deposición de sedimentos; ligera deposición en los pozos	Deposición moderada de grava, arena o sedimento fino sobre bancos viejos y nuevos. Entre 30 y 50% del fondo afectado. Sedimento sobre obstrucciones, constricciones y recodos. Moderada deposición en pozos.	Grandes depósitos de material fino. Muchos bancos. Más del 50% del fondo cambia con frecuencia. Pozos casi ausentes debido a la gran deposición de sedimentos.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
5. Estado del cauce de flujo	El nivel del agua alcanza la base de las márgenes y la exposición del sustrato de fondo es mínima.	El agua sólo cubre el 75% del cauce o menos del 25% del sustrato de fondo queda expuesto.	El nivel del agua cubre entre el 25 y 75% del cauce y queda expuesta la mayor parte del sustrato de los rápidos	Muy poca agua sobre el cauce y la mayoría como pozos.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
6. Alteración del cauce	Ausencia o mínima presencia de canalización o dragado. Corriente con cauce normal.	Cierta canalización presente por puentes. Evidencia de canalización actual o pasada	Canalización extensiva. Diques u otras estructuras presentes en ambas márgenes. Entre el 40 y 80% del trecho del río canalizado y alterado.	Márgenes protegidas con gabiones o cemento. Más del 80% del trecho del río canalizada y alterado. Los hábitats internos eliminados totalmente.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
7. Frecuencia de rápidos	Ocurrencia de rápidos relativamente frecuente. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río es < 7 (generalmente 5 o 7).	Ocurrencia de rápidos poco frecuente. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río se encuentra entre 7 y 15.	Ocurrencia ocasional de rápidos. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río se encuentra entre 15 y 25.	Por lo general el agua corre sin interrupción o rápidos muy bajos. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río es mayor a 25.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1 0
8. Estabilidad de las Márgenes	Márgenes estables. Ausencia de erosión o desprendimientos. Poca posibilidad de problemas futuros. Menos del 5% de la margen está afectada	Estabilidad moderada. Pequeñas áreas de erosión. Entre 5 y 30% de las márgenes del trecho tiene áreas de erosión.	Inestabilidad moderada Entre 30 y 60% de las márgenes del trecho tiene áreas de erosión. Posibilidad de fuerte erosión durante las crecidas.	Inestabilidad completa. Áreas muy erosionadas. Frecuencia de áreas despejadas en trechos rectos y recodos. Entre 60 y 100% de las márgenes del trecho erosionadas.
Puntos:	Margen Izquierda 10 5	8 7 6	5 4 3	2 1 0
Puntos:	Margen Derecha 10 5	8 7 6	5 4 3	6 1 0
9. Vegetación protectora de las riberas	Más del 90% de las márgenes y la zona ribereña está cubierta por vegetación nativa incluyendo árboles, arbustos, macrofitas. Vegetación tupida natural.	Entre el 70 y 90% de las márgenes cubiertas por vegetación nativa. Vegetación algo abierta.	Entre el 50 y 70% de las márgenes cubiertas por vegetación nativa. Vegetación abierta.	Menos del 50% de las márgenes cubiertas por vegetación nativa.
Puntos:	Margen Izquierda 10 5	8 7 6	5 4 3	2 1 0
Puntos:	Margen Derecha 10 5	8 7 6	5 4 3	6 1 0
10. Amplitud de la vegetación ribereña	Extensión de la vegetación ribereña mayor a 18 m y sin impacto antrópico.	Extensión de la vegetación ribereña entre 12 y 18 m y un mínimo impacto antrópico	Extensión de la vegetación ribereña entre 6 y 12 m y un impacto antrópico evidente.	Extensión de la vegetación ribereña menor a 6 m. Poca o ninguna vegetación debido a un fuerte impacto antrópico.
Puntos:	Margen Izquierda 10 5	8 7 6	5 4 3	2 1 0
Puntos:	Margen Derecha 10 5	8 7 6	5 4 3	6 1 0
Total				

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 12 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes


Anexo 1. (Continuación). Boleta para registro de medición de caudales.

Localidad :					Fecha:					
Participantes:										
Hora de Inicio:				Fin:		Coordenadas				
Ancho de Banco:					N:					
Ancho del Cauce :					W :					
PROFUNDIDAD DE SECCIONES PARCIALES										
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
VELOCIDAD EN SECCIONES PARCIALES										
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
VELOCIDAD PROMEDIO USANDO FLOTADOR										
Distancia Recorrida:					Velocidad Promedio					
Tiempo de recorrido:										
PARAMETROS FISICOS										
Temperatura					O ₂					
PH					O ₂ %					
Sechi					Salinidad					
Sólidos Totales Disueltos (TDS)					Conductividad					
Sólidos Totales Suspendidos					Turbidez					

Cuadro 1. Espaciamiento de sondeos según el ancho del cauce

ANCHO DE CAUCE (m)		ESPACIO ENTRE SECCIONES	SECCIONES PARCIALES DE UN CAUCE
De:	A:	(m)	
0	1	0.20	<div style="text-align: center;"> $A_i = \frac{a+2b+c}{4} * L$  </div>
1	2	0.25	
2	4	0.50	
4	8	1.00	
8	15	1.50	
15	25	3.00	
25	50	3.00	


Fuente Manual de Hidrología (Herrera Ibáñez, 2011)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 13 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

Anexo 2. Puntuaciones asignadas a las diferentes familias de macroinvertebrados acuáticos para la obtención del índice BMWP/Atitlán.

ORDEN	FAMILIA	PUNTUACIÓN
D O T	Blephariceridae Polythoridae Odontoceridae	10
D E P T	Athericidae Heptageniidae Perlidae Ecnomidae, Hydrobiosidae, Lepidostomatidae	9
B E O T	Blaberidae Leptophlebiidae Aeshnidae, Cordulegastridae, Corduliidae, Perilestidae Calamoceratidae, Glossosomatidae, Leptoceridae	8
Cr C D O T	Gammaridae Lutrochidae, Psephenidae, Ptilodactylidae Ptychopteridae Gomphidae, Lestidae, Megapodagrionidae, Platystictidae, Protoneuridae Limnephilidae, Philopotamidae,	7
E T M N O	Euthyplociidae, Isonychidae Hydroptilidae, Polycentropodidae, Xiphocentronidae Corydalidae Nemata Libellulidae	6


Observaciones: D: Diptera, O: Odonata, T: Trichoptera, E: Ephemeroptera, P: Plecoptera, B: Blattaria, Cr: Crustacea, C: Coleoptera, H: Hemiptera, M: Megaloptera, N: Nemata, Ar: Arachnida, Tu: Turbellaria, Co: Collembola, L: Lepidoptera, Mo: Mollusca, A: Annelida

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 15 Versión: 1 Fecha: 31/03/2017
	CALIDAD DE AGUA MEDIANTE EL ÍNDICE BMWP/ATITLÁN (MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS)	Página 14 de 14 Preparado por: F. Reyes Revisado por: I. Arriola Aprobado por: F. Reyes

Anexo 2. (Continuación). Puntuaciones asignadas a las diferentes familias de macroinvertebrados acuáticos para la obtención del índice BMWP/Atitlán.

ORDEN	FAMILIA	PUNTUACIÓN
C	Dryopidae, Elmidae, Georissidae, Hydraenidae, Limnichidae, Scirtidae, Staphylinidae	5
E	Leptohyphidae, Oligoneuriidae, Polymitarciidae	
T	Helicopsychidae, Hydropsychidae	
H	Gerridae	
L	Crambidae	
Co	Collembola	
Tu	Turbellaria	
Cr	Pseudothelphusidae	
C	Chrysomelidae, Curculionidae, Dytiscidae, Gyrinidae, Haliplidae, Hydrophilidae, Lampyridae, Noteridae,	4
D	Ceratopogonidae, Dixidae, Dolichopodidae, Empididae, Sciomyzidae, Stratiomyidae, Tipulidae	
E	Baetidae, Caenidae	
H	Belostomatidae, Corixidae, Mesoveliidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae, Pleidae, Veliidae	
O	Calopterygidae, Coenagrionidae	
Mo	Pisidiidae; Ancyliidae, Planorbidae	
Ac	Hydrachnidae	
D	Ephydriidae, Muscidae, Simuliidae, Tabanidae	3
Mo	Bithyniidae, Hydrobiidae, Lymnaeidae, Physidae, Valvatidae	
Cr	Asellidae	
A	Glossiphoniidae	
D	Chironomidae, Culicidae, Psychodidae	2
D	Syrphidae	1
A	Oligochaeta	

Observaciones: D: Diptera, O: Odonata, T: Trichoptera, E: Ephemeroptera, P: Plecoptera, B: Blattaria, Cr: Crustacea, C: Coleoptera, H: Hemiptera, M: Megaloptera, N: Nemata, Ar: Arachnida, Tu: Turbellaria, Co: Collembola, L: Lepidoptera, Mo: Molusca, A: Annelida

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 1 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Determinación de la calidad microbiológica de muestras de agua e identificación de coliformes fecales por medio del método de fermentación en tubos múltiples.

2. Aplicación

El método es aplicable a muestras de agua potable o no potable. El análisis microbiológico es prioritario y debe realizarse en las primeras seis horas luego de haber sido recolectada la muestra.

Si se espera contaminación microbiológica baja en la muestra, considerar la metodología de filtración por membrana (POE -17).


3. Principio

Muchas enfermedades son transmitidas por la contaminación fecal-oral a través de alimentos y agua contaminados. Debido a que la identificación de cada uno de los patógenos que podrían estar presentes es difícil, se hace uso de índices e indicadores, cuya presencia es sugestiva de contaminación fecal, por ejemplo, el grupo de las coliformes y *Escherichia coli* (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014).

El grupo de las bacterias coliformes contiene un amplio rango de bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gramnegativos, no esporulados que desarrollan una colonia roja con brillo metálico dentro de 24 horas a 35-37°C, en un medio tipo Endo que contenga lactosa (WHO, 2011). Las coliformes producen aldehídos por la fermentación de la lactosa y presentan actividad β -galactosidasa (Gleeson y Gray, 1997).

E. coli y las coliformes termotolerantes son bacterias pertenecientes al grupo de las coliformes, que pueden fermentar lactosa a mayores temperaturas ($44,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$), produciendo ácido y gas. Adicionalmente, *E. coli* presenta actividad β -D-glucoronidasa (aprox. 97% de las cepas) y actividad triptofanasa (producción de indol a partir de triptófano) (Gleeson y Gray, 1997).

Tradicionalmente, las bacterias coliformes se consideraban pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, pero el grupo es más heterogéneo e incluye un rango más amplio, entre las que destacan *Serratia* y *Hafnia*. El grupo incluye especies fecales (comensales intestinales del ser humano y animales de sangre caliente), así como especies de vida libre (WHO, 2011). Lo anterior, hace a este grupo de bacterias poco específico, sin embargo, son utilizadas como índice de contaminación fecal debido a su frecuencia en heces, su fácil detección y similitudes a ciertos patógenos de la familia Enterobacteriaceae (Tortora, Funke y Case, 2007).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 2 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Por lo anterior, *E. coli* es mejor utilizada como indicador de contaminación fecal, debido a que es exclusiva del intestino, lo cual la hace más específica y posee una supervivencia limitada en agua (von Sperling, 2007).


Una técnica para el análisis de las bacterias coliformes es la fermentación en tubos múltiples, en dos fases (supuesta y confirmatoria). Esta metodología consiste en la inoculación de diluciones en serie del agua a analizar, en tubos con medio líquido (selectivo y diferencial) para el crecimiento de bacterias coliformes. Usualmente, las baterías constan de 9 o 15 tubos, dispuestos en tres diluciones distintas.

Los resultados del estudio se reportan en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos existentes. Este número, basado en fórmulas de probabilidad, es un cálculo de la densidad media de coliformes en la muestra. La precisión de la prueba incrementa con el número de tubos utilizados (APHA/AWWA/WPCF, 1989). Este método es utilizado bajo el supuesto de una distribución homogénea de las bacterias en la muestra, así como la estimación estadística en la que una muestra con mayor carga bacteriológica necesitará una mayor dilución para reducir dicha carga hasta un punto en el que no haya desarrollo bacteriano (Tortora, Funke y Case, 2007).

Existen medios especiales que facilitan la detección de estos microorganismos. El medio Flourocult® LMX contiene un sustrato cromogénico hidrolizable, para la detección de enzimas del grupo coliformes. La actividad β -galactosidasa de las bacterias les permite escindir el sustrato cromogénico, liberando el cromógeno. La actividad β -glucoronidasa de *E. coli* se determina mediante la escisión de un sustrato fluorogénico. En un resultado positivo, ocurre un cambio de coloración en el medio de amarillo a verde azulado, que indica la presencia de coliformes. Adicionalmente, la fluorescencia azul bajo luz UV de onda larga permite la detección de *E. coli* (Merck, s.f.).

4. Referencias

- 4.1. APHA/AWWA/WPCF (1989). Métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales. 17a Edición. American Public Health Association: US.
- 4.2. APHA/AWWA/WPCF (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Ed. American Public Health Association: US.
- 4.3. Norma Técnica Guatemalteca COGUANOR, NTG 29 001. (2013). Agua para consumo humano (agua potable). Especificaciones.
- 4.4. OMS, Organización Mundial de la Salud (2011). *Guidelines for drinking water quality*. Ginebra: WHO.
- 4.5. Gleeson, C. y Gray, N. (1997). The coliform index and waterborne disease: Problems of microbial drinking water assessment. Londres: E & FN Spon.N
- 4.6. Merck. (s.f.). Merck Microbiology Manual, 12th. Ed. Recuperado de https://www.analytix-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/merck-de/Merck_Microbiology_Manual_12th_edition.pdf
- 4.7. Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. (9na Ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 3 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

4.8. Universidad Nacional Autónoma de México. (s.f.). Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (número más probable o NMP). Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Analisis_Agua_NMP_22309.pdf

4.9. Von Sperling, M. (2007). *Wastewater characteristics, treatment and disposal*. Londres: IWA Publishing.

5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras para microbiología POE - 18

Análisis microbiológico de aguas: filtración por membrana POE - 17

Lavado de cristalería POE - 5

Procedimiento de limpieza de autoclave, POE - 20

Procedimiento de limpieza de equipo metálico de filtración para microbiología, POE - 21

6. Terminología y abreviaciones

Litros (L)

Mililitros (mL)

Microlitros (μ L)

Micrometros (μ m)

Número más probable (NMP)

7. Materiales y Equipo

7.1 *Reactivos y medios de cultivo*

Agua desmineralizada estéril

Agua desmineralizada

Caldo Flourocult® LMX granulado

Alcohol etílico al 70%

Reactivo de Kovacs


7.2 *Material*

Puntas estériles para pipetas automáticas de 10 y 1.0 mL

Tubos de cultivo con tapa y rosca, de 20 y 12 mL

Cristalería limpia para dilución

Gradillas

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 4 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Guantes estériles
 Beakers de 500 mL
 Probeta de 100 mL
 Varilla de agitación
 Agitadores magnéticos
 Varilla para manipulación de agitadores magnéticos
 Papel parafilm

7.3 *Equipo*

Estufa eléctrica con agitador magnético incorporado
 Mechero
 Pipetas automáticas de volumen ajustable entre 100 µl y 10 mL
 Incubadora eléctrica de convección, 35-37°C
 Autoclave eléctrica

8. **Recomendaciones de seguridad especiales**

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, se deben considerar las siguientes normas como importantes y obligatorias:

Manipular apropiadamente las muestras, principalmente aquellas con altas cargas bacterianas, así como los tubos con medio de cultivo que presentaron crecimiento bacteriano luego de 24 horas de incubación, debido al riesgo bioinfeccioso que representan.


Los tubos de medios de cultivo usados, con o sin crecimiento bacteriano, deben autoclavarse a 121°C y 15 lb de presión, durante 15 minutos. Posteriormente, luego de haberse enfriado, el medio líquido deberá ser descartado en reservorios plásticos adecuados, con tapadera de rosca. Estos desechos deben tratarse como especiales, dándoles el destino final adecuado.

9. **Preparación de materiales y equipos previo al análisis**

Previo a analizar las muestras microbiológicas, se debe de preparar el medio de cultivo líquido, materiales y equipos necesarios para el análisis.

9.1 **Preparación del medio de cultivo líquido Flourocult® LMX**

Cálculos: partiendo de la cantidad de tubos a utilizarse (3 series de 5 o 3 tubos), debe calcularse el volumen de medio que habrá de prepararse. La primera dilución (la primera fila de 3 o 5 tubos), contendrá 10 mL de medio con doble concentración. Las dos siguientes diluciones (filas de 3 o 5 tubos), contendrán 9 y 9.9 mL de medio de cultivo con concentración simple, respectivamente. Utilizar las siguientes fórmulas para la preparación:

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 5 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Doble concentración

Volumen de agua desmineralizada:

$$mL \text{ de agua} = (\# \text{ tubos} * 10mL) + 15mL \text{ extra}$$

Gramos de medio de cultivo:

$$g \text{ de medio pesado} = mL \text{ de agua} * \frac{17 g \text{ de medio} * 2}{1000 mL}$$

Concentración simple

Volumen de agua desmineralizada:

$$mL \text{ de agua} = (\# \text{ tubos} * 9mL) + (\# \text{ tubos} * 9.9 mL) + 15mL \text{ extra}$$

Gramos de medio de cultivo:

$$g \text{ de medio pesado} = mL \text{ de agua} * \frac{17 g \text{ de medio}}{1000 mL}$$

El medio habrá de prepararse en beakers de 500 mL (con mayor o menor capacidad, dependiendo del volumen a preparar). Se verterá el volumen de agua a usar en el beaker (agua desmineralizada no estéril) y se agregará el medio granulado. Para la agitación, se utilizará la estufa y los agitadores magnéticos (no es necesario calentar el medio).

Cuando el medio está completamente homogenizado, se verterá en tubos limpios, con la ayuda de una pipeta automática de 10 mL, la cantidad que corresponda (Fig. 1). Se trabajará cada grupo de tubos en gradillas diferentes, apropiadamente rotuladas.

Los tubos serán autoclaveados a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos.

Se retirarán los tubos del autoclave y se dejarán enfriar a temperatura ambiente para posteriormente almacenarlos en refrigeración (temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$) Luego de preparados, los medios tienen una vida media menor a dos semanas.

9.1 Esterilización de equipo, materiales y agua para dilución

Las puntas para pipetas deben ser esterilizadas en paquetes de papel, antes de su uso. Los paquetes serán debidamente identificados con el número de puntas que contiene y el tipo de muestra que será trabajada con los mismos (río, lago, plantas de tratamiento, etc.).

El agua para dilución de las muestras debe ser esterilizada en recipientes de vidrio borosilicato, de preferencia, o de plástico autoclaveables.

Es obligatorio el uso de cinta testigo para el material ingresado a la autoclave, así como el registro del mismo en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril.



**Procedimiento
Operacional Estándar**

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
DE AGUAS: FERMETACIÓN EN
TUBOS MÚLTIPLES**

**POE – 16
Versión: 2
Fecha: 31/10/2018
Página: 6 de 9**

**Preparado por: C. Martínez
Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas
Aprobado por: F. Reyes**

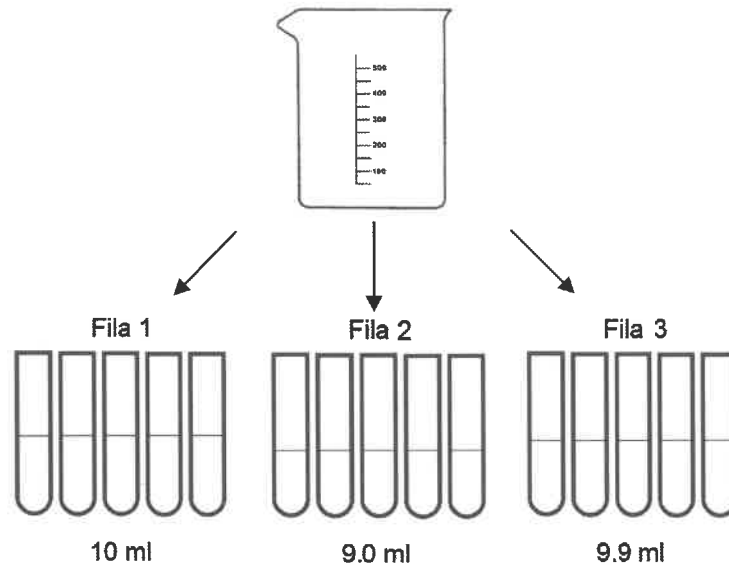


Figura 1. Esquema de volumen por fila de tubos

9.2 Limpieza de superficies de trabajo

La mesa de trabajo debe ser desinfectada con alcohol al 70% previo al inicio del procedimiento analítico. Se recomienda utilizar esta solución para la limpieza continua de las manos (guantes) durante el procesamiento de las muestras.


El procedimiento debe hacerse en presencia de al menos un mechero (de preferencia de gas). Este permite crear una zona aséptica de trabajo y esterilizar los instrumentos metálicos utilizados en el procedimiento analítico.

9.3 Temperatura de los insumos

Al realizar el análisis, la muestra y los medios de cultivo deben estar a temperatura ambiente.

9.4 Controles

Se incluirán dos controles, uno debe ser inoculado con agua desmineralizada estéril para evaluar que esta se encuentre libre de microorganismos contaminantes. El segundo será un medio de cultivo hidratado y sin inocular para controlar la esterilidad de los medios de cultivo en el momento de uso. Se hará la lectura de los controles al igual que la de las muestras.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 7 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Actualmente, el Laboratorio de Calidad de Aguas de AMSCLAE no cuenta con cepas bacterianas de referencia (ATCC) para el control de los procedimientos microbiológicos. De llegar a implementarse el control de calidad con las mismas, se recomienda se realice de la siguiente manera:

Incluir como control positivo una cepa de *Escherichia coli* y como control negativo una de cepa de *Staphylococcus aureus*, utilizados para confirmación de coliformes. El control positivo evalúa la sensibilidad del medio (que este detecte de forma efectiva el microorganismo para el cual fue elaborado); el control negativo, la especificidad (que este no reaccione con microorganismos diferentes al que se busca detectar). De esta forma, el primero no debe mostrar cambio de color; el segundo, sí.

10. Procedimiento de análisis

Previo a empezar el análisis, diluir las muestras provenientes de puntos altamente contaminados. (Ver inciso 11.1: Dilución de las muestras).

Agitar la muestra por inversión, no menos de 6 veces, para alcanzar la dispersión homogénea de las bacterias. Si el frasco está completamente lleno, descartar de 5 a 10 mL, volver a cerrar y mezclar (esto permitirá la agitación completa).

Ordenar el set de tubos en una gradilla, colocando en la primera fila 3 o 5 tubos (dependiendo de modalidad seleccionada) con 10 mL de medio (doble concentración). En las filas dos y tres, 3 o 5 tubos con 9 mL y 9.9 mL de medio (concentración simple), respectivamente.

Con una punta estéril y una pipeta automática de 10 mL, inocular 10 mL de la muestra en cada uno de los 3 o 5 tubos (primera fila) conteniendo medio de doble concentración. Cerrar los tubos y mezclar por inversión.

Con una punta estéril y una pipeta automática de 1 mL, inocular 1 mL (1000 µl) de la muestra en cada uno de los tubos de la segunda serie (fila) la cual contiene 9 mL de medio de concentración simple. Cerrar los tubos y mezclar por inversión.

Con una punta estéril y una pipeta automática de 1 mL, inocular 0.1 mL (100 µl) de la muestra en cada uno de los tubos de la tercera serie (fila) la cual contiene 9.9 mL de medio de concentración simple. Cerrar los tubos y mezclar por inversión.

Incubar las gradillas durante 24 horas a 37°C, en condiciones aeróbicas. para el análisis de coliformes totales y *E. coli*. En el caso de análisis de coliformes fecales, incubar a 44°C, durante 24 horas. Cerrar los tubos sin mucha presión. Leer resultados.

Reincubar durante 12-24 horas más de ser necesario. Por ejemplo, en los casos de interrupción de la corriente eléctrica durante algunas horas. También, en los casos en los que se sospeche presencia de contaminación fecal y el resultado fuera negativo.

11. Interpretación de resultados

Realizar la lectura de los tubos a las 24 horas. Anotar en el cuaderno de registro correspondiente, los resultados observados. Anotar el número de tubos que tuvieron cambio de coloración de amarillo a verde azulado para cada una de las series de tubos. Reincubar de ser necesario.

De los tubos que mostraron cambio de color, realizar lectura bajo luz ultravioleta. Anotar el número de tubos, por serie, que presentaron fluorescencia azulada.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 8 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Confirmar aquellos tubos que presentaron fluorescencia, positivos para *E. coli*, con cuatro gotas de reactivo de Kovacs. La presencia de indol se manifiesta con una coloración roja que se forma sobre la fase acuosa del medio (resultado positivo).

Usando la tabla 9221, índice de NMP (APHA/AWWA/WPCF, 2001), interpretar los resultados tanto para coliformes totales o coliformes fecales (cambio de coloración) como para *E. coli* (fluorescencia).

11. Cálculos

11.1 Dilución de las muestras

Las muestras muy turbias, o aquellas que se sospeche tengan altas cargas bacterianas, deben ser diluidas apropiadamente. Las diluciones deben hacerse de preferencia en serie. Se recomiendan:

Dilución	Volúmenes	FD*
1:2	50 mL de muestra + 50 mL de agua desmineralizada estéril	2
1:5	20 mL de muestra + 80 mL de agua desmineralizada estéril	5
1:10	10 mL de muestra + 90 mL de agua desmineralizada estéril	10
1:100	1 mL de muestra + 99 mL de agua desmineralizada estéril	100
1:1 000	0.1 mL de muestra + 99.9 mL de agua desmineralizada estéril	10 ³
1:10 000	0.01 mL de muestra + 99.99 mL de agua desmineralizada estéril	10 ⁴
1: 100 000	Dilución seriada: 1000 µL de dilución 1:100 + 99.9 mL de agua desmineralizada estéril.	10 ⁵
1: 1 000 000	Dilución seriada: 100 µL de dilución 1:1000 + 99.9 mL de agua desmineralizada estéril.	10 ⁶

Estas diluciones son recomendadas de acuerdo con el material volumétrico existente en el laboratorio.

FD = factor de dilución


Se recomiendan las siguientes diluciones en los casos de:

- Muestras provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales: aplicar diluciones iguales o mayores a 1:10 000.
- Muestras provenientes de ríos: dependerá de la cercanía del punto de muestreo a desfuegos de aguas residuales, el resultado de la calidad del hábitat, entre otros. Para ríos que presenten contaminación fecal, se recomiendan diluciones de 1:100 o 1:1 000.

Los resultados obtenidos se multiplicarán por el factor de dilución (FD), según la dilución seleccionada. Se reportarán los resultados como NMP/100 mL.

12. Control de calidad

El control de calidad respalda los resultados obtenidos y permite identificar los puntos críticos de control en los procedimientos realizados con el fin de reducir las fuentes de error, así como aplicar acciones correctivas puntuales cuando son necesarias.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 16 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 9 de 9
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: FERMETACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

- Realizar controles de cada lote de medios de cultivo y agua estéril preparados.
- Realizar la limpieza adecuada de autoclave, incubadoras, refrigeradora y equipo de filtración.
- Controlar la temperatura de las refrigeradoras en donde se almacenan los medios de cultivo.
- Llevar registro de las acciones anteriores.

13. Reporte de datos


13.1 *Presentación de datos*

- Los resultados del recuento de coliformes, se expresan cuantitativamente como NMP/100 mL de muestra.
- Los resultados de las muestras que se hayan diluido como se indica en la sección 12.1, deben de multiplicarse por el factor de dilución para reportar el resultado final.

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

13.2 *Control de calidad*

- Registrar los resultados del control de calidad de los medios de cultivo y agua estéril en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril. Indicar las acciones correctivas realizadas, de ser necesario.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 1 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Determinación de la calidad microbiológica de muestras de agua e identificación de bacterias coliformes totales y *Escherichia coli* por medio del método de filtración por membrana.

2. Aplicación

El método es aplicable a muestras de agua clorada o aguas naturales de baja contaminación. El rango de detección se encuentra en el intervalo de 1-150 UFC (bacterias viables por 100 ml de muestra). El análisis microbiológico es prioritario y debe realizarse en las primeras seis horas luego de haber sido recolectada la muestra.

3. Principio

Muchas enfermedades son transmitidas por la contaminación fecal-oral a través de alimentos y agua contaminados. Debido a que la identificación de cada uno de los patógenos que podrían estar presentes es difícil, se hace uso de índices e indicadores, cuya presencia es sugestiva de contaminación fecal, por ejemplo, el grupo de las coliformes y *Escherichia coli* (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014).

El grupo de las bacterias coliformes contiene un amplio rango de bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gramnegativos, no esporulados que desarrollan una colonia roja con brillo metálico dentro de 24 horas a 35-37°C, en un medio tipo Endo que contenga lactosa (WHO, 2011). Las coliformes producen aldehídos por la fermentación de la lactosa y presentan actividad β -galactosidasa (Gleeson y Gray, 1997).

E. coli y las coliformes termotolerantes, son bacterias pertenecientes al grupo de las coliformes que pueden fermentar lactosa a mayores temperaturas ($44,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$), produciendo ácido y gas. Adicionalmente, *E. coli* presenta actividad β -D-glucoronidasa (aprox. 97% de las cepas) y actividad triptofanasa (producción de indol a partir de triptófano) (Gleeson y Gray, 1997).

Tradicionalmente, las bacterias coliformes se consideraban pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, pero el grupo es más heterogéneo e incluye un rango más amplio, entre las que destacan *Serratia* y *Hafnia*. El grupo incluye especies fecales (comensales intestinales del ser humano y animales de sangre caliente), así como especies de vida libre (WHO, 2011). Lo anterior, hace a este grupo de bacterias poco específico, sin embargo, son utilizadas como índice de contaminación fecal debido a su frecuencia en heces, su fácil detección y similitudes a ciertos patógenos de la familia Enterobacteriaceae (Tortora, Funke y Case, 2007).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 2 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Por lo anterior, *E. coli* es mejor utilizada como indicador de contaminación fecal, debido a que es exclusiva del intestino, lo cual la hace más específica y posee una supervivencia limitada en agua (von Sperling, 2007).

Existen métodos diversos para la detección de estos microorganismos y el método de filtración por membrana es preferible para muestras en las cuales se espera contaminación microbiológica baja. La muestra de agua se hace pasar mediante vacío por un filtro estéril de celulosa, con poro de 0.45 μm , para que queden retenidas en él, las bacterias coliformes. Posteriormente, el filtro es colocado en un medio de cultivo selectivo (Petrifilm™) para el crecimiento de bacterias coliformes, e incubado a 35°C \pm 1°C durante 24 horas (3M, s.f.).

Las placas Petrifilm™ para el recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* contienen bilis rojo violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la enzima glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La actividad β -D-glucuronidasa de *E. coli* produce una precipitación azul asociada a la colonia. La película superior atrapa el gas producido por las coliformes fermentadoras de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la placa (3M, s.f.).

4. Referencias

3M (s.f.). *Guía de interpretación de placas Petrifilm™ para el recuento de E. coli/coliformes*. Recuperado de <https://multimedia.3m.com/mws/media/4449500/3m-petrifilm-e-coli-coliform-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf>

Norma Técnica Guatemalteca COGUANOR, NTG 29 001. (2013). Agua para consumo humano (agua potable). Especificaciones.

OMS, Organización Mundial de la Salud (2011). *Guidelines for drinking water quality*. Ginebra: WHO.

Gleeson, C. y Gray, N. (1997). *The coliform index and waterborne disease: Problems of microbial drinking water assessment*. Londres: E & FN Spon.

Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. (9na Ed). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Universidad Nacional Autónoma de México. (2014). *Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y Escherichia coli por la técnica de diluciones en tubo múltiple (número más probable o NMP)*. México. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Análisis_Agua_NMP_22309.pdf


Von Sperling, M. (2007). *Wastewater characteristics, treatment and disposal*. Londres: IWA Publishing.

5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras para microbiología POE - 18

Análisis microbiológico de aguas: tubos múltiples POE - 16

Lavado de cristalería POE - 5

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 3 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Procedimiento de limpieza de autoclave POE - 20

Procedimiento de limpieza de equipo metálico de filtración para microbiología POE - 21

6. Terminología y abreviaciones

Litros (L)

Mililitros (mL)

Microlitros (μL)

Micrometros (μm)

Muy numeroso para contar (colonias muy numerosas para realizar un recuento) (MNPC)

Unidad formadora de colonia (UFC)

7. Materiales y Equipo

7.1 *Reactivos, medios de cultivo e insumos*

Agua desmineralizada estéril

Alcohol etílico al 70%

Placas Petrifilm™, para recuento de *E. coli* y coliformes, dentro del período de vigencia.

Filtros de membrana estériles, con poro de 0.45 μm , superficie cuadrículada y paquete individual, libres de químicos que puedan inhibir o estimular el desarrollo microbiano y resistentes a la filtración (5 minutos). (Millipore HAWG 047 S1).

7.2 *Cristalería*

Vasos de filtración (kitasatos), varios volúmenes

7.3 *Equipo*

Bomba de vacío 15 cm Hg y < 25 Bar de presión

Manifol de filtración

Mechero

Pinzas metálicas


Pipetas 10-2 mL, 100-1000 μL , 20-200 μL

Puntas para pipetas, varios volúmenes

Aplicador Petrifilm

Incubadora eléctrica de convección, 35-37°C

Autoclave eléctrica

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 4 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

8. Recomendaciones de seguridad especiales

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, se deben considerar las siguientes normas como importantes y obligatorias:

- Manipular apropiadamente las muestras, principalmente aquellas con altas cargas bacterianas, así como las placas con presencia de colonias bacterianas luego de 24 horas de incubación, debido al riesgo bioinfeccioso que representan.
- Las placas usadas deben almacenarse en un contenedor hermético, a temperatura ambiente, y ser descartadas a la brevedad posible para evitar la propagación de las bacterias cultivadas. Estos desechos deben de tratarse como especiales, dándoles el destino final adecuado.

9. Preparación de materiales y equipos previo al análisis

Previo a analizar las muestras microbiológicas, se deben de preparar los materiales y equipos necesarios para el análisis.

9.1 Esterilización de equipo, materiales y agua para dilución

- Las puntas para pipetas deben ser esterilizadas en paquetes de papel, antes de su uso. Los paquetes serán debidamente identificados con el número de puntas que contiene y el tipo de muestra que será trabajada con los mismos (agua de río, lago, plantas de tratamiento, etc.).
- El agua para dilución de las muestras debe ser esterilizada en recipientes de vidrio borosilicato, de preferencia, o de plástico autoclaveables.
- Es obligatorio el uso de cinta testigo para el material ingresado a la autoclave, así como el registro del mismo en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril.
- El equipo metálico de filtración será esterilizado según lo indica el procedimiento POE - 21.


9.2 Temperatura de los insumos

Los paquetes Petrifilm contienen 25 medios de cultivo deshidratados que deben ser almacenados a una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de abrirlos. Posteriormente, no deben volver a refrigerar y su vida útil luego de abierto el paquete es menor a cuatro semanas. Luego de abiertos, los paquetes deben guardarse sellados con cinta adhesiva en una gaveta limpia y seca. Para más información, revisar el documento 3M Placas Petrifilm™ para el recuento de *E. coli* y coliformes totales, recomendaciones de uso. Este está disponible en el laboratorio.

Las placas Petrifilm deben atemperarse antes de ser usadas. Así mismo, se debe esperar a que las muestras alcancen temperatura ambiente antes de ser procesadas.

9.3 Limpieza de superficies de trabajo

- La mesa de trabajo debe ser desinfectada con alcohol al 70% previo al inicio del procedimiento analítico. Se recomienda utilizar esta solución para la limpieza continua de las manos (guantes) durante el procesamiento de las muestras.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 5 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

- El procedimiento debe hacerse en presencia de al menos un mechero (de preferencia de gas). Este permite crear una zona aséptica de trabajo y esterilizar los instrumentos metálicos utilizados en el procedimiento analítico.

9.4 Hidratación de los medios de cultivo

Se deben de hidratar las placas necesarias, según la cantidad de muestras a analizar, tomando en cuenta duplicados, más dos placas para los controles. La hidratación se realiza en una superficie plana y en presencia de un mechero, con 1 mL de agua desmineralizada estéril por placa. Las placas no deben levantarse ni agitarse, y deben dejarse en reposo por 1 hora.

9.5 Sistema de filtración

El sistema de filtración debe instalarse según se indica en la Figura 1. El portafiltro (la base del embudo) debe acoplarse directamente al matraz kitasato, el cual a su vez va conectado a la bomba de vacío mediante una manguera. Existen portafiltros con uno o más embudos, que no se acoplan directamente al kitasato (Fig. 2). Estos deben ser armados teniendo al kitasato como intermediario entre la bomba y el portafiltros.

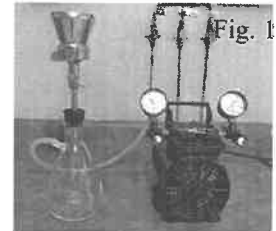
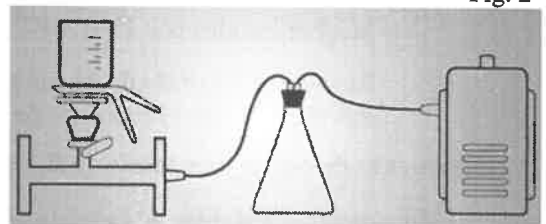


Fig. 2

Importante: la bomba nunca debe de entrar en contacto con el agua, para evitar el desgaste de sus piezas internas o un posible cortocircuito. Para ello, vaciar el kitasato antes que el agua llegue al nivel de la entrada de vacío.



9.6 Controles

Incluir al menos un medio de cultivo hidratado y sin inocular para controlar la esterilidad de los medios de cultivo en el momento de uso. Se hará la lectura de los controles al igual que la de las muestras.

10. Procedimiento de análisis


10.1 Limpieza del equipo:

Adaptar el portafiltros metálico sobre el matraz kitasato.

Colocar el embudo metálico del sistema sobre el portafiltros y fijarlo con la pinza que incluye el equipo de filtración.

Llenar el embudo con 80 a 100 mL de agua desmineralizada estéril y dejar filtrar aplicando vacío.

Cerrar la llave de paso del portafiltros y adicionar 20-30 ml de alcohol al 70% (o un volumen menor con un spray).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 6 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

Flamear el filtro para encender el alcohol; dejarlo encendido durante un máximo de 3 minutos, o hasta que se consuma el alcohol si se utiliza un spray.

Adicionar nuevamente 80 a 100 mL de agua desmineralizada estéril y dejar filtrar.

Cerrar la llave del portafiltros.

10.2 Filtración de la muestra:

Con pinzas estériles, colocar un filtro de membrana estéril en el portafiltros metálico, con la cuadrícula hacia arriba sobre la parte porosa del receptáculo.

Agitar la muestra por inversión, no menos de 6 veces, para alcanzar la dispersión homogénea de las bacterias. Si el frasco está completamente lleno, descartar de 5 a 10 mL, volver a cerrar y mezclar (esto permitirá la agitación completa).

Colocar el embudo y adicionar 100 ml de la muestra a analizar (previamente agitada). (Ver inciso 11.1: Dilución de las muestras).

Cuando finalice el filtrado de la muestra, cerrar la llave del portafiltro y retirar el embudo.

Tomar el filtro con pinzas estériles y colocarlo sobre la superficie de la placa de cultivo, levantando la lámina plástica que la cubre. Volver a cubrir la placa, cuidando que no queden burbujas de aire atrapadas entre el medio y la lámina.


Incubar las placas a 35°C ±1°C durante 24 horas.

Realizar el recuento de las colonias características y reportar en UFC/100 mL. (Ver: 3M Placas Petrifilm™ para el recuento de *E. coli* y coliformes totales. Guía de interpretación)

11. Recuento de coliformes totales y *E. coli*

El documento “3M Placas Petrifilm™ para el recuento de *E. coli* y coliformes totales, guía de interpretación” establece los lineamientos para la cuantificación de las colonias bacterianas pertenecientes al grupo coliformes. En el mismo, se esquematizan distintos casos y se establecen los resultados correctos del conteo.

- Coliformes totales: todas las colonias azules y rojas asociadas a una hasta cinco burbujas de gas en la periferia de la colonia (hasta una distancia aproximada al diámetro de la colonia).
- *E. coli*: todas las colonias azules asociadas a una hasta cinco burbujas de gas (al igual que las coliformes). Debe observarse que muchas colonias que dan positivo al cambio de coloración no tienen burbuja asociadas, por lo que no deben incluirse en el conteo.
- El rango recomendado de conteo en las placas para recuento de *E. coli* y coliformes totales es de 15 a 150 colonias. No deben contarse las colonias que hayan crecido en la zona de hule espuma.
- El área circular de crecimiento es de 20 cm² aproximadamente. Conteos estimados pueden hacerse en placas que contengan más de 150 colonias, a través del conteo de cuadros representativos y determinando el promedio por cuadrado. Multiplique el promedio por 20 y determine el valor estimado por placa.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 7 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

- Las placas con crecimiento excesivo se reportan como MNPC (muy numeroso para contar) y tienen una de las siguientes características:
 - o Muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y/u oscurecimiento del color del gel de color rojo a rojo púrpura.
 - o El exceso de colonias puede ocasionar que el área de crecimiento cambie a color rojo púrpura, con o sin presencia de burbujas localizadas, dependiendo de la carga bacteriana de la muestra.
- La Fig. 3 muestra los diferentes patrones de burbujas de gas asociadas a colonias que deben ser tomadas en cuenta, tanto para *E. coli* como coliformes:

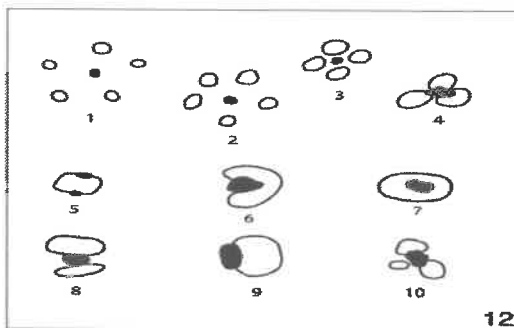


Fig. 3. Patrones de burbujas asociados con colonias que producen gas. Fuente: 3M. (s.f.).

12. Cálculos

12.1 Dilución de las muestras

Las muestras muy turbias, o aquellas que se sospeche tengan cargas bacterianas mayores a 150 UFC (límite de detección superior del método), deben ser diluidas apropiadamente. Se recomienda realizar más de una dilución en muestras de las que se desconozca la calidad de la fuente. Las diluciones deben hacerse de preferencia en serie. Se recomiendan:

Dilución	Volúmenes	FD*
1:2	Filtrar 50 mL de la muestra	2
1:5	20 mL de muestra + 80 mL de agua desmineralizada estéril	5
1:10	10 mL de muestra + 90 mL de ADE	10
1:20	5 mL de muestra + 95 mL de ADE	20
1:50	2 mL de muestra + 98 mL de ADE	50

FD = factor de dilución

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 17 Versión: 2 Fecha: 31/10/2018 Página: 8 de 8
	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS: MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA	Preparado por: C. Martínez Revisado por: F. Barreno, M. Barrillas Aprobado por: F. Reyes

13. Control de calidad

El control de calidad respalda los resultados obtenidos y permite identificar los puntos críticos de control en los procedimientos realizados con el fin de reducir las fuentes de error, así como aplicar acciones correctivas puntuales cuando son necesarias.

- Realizar controles de medios de cultivo y agua estéril cada vez que son preparados.
- Realizar la limpieza adecuada de autoclave, incubadoras, refrigeradora y equipo de filtración.
- Controlar la temperatura de las refrigeradoras en donde se almacenan los medios de cultivo.
- Llevar registro de las acciones anteriores.

*Actualmente, el Laboratorio de Calidad de Aguas de AMSCLAE no cuenta con cepas bacterianas de referencia (ATCC) para el control de los procedimientos microbiológicos. De llegar a implementarse el control de calidad con las mismas, se recomienda se realice de la siguiente manera:

Incluir como control positivo una cepa de *Escherichia coli* y como control negativo una de cepa de *Staphylococcus aureus* sembrada, utilizados para confirmación de coliformes. El control positivo evalúa la sensibilidad del medio (que este detecte de forma efectiva el microorganismo para el cual fue elaborado); el control negativo, la especificidad (que este no reaccione con microorganismos diferentes al que se busca detectar).


14. Reporte de datos

14.1 *Presentación de datos*

- Los resultados del recuento de coliformes, se expresan cuantitativamente como UFC/ 100 mL de muestra.
- Cuando el número de colonias tanto coliformes como no coliformes es mayor a 200 colonias por membrana, o si las colonias no son distinguibles para realizar un recuento preciso, expresar el resultado como MNPC.
- Los resultados de las muestras que se hayan diluido como se indica en la sección 12.1, deben de multiplicarse por el factor de dilución para reportar el resultado final.
- El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

14.2 *Control de calidad*

- Reportar los valores de cada control de calidad e indicar el resultado según el criterio de aceptación.
- Registrar los resultados del control de calidad de los medios de cultivo y agua estéril en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril. Indicar las acciones correctivas realizadas, de ser necesario.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 18 Versión: 1 Fecha: 11/12/ 2018 Página 1 de 4
	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Propiciar la obtención de muestras representativas para realizar una vigilancia adecuada de la calidad microbiológica del agua de la cuenca del lago de Atitlán.

2. Aplicación

El método de muestreo es aplicable para muestras de agua del lago, playas destinadas al uso recreacional, consumo humano, ríos y plantas de tratamiento de la cuenca del lago de Atitlán. Tomar en cuenta las observaciones específicas para cada tipo de muestra.

3. Principio

La toma de muestra es la primera etapa de cualquier proceso analítico y consiste en pasar de un total a analizar a una porción analizable y representativa en el laboratorio, lo cual se dificulta cuando el universo del que es tomada es muy heterogéneo (Caparrós, s.f.).

A pesar de las mejoras analíticas en cuanto a precisión y exactitud dentro del laboratorio, la toma de muestra es una de las principales fuentes de error en los resultados obtenidos, por lo que es necesario que esta etapa sea tomada en cuenta dentro del control de calidad de los laboratorios. Lo anterior se logra por medio del establecimiento de un plan de toma de muestras, en el cual es necesario tomar en cuenta el uso de muestras simples o compuestas, la selección de los equipos para tomar las muestras y las variables que pueden afectar dicho proceso (Caparrós, s.f.).


En el caso de las muestras para análisis microbiológico, es importante llevar a cabo su transporte de forma rápida y a bajas temperaturas, lo cual reduce la alteración del contenido microbiológico y asegura que la detección y cuantificación de los microorganismos será representativa del momento en que fue tomada la muestra (Pascual y Calderón, 2000).

4. Referencias

- Caparrós, J. (s.f.). *UF0231: toma de muestras y análisis in-situ*. España: IC Editorial.
- Ministerio de Economía, Comisión Guatemalteca de Normas –COGUANOR- (2000). Normativa COGUANOR 29 001: Agua potable, especificaciones. Guatemala, Guatemala.
- Pascual, M. y Calderón, V. (2000). *Microbiología alimentaria*. Madrid, España: Díaz de Santos.

5. Documentos asociados

- Análisis microbiológico de aguas: Fermentación en tubos múltiples, POE - 16
- Análisis microbiológico de aguas: método filtración por membrana, POE - 17
- Registro de muestras ingresadas al laboratorio, POE – 19

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 18 Versión: 1 Fecha: 11/12/ 2018 Página 2 de 4
	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

Militros (mL)

7. Material y equipo

7.1. Insumos

Boleta de campo

Botella de van Dorn

Botellas plásticas estériles con 250 mL de capacidad

Hielera

Hielo

Muestreador de aguas residuales

Pizeta de plástico con agua desmineralizada

Reloj

Rotulador

Recomendaciones especiales

El uso de guantes durante la toma de muestra es obligatorio.

El transporte de las muestras al laboratorio debe ser llevado a cabo a una temperatura menor de 4°C.


El análisis microbiológico es prioritario y debe realizarse en las primeras seis horas luego de haber sido recolectada la muestra.

8. Preparación de material y equipo previo al muestreo

Previo a la recolección de muestras para análisis microbiológico se deben preparar los materiales y equipo necesarios para el muestreo.

8.1. Esterilización de materiales para la recolección de muestras

Los recipientes plásticos deben ser esterilizados previo a su uso para la recolección de muestras. La esterilización se llevará a cabo en autoclave, a 121°C, bajo 1 atmósfera de presión, durante 15 minutos.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 18 Versión: 1 Fecha: 11/12/ 2018 Página 3 de 4
	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Es obligatorio el uso de cinta testigo para el material ingresado a la autoclave, así como el registro del mismo en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril.

El laboratorio posee un protocolo de clasificación de cristalería y material para microbiología, dependiendo del tipo de muestra: los recipientes plásticos para recolección de aguas residuales y ríos poseen una marca de color rojo, los de recolección de agua del lago y salubridad, verde.

El muestreador plástico debe estar limpio al salir del laboratorio. Además, se realizarán lavados con el agua del punto de muestreo, previo a la recolección de la muestra.

9. Procedimiento

9.1. Identificación de la muestra

Antes de la toma de muestra se rotulará el recipiente plástico estéril con los siguientes datos: lugar de muestreo, profundidad, hora y fecha de recolección.

Anotar los mismos datos en la boleta de campo correspondiente al monitoreo. Esta será proveída por el laboratorio.

9.2. Toma de muestra


Identificar un punto adecuado para la toma de muestra, este debe estar alejado de perturbaciones como personas nadando o bañándose, lanchas y pescadores.

La profundidad de la toma de muestra y el tipo de muestra puede variar según el monitoreo realizado:

Monitoreo	Profundidad	Tipo de muestra
Aguas para uso recreacional	0.1 m	Simple (250 mL)
Limnológico mensual	Variable según punto de muestreo*	Simple (250 mL)
Agua para consumo humano	Variable según punto de muestreo*	Simple (250 mL)
Ríos	Superficie	Simple (250 mL)
Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs)	Superficie	Compuesta** (250 mL en total)

* Consultar con encargado de laboratorio o jefe de departamento.

** Se toma cierto volumen de la misma fuente, cada hora, durante 6- 8 horas.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 18 Versión: 1 Fecha: 11/12/ 2018 Página 4 de 4
	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Una vez se identifique el punto y la profundidad, con los guantes puestos, introducir el muestreador plástico en el agua y realizar tres lavados con agua del lago. No descartar el agua de los lavados en el mismo punto de recolección de muestra.

- En el caso de muestras profundas, utilizar la botella de Van Dorn.
- Procure no levantar sedimentos al tomar la muestra.
- Si la muestra es de algún grifo para consumo humano, este debe ser limpiado con algodón y alcohol, permitir que el agua corra por al menos de 2 a 3 minutos y luego tomar la muestra en el recipiente adecuado.

Abrir el recipiente estéril identificado e introducir la muestra de agua en él. No llenar todo el recipiente, es necesario dejar cierto volumen de aire dentro del mismo.


Descartar el agua restante del muestreador. Realizar lavados con agua desmineralizada para su posterior uso.

En el caso que se pueda sumergir el recipiente en el lugar de toma de muestra, sumerja el recipiente, ábralo y llénelo. Cuando esté lleno cierre el recipiente siempre manteniéndolo sumergido.

Colocar la muestra dentro de la hielera para su transporte al laboratorio a una temperatura menor de 4 °C.

10. Control de calidad y recolección de datos

- Registrar el proceso de esterilización de los recipientes para las muestras en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril. Hacer uso de cinta testigo.
- Identificar adecuadamente cada una de las muestras y registrar los datos correspondientes en la boleta de campo y posteriormente en el cuaderno de registro de laboratorio adecuado (POE - 19).
- No debe pasar más de seis horas entre la hora de recolección reportada en la boleta de campo y la hora de análisis de la muestra.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 19 Versión: 1 Fecha: 11/12/2018 Página 1 de 3
	REGISTRO DE MUESTRAS INGRESADAS AL LABORATORIO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Favorecer el control de las muestras que ingresan al laboratorio y facilitar el reporte de los resultados obtenidos de su análisis.

2. Aplicación

El procedimiento es aplicable a todas las muestras ingresadas al laboratorio de calidad de aguas de la Unidad de Analítica Ambiental del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental -DICA- de la Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca del Lago de Atitlán y su Entorno -AMSCLAE-

3. Principio

La recepción y registro de muestras dentro del laboratorio representan la última etapa de la fase preanalítica, la cual es un componente importante en las operaciones del laboratorio. Sin la recepción e identificación adecuadas de las muestras no es posible asegurar la calidad de los resultados obtenidos en el laboratorio, especialmente porque muchos de los análisis dentro del laboratorio poseen consideraciones específicas durante la toma de muestra (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996).

Todas las muestras que ingresen al laboratorio deben ser registradas inmediatamente como parte de los materiales de ensayo del laboratorio, con el fin de identificarlas inequívocamente. Generalmente, se asignan códigos numéricos o alfanuméricos que permitan la fácil identificación de las muestras y los datos de su análisis (Food and Agriculture Organization of The United Nations, 1996).

El laboratorio de calidad de aguas del Departamento de Investigación y Calidad Ambiental de la AMSCLAE utiliza un sistema de codificación numérico, el cual hace referencia al tipo de monitoreo realizado y la cantidad de muestras ingresadas para cada uno de ellos. Dicho sistema de codificación permite el reconocimiento de cada una de las muestras y favorece el análisis de forma ordenada.


4. Referencias

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1996). *Manuales para el control de la calidad de los alimentos*. Roma, Italia: FAO.

5. Documentos asociados

Recolección de muestras para análisis microbiológico, POE - 18

Recolección de muestras, POE - 2

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 19 Versión: 1 Fecha: 11/12/2018 Página 2 de 3
	REGISTRO DE MUESTRAS INGRESADAS AL LABORATORIO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

PTAR = Plantas de tratamiento de aguas residuales

DBO= Demanda biológica de oxígeno

7. Material y equipo

Cuadernos de registro

Lapicero azul o lápiz de grafito

Rotulador

8. Consideraciones especiales

Es obligatorio el ingreso de las muestras en los cuadernos de registro correspondientes, antes de su análisis.

Colocar en los cuadernos de registro toda la información relevante respecto al tratamiento de las muestras, esto facilitará el análisis y validación de los resultados obtenidos.

Cualquier muestra que no pertenezca a ninguno de los monitoreos preestablecidos por el DICA (Cuadro 1), será ingresado en el cuaderno de proyectos de investigación, con la respectiva identificación de la actividad a la cual pertenece la muestra.

9. Procedimiento

9.1. Ingreso de muestra al laboratorio

Una vez en el laboratorio, todas las muestras deben ser ingresadas en el cuaderno correspondiente (Cuadro 1):


El código de la muestra corresponde al número del cuaderno (1-7) seguido de un punto (.) y el correlativo de ingreso en ese cuaderno.

El cuaderno debe contener la información sobre la fecha, hora y lugar de muestreo, así como la fecha y hora de ingreso al laboratorio.

Los cuadernos 1 y 2 están divididos en secciones. En este caso, el ingreso se da en el siguiente orden: 1: Nutrientes, microbiología y DBO. 2: Microbiología, DBO y nutrientes.

Colocar el mismo código del cuaderno al recipiente que contiene la muestra.

Es necesario colocar en el cuaderno de registro la información sobre cualquier tratamiento adicional, como diluciones.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 19 Versión: 1 Fecha: 11/12/2018 Página 3 de 3
	REGISTRO DE MUESTRAS INGRESADAS AL LABORATORIO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Elaborar las tablas correspondientes para ingresar los datos de laboratorio obtenidos para cada una de las muestras, en el orden correspondiente.


Cuadro 1. Codificación de cuadernos de registro, según monitoreo.

Número de cuaderno	Monitoreo
1	Limnológico microbiología/DBO
1	Limnológico nutrientes
2	PTAR
3	Ríos
4	Salubridad
5	Proyectos de investigación
6	Caudales
7	Biológico

Fuente: laboratorio del DICA, AMSCLAE.

10. Control de calidad

- El ingreso de las muestras en los cuadernos de registro debe llevarse a cabo conforme a la hora en que se tomó la muestra. Esto propiciará el tratamiento inmediato de las muestras tomadas más temprano y reducirá posibles errores de medición asociados a un tiempo prolongado entre la toma y análisis de muestra.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 20 Versión: 1 Fecha: 11/Dic/2018 Página 1 de 4
	USO Y LIMPIEZA DE AUTOCLAVE	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Favorecer las condiciones asépticas durante el trabajo analítico para evitar la contaminación cruzada de las muestras.

2. Aplicación

El procedimiento de limpieza aplica para la limpieza de la autoclave de esterilización marca RAYPA, modelo AES-110 del laboratorio de calidad de aguas de la Unidad de Analítica Ambiental del departamento de investigación y calidad ambiental (DICA) de la AMSCLAE.

3. Principio

La esterilización es un proceso por el cual se combate la contaminación por cualquier organismo vivo y puede llevarse a cabo por medio de la exposición a agentes químicos, así como procesos físicos (Stanier, Ingraham, Wheelis y Painter, 1992).

La esterilización por calor húmedo permite la destrucción de los microorganismos por medio de la coagulación de sus proteínas celulares y principalmente, se lleva a cabo bajo presión, por medio de la esterilización en autoclave (Universidad Central de Venezuela, s.f.).


Entre sus ventajas cabe mencionar que no deja residuos, los equipos modernos son sencillos de manejar y es un método rápido de esterilización. Sin embargo, es necesario conocer las características del material que se desea esterilizar, ya que este debe ser termoestable y no sensible a la humedad (Universidad Central de Venezuela, s.f.).

En el laboratorio de calidad de aguas de la AMSCLAE, la autoclave es utilizada para la esterilización de material y medios de cultivo del área de microbiología, así como para procesos de digestión y disgregación, necesarios en algunos análisis fisicoquímicos. El funcionamiento adecuado del equipo, depende de su mantenimiento, por lo que a continuación se describen los procedimientos de uso de la autoclave. A su vez, hace referencia al manual de instrucciones de uso y mantenimiento proveído por el fabricante, el cual contiene especificaciones adicionales.

4. Referencias

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. (1992). *Microbiología*. España: Reverté.

Universidad Central de Venezuela. (s.f.). *Esterilización por calor húmedo*. Recuperado de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Esterilizaci%C3%B3n_por_calor_h%C3%BAmedo.pdf

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 20 Versión: 1 Fecha: 11/Dic/2018 Página 2 de 4
	USO Y LIMPIEZA DE AUTOCLAVE	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

5. Documentos asociados

Manual de instrucciones uso y mantenimiento de autoclaves de esterilización, RAYPA.

POE - 16 Análisis microbiológico de aguas: fermentación en tubos múltiples.

6. Terminología y abreviaciones

Esterilización: proceso por el cual el objeto tratado queda libre de todo organismo vivo (Stanier, Ingraham, Wheelis y Painter, 1992).

7. Material y equipo

Autoclave RAYPA, modelo AES-110.

Cinta testigo

Etanol 95%

Paño limpio

Solución de ácido acético 1%

Solución de Extrán 1%

8. Recomendaciones especiales

No iniciar otro ciclo de esterilización hasta haber transcurrido 15 minutos desde el anterior, dejando la tapa abierta durante ese tiempo.


La autoclave posee un pulsador de desvaporización que permite acelerar dicho proceso. Si se han esterilizado líquidos, no utilizar esta opción rápida, puesto que podría salir el líquido y tapones de los recipientes internos.

Si se forma vacío en el interior del equipo y se dificulta su apertura, abrir el grifo de desagüe para restaurar la presión atmosférica y abrir la puerta.

9. Procedimiento

9.1. Uso de autoclave

Conectar la autoclave a la red eléctrica y accionar el interruptor general ubicado en la parte superior derecha del equipo. La pantalla mostrará el mensaje “RAYPA Sterilclav-Blue” y transcurridos dos segundos aparecerá un número de programa (siempre será el último ejecutado).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 20 Versión: 1 Fecha: 11/Dic/2018 Página 3 de 4
	USO Y LIMPIEZA DE AUTOCLAVE	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Para llenar la autoclave, girar el volante de cierre hasta levantarlo totalmente y girar el brazo hacia afuera. La pantalla mostrará el mensaje “puerta abierta”.

Revisar que el grifo de desagüe esté cerrado (girar a la derecha hasta el tope) y llenar el depósito con agua destilada hasta el nivel de la gradilla inferior perforada.

Introducir el material a esterilizar de forma directa o mediante canastas. La distribución debe permitir que el vapor circule libremente dentro del equipo.

Cerrar la tapa girando el brazo hasta el tope y apretarla girando el volante de cierre hasta que desaparezca el mensaje “puerta abierta”. Se escuchará un sonido característico.

Seleccionar el programa adecuado utilizando las teclas “SUBIR” y “BAJAR” y presionar la tecla “START/STOP” para iniciar el proceso de esterilización. La pantalla mostrará todo el proceso, etapa por etapa. Las condiciones estándar de esterilización son 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos. Estos quince minutos serán representados como una meseta en la gráfica mostrada por el equipo. El tiempo de calentamiento, purga y enfriamiento son adicionales y no forman parte real del proceso de esterilización.

Al finalizar el proceso, se escuchará un sonido característico. Pulsar la tecla “START/STOP” para regresar a la pantalla inicial y abrir la tapa. No extraer inmediatamente el material esterilizado, debido a que el vapor puede generar quemaduras.

No abrir la autoclave hasta que haya finalizado el ciclo de esterilización y el manómetro indique 0.

Si no se llevará a cabo otro ciclo de esterilización, pulsar el interruptor general para apagar el equipo y desconectarlo.


9.2. Limpieza de autoclave

El mantenimiento de la autoclave debe llevarse a cabo periódicamente para su buen funcionamiento. De acuerdo con el manual de instrucciones de uso y mantenimiento, el programa de mantenimiento ordinario es el siguiente:

10. Control de calidad


Registrar en el formulario correspondiente el uso de la autoclave.

Utilizar cinta testigo para evidenciar el proceso de esterilización del material. Todo el material esterilizado en autoclave debe ser registrado en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 20 Versión: 1 Fecha: 11/Dic/2018 Página 4 de 4
	USO Y LIMPIEZA DE AUTOCLAVE	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Cuadro 1. Programa de mantenimiento ordinario

Periodicidad	Actividad	Especificaciones
Diario	Limpieza de interior de la tapa.	Utilizar un paño limpio de algodón humedecido con una solución ácido acético al 1 %. Secar antes de utilizar autoclave.
	Limpieza de superficies externas	Utilizar un paño limpio de algodón humedecido con agua o una solución de detergente neutro. Secar antes de utilizar autoclave.
Semanal	Limpieza de cámara de esterilización y accesorios	Utilizar un paño limpio de algodón humedecido con agua o una solución de detergente neutro. Enjuagar con agua destilada eliminar residuos en la cámara o accesorios.
	Desinfección de superficies externas	Utilizar alcohol al 95%.
Mensual	Limpieza del filtro de descarga	Retirar bandeja perforada al fondo de la autoclave y desenroscar el filtro. Lavar bajo un chorro de agua corriente y eliminar cuerpos extraños o agar, con un objeto puntiagudo. En caso de imposibilidad de recuperación del filtro, sustituirlo por uno nuevo. Reinsertar el filtro.
Semestral o anual	Mantenimiento de la válvula de seguridad	Consultar manual
Anual	Convalidación de la autoclave	Consultar manual

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 21 Versión: 1 Fecha: 11 /12/ 2018 Página 1 de 4
	LIMPIEZA DE EQUIPO DE FILTRACIÓN	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Favorecer las condiciones asépticas durante el trabajo analítico para evitar la contaminación cruzada de las muestras.

2. Aplicación

El procedimiento de limpieza aplica para el equipo de filtración metálico utilizado en el análisis microbiológico por filtración por membrana y el equipo de filtración de vidrio utilizado para muestras de análisis de nutrientes.

3. Principio

La filtración por membrana es un método que permite la separación de sustancias según el tamaño de las partículas, por medio del uso de una membrana con tamaños de poro variables (Minnesota Rural Water Association, s.f.).

En el laboratorio, esta es utilizada para determinar parámetros como coliformes y *E. coli*, así como sólidos totales, por medio de su retención en el filtro o membrana. Por otro lado, es también posible la remoción de materia orgánica de las muestras, para facilitar la determinación de parámetros fisicoquímicos que pueden verse alterados.

Para que la técnica de filtración sea efectiva, es necesario que el sistema de filtración posea las características adecuadas, así como conservar la asepsia en todo momento, para evitar la contaminación cruzada. Es por ello, que la limpieza del equipo de filtración, antes y después del proceso analítico, debe ser llevado a cabo de forma adecuada.

4. Referencias

Minnesota Rural Water Association. (s.f.). *Membrane filtration*. Recuperado de <https://www.mrwa.com/WaterWorksMnl/Chapter%2019%20Membrane%20Filtration.pdf>

Skoog, D., West, D., Holler, F. y Crouch, S. (2005). *Fundamentos de química analítica*. México: Cengage Learning.

5. Documentos asociados

Análisis microbiológico de aguas: filtración por membrana POE-17

Manual de uso de equipo de filtración Millipore: Glass 47 mm filter Holder, Teflon-faced glass 47 mm filter holder, stainless screen glass 47 mm filter holder.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 21 Versión: 1 Fecha: 11 /12/ 2018 Página 2 de 4
	LIMPIEZA DE EQUIPO DE FILTRACIÓN	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

Analito: especie presente en una muestra, de la cual se busca información analítica (Skoog, West, Holler y Crouch, 2005).

7. Material y equipo

Agua desmineralizada

Agua desmineralizada estéril

Autoclave

Bomba de vacío

Equipo de filtración

Etanol 95%

Kitasato

Manguera para vacío

Mechero

Papel Kraft

Solución de EXTRAN 1%

8. Recomendaciones especiales


Es importante tomar en cuenta el volumen del kitasato para evitar sobrepasar su capacidad y dañar la bomba de vacío.

9. Procedimiento

9.1. Limpieza previa a procedimientos analíticos

El equipo de filtración metálico para microbiología debe ser esterilizado en autoclave antes de cada serie de análisis (121°C, 15 libras de presión, 15 minutos). Para ello, ingresar las partes en una bolsa de papel Kraft y hacer uso de cinta testigo para corroborar su ingreso a la autoclave.

El equipo de filtración de vidrio, es utilizado para análisis fisicoquímicos. Para ello, la esterilización en autoclave no es necesaria, sin embargo, es importante la limpieza de todas sus partes con solución ácida antes de su uso. Esto evitará la contaminación de las muestras con componentes de muestras filtradas previamente. Posterior a ello, lavar con agua desmineralizada y dejar secar, sin utilizar papel o toallas que puedan dejar residuos en el filtro.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 21 Versión: 1 Fecha: 11 /12/ 2018 Página 3 de 4
	LIMPIEZA DE EQUIPO DE FILTRACIÓN	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

El sistema de filtración debe ser montado con guantes como se indica en la figura 1. Colocar de último las piezas metálicas autoclaveadas.

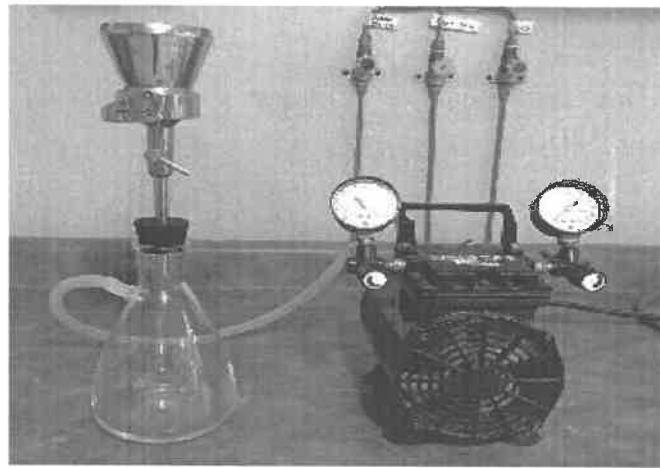


Figura 1. Equipo de filtración

La filtración de las muestras debe ser llevado a cabo como lo especifica el POE - 17, análisis microbiológico de aguas: método filtración por membrana. Es necesario limpiar el equipo de filtración después de cada una de las muestras trabajadas para evitar la contaminación cruzada.

9.2. Limpieza del equipo entre diferentes muestras filtradas

Después de retirar el papel filtro del sistema de filtración, llevar a cabo lavados consecutivos con 10 mL de agua desmineralizada estéril, aplicando vacío. Este paso aplica tanto para muestras de microbiología como muestras para análisis fisicoquímico.


IMPORTANTE: si el analito de interés se encuentra retenido en el papel filtro, el agua desmineralizada puede ser descartada en el mismo kitasato que el filtrado de la muestra. Si el analito de interés se encuentra en el filtrado, utilizar otro kitasato para descartar el agua desmineralizada de los lavados.

En caso contrario, la muestra sería diluida y los parámetros a analizar, alterados.

Para muestras de microbiología, rociar etanol al 95% dentro del equipo de filtración, dejar correr vacío y posteriormente llevar a cabo dos lavados consecutivos con 20 mL de agua desmineralizada estéril.

Colocar el nuevo filtro con pinzas, según el POE referido anteriormente.


Al finalizar, desmontar el equipo de filtración y limpiar con una esponja agua caliente y una solución detergente (EXTRAN al 1%).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 21 Versión: 1 Fecha: 11 /12/ 2018 Página 4 de 4
	LIMPIEZA DE EQUIPO DE FILTRACIÓN	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10 Control de calidad

Reportar en el cuaderno de medios de cultivo y material estéril cada vez que el equipo de filtración es esterilizado en la autoclave.

Recuerde registrar el uso del equipo de filtración y la bomba de vacío en los formularios establecidos.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 22 Versión: 1 Fecha: 11/12/2018 Página 1 de 3
	USO DE BAÑO ULTRASÓNICO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Enumerar las especificaciones para el uso del baño ultrasónico dentro del laboratorio para facilitar su uso.

2. Aplicación

El baño ultrasónico es utilizado siempre en la limpieza de cristalería de plantas de tratamiento y ríos, así como toda la cristalería utilizada en análisis microbiológicos.

El resto de cristalería es lavada de forma periódica, según necesidad, para evitar la contaminación de las muestras y errores en las mediciones.

3. Principio

La limpieza ultrasónica es una técnica de limpieza altamente efectiva que hace uso de ondas de sonido de alta frecuencia e intensidad, en un líquido, para mejorar la remoción de contaminantes presentes en superficies de difícil acceso para otras técnicas de limpieza (Fuchs, 2015).

Las ondas ultrasónicas en un líquido permiten la formación de burbujas que se comprimen y expanden hasta llegar a un tamaño específico, dependiendo de la intensidad de las ondas, y al explotar en una superficie, permiten la remoción de cualquier contaminante (Cleaning Technologies Group, 2017).

La limpieza adecuada de la cristalería utilizada en el laboratorio es esencial para evitar la contaminación cruzada y errores en las mediciones analíticas. El buen uso del equipo de limpieza, es parte de la gestión de la calidad.

4. Referencias

Cleaning Technologies Group. (2017). What is ultrasonic cleaning? Recuperado de <https://www.ctgclean.com/blog/what-is-ultrasonic-cleaning>

Fuchs, F. J. (2015). Ultrasonic cleaning and washing of surfaces. *Power ultrasonics*. Elsevier.


5. Documentos asociados

Manual de operación del baño ultrasónico JAC: Ultrasonic cleaner (Model: UC-02/ 05 (P)/ 10 (P)/ 20(P)

6. Terminología y abreviaciones

mL= mililitros

L = litro

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 22 Versión: 1 Fecha: 11/12/2018 Página 2 de 3
	USO DE BAÑO ULTRASÓNICO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

7. Material y equipo

Extrán

Agua desmineralizada

8. Recomendaciones especiales

No utilizar el baño ultrasónico con las manos húmedas.

La solución de lavado debe ser agregada al baño a un nivel sobre la marca. En caso contrario, el baño se sobrecalentará.

El baño utiliza ondas ultrasónicas para realizar la limpieza. Nunca limpiar las manos dentro del mismo.

No utilizar solventes corrosivos dentro del baño, para evitar dañarlo.

10 Procedimiento

10.1. Preparación de solución de lavado

La solución de lavado consiste en una solución de EXTRÁN MA03 exento de fosfatos de Merck® al 1% (10 mL de EXTRAN/ L de agua). Según la capacidad volumétrica del baño ultrasónico, medir 13.5 L de agua de chorro y 135 mL de EXTRAN, para un ciclo de lavado.

10.2. Uso de baño ultrasónico

Previo al uso del baño ultrasónico, la cristalería utilizada en microbiología, debe ser autoclaveada a 121°C, 1 atm de presión, por 15 minutos y el medio de cultivo en su interior, descartado en los recipientes adecuados. Además, retirar cualquier etiqueta o residuos visibles. El resto de la cristalería se desagua previo a colocarla en el baño ultrasónico.

Colocar los tubos a limpiar dentro de la canasta removible del baño ultrasónico.


Colocar la canasta llena dentro del baño.

Revisar que la llave de desagüe ubicada en la parte posterior del baño, se encuentre cerrada.

Agregar la solución de lavado hasta el nivel de la marca interior del baño. Asegurarse que la cristalería quede sumergida dentro de la solución. Las burbujas de aire podrían reducir la calidad de la limpieza.

Colocar la tapadera del baño.

Encender el baño pulsando el botón "POWER". Se encenderán los lectores de temperatura y tiempo.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 22 Versión: 1 Fecha: 11/12/2018 Página 3 de 3
	USO DE BAÑO ULTRASÓNICO	Preparado por: M. Barillas Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Para seleccionar la intensidad de las ondas ultrasónicas presionar el botón “L. M. H.”, hasta encontrar la intensidad requerida (L=baja, M=media, H=alta). La intensidad ultrasónica depende del grado de contaminación de la cristalería. La cristalería utilizada para plantas de tratamiento será siempre lavada con intensidad alta.

Para configurar el sistema de calentamiento presionar el botón HEATER ON/OFF. Verificar que la luz esté encendida (rojo intenso), para configurar las condiciones de lavado.

Para configurar la temperatura presionar el botón MODE. Una vez activada esta función, usted observará que la pantalla se alumbrará de forma intermitente en color rojo, en este momento graduar la temperatura requerida con los botones \wedge \vee .

Para configurar el tiempo, presionar el botón MODE, una vez activada esta función, usted observará que la pantalla se alumbrará de forma intermitente en color verde, en este momento puede graduar el tiempo requerido con los botones \wedge \vee . Para el lavado de cristalería de plantas de tratamiento, el tiempo establecido es 10 minutos. Para cristalería poco contaminada, 5 minutos.

Iniciar ciclo de limpieza presionando el botón “SONIC ON/OFF”. No abrir el equipo mientras esté en funcionamiento.

Cuando el ciclo finaliza, el baño ultrasónico emitirá sonido. Apagar el baño presionando “POWER”.


Abrir la llave de la parte posterior del baño para drenar el agua utilizada en el ciclo de lavado y retirar la canasta con la cristalería limpia.

10.10. Limpiar el baño ultrasónico con agua desmineralizada.

11. Control de calidad

El agua del baño ultrasónico debe ser cambiada con cada lavado y este debe ser limpiado con agua desmineralizada cuando termine el ciclo de lavado.

Registrar en el formulario correspondiente, el uso del baño ultrasónico.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 1 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Propiciar la obtención de muestras representativas de agua en tanques de cloración o abastecimiento, potabilizadoras, filtros o cualquier otro sistema que suministre agua para el consumo humano, destinadas para análisis microbiológico y la correcta medición de parámetros *in situ*, POE -3- Medición de Parámetros *in situ*.

2. Aplicación

El procedimiento descrito es aplicable para cualquier tipo de muestreo de agua para consumo humano. Tomando en cuenta las observaciones específicas para los diferentes lugares de muestreo y los diferentes análisis y microbiológico.

3. Principio

Los microorganismos al estar presentes en una suspensión, muestran una variabilidad que le es inherente. Por ello, realizar un adecuado muestreo proporcionará muestras representativas para realizar el análisis microbiológico dando a conocer la calidad microbiológica del agua, como fluye del grifo para consumo humano (COGUANOR, 2006)

En el caso de las muestras para análisis microbiológico, es importante llevar a cabo su transporte de forma rápida y a bajas temperaturas, lo cual reduce la alteración del contenido microbiológico y asegura que la detección y cuantificación de los microorganismos se realice lo más exacta posible (Pascual y Calderón, 2000).

El transporte debe realizarse a una temperatura de 5°C +/- 3 y el análisis se realizará el mismo día del muestreo, esto se debe a que cuanto mayor sea la temperatura, más rápida será la multiplicación o mortalidad de los microorganismos, dependiendo de la fase en la que se encuentren, fase de multiplicación o fase de mortalidad. Al congelarse se ocasiona la muerte del 99% de los microorganismos (COGUANOR, 2006).

4. Referencias


COGUANOR. (2006). NTG/ISO 19458 Calidad del agua – Muestreo para el análisis microbiológico.
Pascual, M. y Calderón, V. (2000). *Microbiología alimentaria*. Madrid, España: Díaz de Santos.

5. Documentos asociados

Medición *In Situ*, POE - 3

Análisis microbiológico de aguas: método filtración por membrana, POE - 17

Recolección de Muestras para Análisis Microbiológico, POE - 18

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 2 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Registro de muestras ingresadas al laboratorio, POE – 19

Uso y Limpieza de Autoclave, POE - 20

Limpieza de Equipo de Filtración, POE – 21

Lista de chequeo de material y equipo para monitoreo de agua para consumo humano (Anexo 13.1).

6. Terminología y abreviaciones

Esterilización: Proceso que consiste en la destrucción completa de todos los microorganismos, incluidas las formas resistentes como esporas, virus sin envoltura y hongos.

Tiosulfato de sodio: compuesto inorgánico cristalino, usado para inactivar el cloro.

Mililitros (mL)

Miligramos por litro (mg/L)

Conductividad en micro siemens por centímetro (Cond. $\mu\text{S}/\text{cm}$) a 25 °C

Potencial de Hidrógeno (pH)

7. Material y equipo

7.1 Material

Boleta de monitoreo de agua para consumo humano

Recipientes plásticos estériles de 250 mL, con y sin tiosulfato de sodio

Hielera

Hielo

Muestreador plástico con mango metálico

Pizeta de plástico con agua desmineralizada

Reloj


Rotulador

Guantes

Alcohol al 70%

Algodón

Pinzas

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 3 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Fósforos

Lapicero

Tiosulfato de sodio

8. Recomendaciones especiales

El uso de guantes durante la toma de muestra es obligatorio.

El transporte de las muestras al laboratorio debe ser llevado a cabo en un rango de 5°C +/-3

El análisis microbiológico es prioritario y debe realizarse en las primeras seis horas luego de haber sido recolectada la muestra, si es posible, no puede realizarse después de 24 horas.

9. Preparación de material y equipo previo al muestreo

Previo a la recolección de muestras de agua para consumo humano se deben preparar los materiales y equipo necesarios para el muestreo, ver lista de chequeo de materiales y equipo necesario para monitoreo de agua para consumo humano (Anexo 13.1).

9.1 Esterilización de materiales para la recolección de muestras para análisis microbiológico


Los recipientes plásticos de 250 mL, deben ser esterilizados previo a su uso, para la recolección de muestras.

La esterilización se llevará a cabo en autoclave, a 121°C, bajo 1 atmósfera de presión, durante 15 minutos, ver POE – 20, Uso y Limpieza de Autoclave.

Es obligatorio el uso de cinta testigo para el material ingresado a la autoclave, así como el registro del mismo en el formato de registro de esterilización en autoclave.

Se puede utilizar bolsas de plástico pre- esterilizadas.

Nota: En el caso de recipientes el laboratorio posee un protocolo de clasificación por color de cristalería y material para microbiología, dependiendo del tipo de muestra: marca color rojo para muestras de aguas residuales y ríos, color verde muestras de lago y salubridad.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 4 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9.2 Adición de Tiosulfato de sodio a los recipientes para análisis microbiológico

Para realizar análisis microbiológico a aguas tratadas con algún oxidante como el cloro, cloramina, bromo u ozono, se debe de bloquear la acción del mismo. Se añade un agente reductor como el tiosulfato de sodio a los recipientes del muestreo. Lo cual impide la acción bactericida del oxidante, durante el transporte de la muestra, demostrando el verdadero contenido microbiano del agua en la muestra.

Se debe agregar 300 mg para una muestra de 120 mL, lo que equivale a 0.1 mL de solución de tiosulfato de sodio al 3% en una muestra de 120 mL.

9.3 Equipo de campo para parámetros in situ

Calibrar los equipos y verificar que estén en buen estado y limpios. Guiarse con la lista de chequeo para monitoreo de agua para consumo humano (Anexo 13.1)

9.4 Elección del o los puntos apropiados a muestrearse en la red de distribución

Para las redes de distribución, los puntos de muestreo deberán ser los siguientes:

Al menos un punto en cada tanque de distribución, establecido a una profundidad entre 30 y 60 centímetros medidos desde la superficie del agua del tanque


Al menos tres puntos en la red de distribución, seleccionados aleatoriamente, de forma que dos de los puntos se encuentren en los extremos de la red, lo más distantes posible.

10. Procedimiento

10.1 Identificación de la muestra

Antes de la toma de muestra se rotulará el recipiente plástico estéril con los siguientes datos: lugar de muestreo, hora y fecha de recolección.

Anotar los mismos datos en la boleta para monitoreo de agua para consumo humano (Anexo 13.2).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 5 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10.2 Toma de muestra provenientes de grifos

Limpiar el grifo con un paño o algodón, seguidamente flamear con la ayuda de un algodón humedecido con alcohol y pinzas.

Abrir el grifo obteniendo una presión media y dejar correr el agua tiempo suficiente para asegurar que la muestra no presenta ningún efecto térmico o desinfectante, aproximadamente por 1 minuto (para evitar el desperdicio de agua recolectarla en un balde o recipiente adecuado)

Sostener el recipiente con una mano y con la otra abrirlo, manteniendo la tapadera boca abajo, recolectar la muestra en el recipiente obteniendo el volumen deseado (dejando volumen de aire), tapar el recipiente.

Homogenizar la muestra con el tiosulfato de sodio.

Colocar la muestra dentro de la hielera para su transporte al laboratorio a una temperatura de 5 ± 3 °C.

10.3 Toma de muestra provenientes de tanques de abastecimiento

Abrir las compuertas o retirar tapaderas de los tanques, previo a asegurarse que los alrededores de las mismas estén libres de basura y hojarasca que puedan entrar al tanque.

Verificar si el caudal de entrada o salida del tanque está al alcance del personal que realiza el muestreo; si lo está, recolectar la muestra directamente del mismo, realizando el procedimiento de grifo. Si no lo está recolectar la muestra directamente del tanque, a una profundidad no menor de 30 centímetros.

La muestra será recolectada utilizando guantes o con la ayuda de un muestreador.

Abrir el frasco en el momento justo cuando se recolectará la muestra. Se dejará un espacio de aire, de al menos 2cm (para facilitar la mezcla por agitación).


Homogenizar la muestra con el tiosulfato de sodio. (Nota: Verificar si se aplica cloro).

Cerrar el frasco e introducirlo a la hielera.

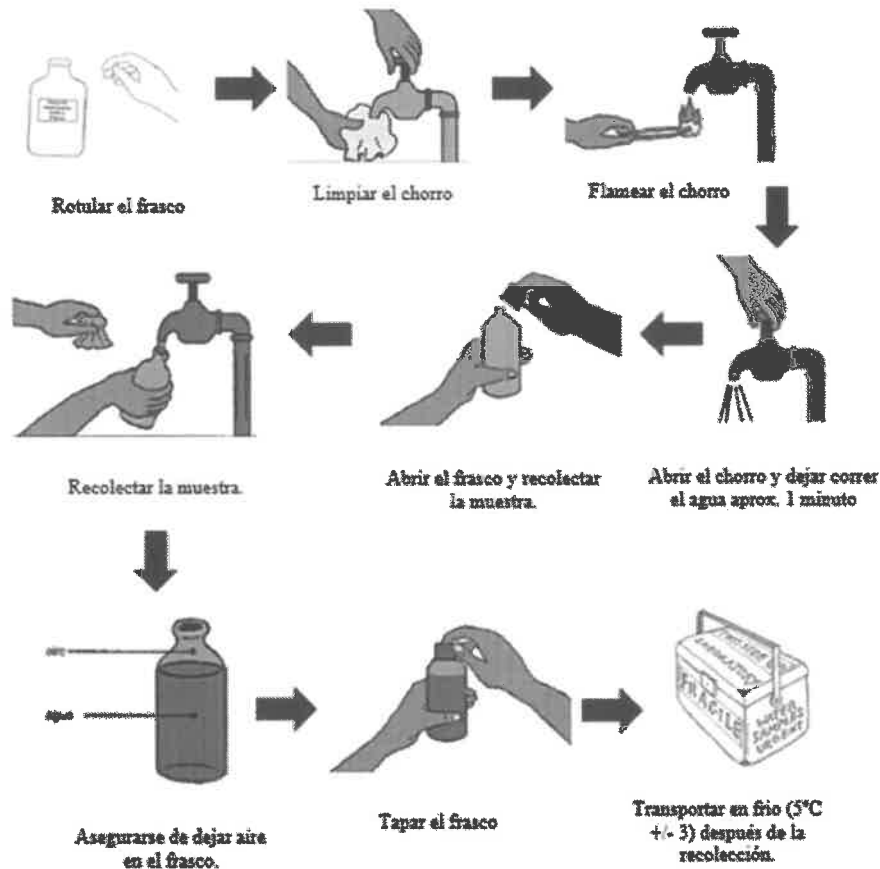
10.4 Transporte de las muestras

Transportar las muestras en hieleras con hielo, logrando una temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3$.

Transportar las muestras al laboratorio inmediatamente; si el transporte no puede ser inmediato, hacerlo en un tiempo menor de 6 horas luego de la recolección.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 6 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

11. Diagrama de Flujo



12. Control de calidad y recolección de datos

Registrar el proceso de esterilización de los recipientes en el formato de registro de esterilización en autoclave. Hacer uso de cinta testigo.

Registrar el uso de autoclave y esterilización de equipo en autoclave en cuaderno.


Identificar adecuadamente cada una de las muestras y registrar los datos correspondientes en la boleta de monitoreo de agua para consumo humano (Anexo 13.2) y posteriormente en el cuaderno de registro de laboratorio adecuado (POE - 19).

No debe pasar más de seis horas entre la hora de recolección reportada en la boleta de monitoreo de agua para consumo humano y la hora de análisis de la muestra.


 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 7 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

13. Anexos


13.1 Formato de equipo necesario para monitoreo de agua para consumo humano

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS LISTA DE CHEQUEO	LCP#-01 Fecha: 14/Febrero / 2019 Página 1 de 1
	MATERIALES Y EQUIPO NECESARIO PARA MONITOREO DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparada por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Material o Equipo	Observaciones	Cumple	
		Si	No
Beleta de monitoreo de agua para consumo humano			
Rotulador			
Guantes			
Piseta de plástico con alcohol etílico al 70%	Preparar con 1 día de anticipación.		
Piseta de plástico con agua desmineralizada	Preparar con 1 día de anticipación.		
Reloj			
Algodón			
Pinzas			
Hielera con hielo			
Recipientes plásticos estériles de 250ml, con tiosulfato de sodio	Preparar con 1 día de anticipación.		
Lapicero			
Fósforos			
Muestreador plástico con mango metálico			
Potenciómetro de campo, calibrado	Calibrada		
Conductímetro de campo calibrado	Calibrada		
Recipientes de boca ancha para medición de parámetros in situ			


 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE-23 Versión: 2 Fecha: 2/05/ 2019 Página 8 de 8
	PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

13.2 Boleta de Monitoreo de Agua para Consumo Humano

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS BOLETA DE CAMPO	Boleta-01 Fecha: 18/Febrero / 2019 Página 1 de 1
	MONITOREO DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Parámetro Código de muestra	Sitios de muestreo						Responsable de toma muestra
Hora							
Fecha							
Coordenadas Y							
Coordenadas X							
P. muestreo (m)							
P. punto (m)							
Oxi. Dis. (mg/L)							
Sat. Oxi. %							
T _a (°C)							
Cond (µS/cm)							
TDS (mg/L)							
Salinidad %							
pH							
E. coli (UFC/ 100 ml)							
Col. Tot. (UFC/ 100 ml)							
Turbidez (FAU)							
Turbidez (NTU)							
Cloro residual							
Color (PI-Co)							
Dureza (mg/L)							
Calcio (mg/L)							
Hierro (mg/L)							
Magnesio (mg/L)							
Manganeso (mg/L)							
Otros:							

Participantes:

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 24 Versión: 4 Fecha: 29/08/2024
	SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN, SÓLIDOS FIJOS Y VOLÁTILES INCINERADOS	Página 1 de 7 Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Proporcionar directrices para la determinación de sólidos totales, sólidos totales disueltos, sólidos totales en suspensión secados a 103-105 °C, así como sólidos fijos y volátiles incinerados a 550°C, para propiciar resultados certeros.

2. Aplicación

El método de análisis es el normalizado por APHA – AWWA -WPCF, para sólidos totales en suspensión en aguas naturales y residuales, así como sólidos fijos y volátiles incinerados a 550°C el método es aplicable a cualquier tipo de agua, aunque es realmente útil para los procesos de tratamiento de aguas residuales, ya que ofrece una estimación de la cantidad de materia orgánica presente en la fracción sólida del agua residual y los lodos activados.

3. Principio

Sólidos Totales


Son los residuos de material que queda en un recipiente después de la evaporación de una muestra y su consecutivo secado a temperatura definida. Los sólidos totales incluyen los “sólidos totales suspendidos” o porción de sólidos totales retenida por un filtro, y los “sólidos disueltos totales” o porción que atraviesa el filtro.

Sólidos en Suspensión

Los sólidos en suspensión, son todos los sólidos sedimentables, no disueltos, los cuáles pueden ser retenidos en un filtro (Rigola, 1990). Pueden ser orgánicos y/o inorgánicos, poseen un tamaño superior a 1 micra y son fácilmente sedimentados en un período corto de tiempo (Cabildo, et. Al., 2012).

Sólidos Fijos

El residuo obtenido de sólidos totales, disueltos o en suspensión, después de someterse a incineración durante un tiempo determinado a una temperatura definida (550 +/- 50 °C), a peso constante, representan los sólidos fijos.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 24 Versión: 4 Fecha: 29/08/2024
	SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN, SÓLIDOS FIJOS Y VOLÁTILES INCINERADOS	Página 2 de 7 Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Sólidos Volátiles

La pérdida de peso por incineración de los sólidos fijos representa los sólidos volátiles.

4. Referencias

APHA, AWWA, WPCF, (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales*. España, Madrid: Díaz de Santos.

APHA, AWWA, WEF, (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Estados Unidos: Cenvco Publisher Services.

Cabildo, Del Pilar, et.al. (2012). *Reciclado y tratamiento de residuos*. España, Madrid: UNED

Espejo, J. C. y Tenelanda, P. A. (2018). *Estudio de la calidad del agua: caso de estudio del río Déleg- provincia del Cañar*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Cuenca, Ecuador.

HACH. (2024). *Sólidos totales y disueltos*. Recuperado de: <https://es.hach.com/parameters/solids>

5. Documentos asociados

Lavado de Cristalería, POE – 5

Registro de muestras, POE - 19

Limpieza de Equipo de Filtración, POE – 21

6. Terminología y abreviaciones


Miligramos por litro (mg/L)

Miligramos (mg)

Mililitros (mL)

Minutos (min)

Grados centígrados (°C)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 24 Versión: 4 Fecha: 29/08/2024
	SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN, SÓLIDOS FIJOS Y VOLÁTILES INCINERADOS	Página 3 de 7 Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

7. Materiales y equipos

7.1. Reactivos

Agua desmineralizada

7.2. Cristalería

Probeta

Kitasato

Crisol

7.3. Equipo

Balanza analítica

Bandeja de aluminio o acero inoxidable

Baño de vapor

Bomba de vacío

Conos Imhoff

Crisol de Gooch

Cronómetro

Desecador

Discos de filtrado de fibra de vidrio

Embudo de filtro de membrana

Equipo de filtrado de vidrio

Filtro de fibra de vidrio, 934 AH o AP 40


Guantes de protección contra calor

Horno de secado con operaciones a 180 °C

Horno de secado con operaciones a 103 – 105 °C

Horno Mufla operaciones a 550 °C

Manguera de vacío

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 24 Versión: 4 Fecha: 29/08/2024
	SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN, SÓLIDOS FIJOS Y VOLÁTILES INCINERADOS	Página 4 de 7 Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Matraz de succión

Pinzas para crisol

Pinzas planas sin punta

Piseta

Placas de evaporación (Porcelana, Platino, Vaso alto de sílice)

Plancha de acero inoxidable

8. Recomendaciones de seguridad especiales

Utilizar guantes durante el proceso.

Esperar que el horno de secado se enfríe, después del secado de los filtros.

Esperar a que el horno mufla se enfríe, después de la incineración.

Utilizar guantes de protección contra el calor y pinzas para crisoles, cuando se manipulen los crisoles, después de la incineración.

9. Preparación de material y equipo

Previo a la determinación se debe de preparar el equipo de filtración y precalentar el horno.

9.1 Preparación de equipo de filtración


Colocar la manguera de vacío con la bomba de vacío de un extremo y del otro extremo unir la manguera al kitasato.

Colocar apropiadamente el equipo de filtrado al kitasato.

9.2 Encendido del horno

Conectar y encender el horno.

Colocar la temperatura adecuada, observando el termómetro hasta alcanzar la temperatura necesaria para realizar el secado de los filtros.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 24 Versión: 4 Fecha: 29/08/2024
	SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN, SÓLIDOS FIJOS Y VOLÁTILES INCINERADOS	Página 5 de 7 Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10. Procedimiento

10.1. Preparación de filtros (sólidos totales en suspensión secados a 103 – 105 °C).

Colocar el filtro, con la cara rugosa hacia arriba, en la base del embudo del equipo de filtrado.

Encender la bomba de vacío y lavar el filtro con tres volúmenes sucesivos de 20 ml de agua desmineralizada

Continuar el vacío, hasta haber filtrado toda el agua.

Descartar el agua de lavado.

Quitar el filtro ya lavado y colocarlo en una bandeja de aluminio o acero inoxidable.

Secar el filtro a una temperatura de 103 -105 °C durante una hora.

Enfriar el filtro en un desecador, para equilibrar la temperatura.

Pesar y repetir el proceso de secado, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta obtener un peso final menor del 4% del peso previo o menor a 0.5 mg, del peso previo.

NOTA: Si se utilizan los filtros de fibra de vidrio preparados comercialmente, los pasos de secado, enfriado, desecación y pesado pueden omitirse si el fabricante certifica que los filtros cumplen con los requisitos del método. Verificar si el peso medido difiere del peso del fabricante en menos de $\pm 0,5$ mg.

10.2. Filtración de muestra para sólidos totales en suspensión

Precalear el horno a 103 – 105 °C por 1 hora.


Seleccionar un volumen de muestra, para obtener un peso entre 2.5 y 200 mg de residuo seco.

En los filtros previamente preparados y pesados, filtrar el volumen de muestra seleccionado, mezclando previamente la muestra. Evitar que el filtro se sature.

Al terminar de filtrar el volumen de la muestra, lavar con tres volúmenes sucesivos de 10 mL de agua desmineralizada, permitiendo que se drene completamente el filtro entre lavados y el interior del equipo de filtración.

Continuar succionando al vacío durante tres minutos después de terminar el filtrado de agua.

Separar el filtro, cuidadosamente utilizando pinzas planas sin punta colocándolo en la bandeja de aluminio o acero inoxidable.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 24 Versión: 4 Fecha: 29/08/2024 Página 6 de 7
	SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN, SÓLIDOS FIJOS Y VOLÁTILES INCINERADOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Secar en horno a 103 – 105 °C, durante una hora y enfriar en desecador para equilibrar la temperatura.

Pesar y repetir el proceso de secado, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta obtener un peso final menor del 4% del peso previo o menor a 0.5 mg, del peso previo.

10.3 Determinación de sólidos fijos y volátiles

Precalear el horno mufla a 550 ± 50°C.

Colocar el filtro utilizado en la determinación de los sólidos totales en suspensión en un crisol, pesar en balanza analítica.

Incinerar el filtro utilizado en la determinación de sólidos totales en suspensión, a peso constante, en un horno de mufla a temperatura de 550 +/- 50 °C, por un período de tiempo de 15 a 20 min, esperar a que se enfríe el horno mufla.

Retirar el crisol del horno mufla con pinzas para crisol, utilizar guantes de protección contra calor.

Colocar el crisol en desecador para su enfriamiento.

Pesar y repetir el proceso de secado, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta obtener un peso final menor del 4% del peso previo o menor a 0.5 mg, del peso previo.

Pesar y repetir el proceso de incinerado, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta obtener un peso final menor del 4% del peso previo.


11. Cálculos

11.1. Sólidos totales en suspensión en mg/L

$$TSS \text{ mg/L} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{volumen de muestra filtrado (mL)}}$$

A= Peso de filtro + residuo seco, mg

B= Peso de filtro seco, mg

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 24 Versión: 4 Fecha: 29/08/2024
	SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN, SÓLIDOS FIJOS Y VOLÁTILES INCINERADOS	Página 7 de 7 Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

NOTA: Observar que el peso de los filtros con y sin sólidos debe colocarse en miligramos. Si está en gramos, transfórmelos a miligramos.

Para establecer el peso final de los filtros se debe de obtener un peso estable o que la pérdida de peso sea menor del 4% del peso previo obtenido, o menor de 0.5 mg entre el último peso y el que se realiza.

11.2 Sólidos Fijos y Volátiles

Sólidos volátiles

$$SV \text{ mg/L} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{volumen de muestra filtrado (mL)}}$$


Sólidos fijos

$$SF \text{ mg/L} = \frac{(B - C) \times 1000}{\text{volumen de muestra filtrado (mL)}}$$

A = Peso de residuo + placa antes de incineración, mg

B = Peso de residuo + placa o filtro después de la incineración, mg y

C = Peso de la placa o filtro, mg

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	POE - 25 Versión: 2 Fecha: 14/03/ 2019 Página 1 de 5
	CLOROFILA - a: EXTRACCION CON ETANOL	Preparado por: I. Sánchez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Determinar concentración de clorofila *a* (Chlo *a*) en $\mu\text{g/L}$ o mg/m^3 en muestras de agua por medio de un método con sostenibilidad ambiental que utiliza solventes verdes.

2. Aplicación

Muestras de lagos o embalses. Según la metodología de Nusch y Palme la Chlo *a* y la feofitina (Pheo) son medibles por medio de una filtración de agua de lago a través de un filtro de fibra de vidrio GF/F, seguido del análisis espectrofotométrico del extracto etanólico antes y después de una acidificación que es necesaria para que la Chlo *a* pierda su átomo de magnesio y se complete la transformación a Pheo y de esta forma obtener datos corregidos.

3. Principio

La concentración de Chlo *a*, es el parámetro bioquímico de mayor importancia medido en investigaciones marinas. Esto debido a su carácter indicador de la biomasa algal de los océanos y aguas dulces. Para la determinación de Chlo *a* en sistemas acuáticos se utiliza un protocolo estándar de análisis, el cual comienza con la filtración de grandes volúmenes de la muestra, desde 500 a 1000 mL.

La etapa siguiente, es la extracción de los pigmentos en solventes químicamente compatibles, generalmente 90% acetona acuosa para agua de mar y etanol acuoso al 96% en el análisis de muestras de agua dulce o de reservorios. En muchos casos, la extracción no es completa hasta que se produce una ruptura total de la pared celular de las algas, en consecuencia, es común el uso de procesos mecánicos tales como molienda, maceración, ultrasonido, extracción sólido-líquido, etc., que facilite la ruptura de las células.

El último paso del protocolo de análisis es la cuantificación de la Chlo *a* en el extracto de muestra, mediante técnicas espectroscópicas. La Chlo *a*, tiene un espectro de absorción en el rango visible, con la mayor absorbancia en los intervalos 400-500 nm y 600-700 nm. Para eliminar la interferencia de Pheo, se puede calcular su concentración en conjunto con la de Chlo *a*, resultando en métodos de determinación combinados.


Las clorofilas se degradan muy fácilmente por la luz, por lo que se recomienda trabajar con iluminación baja evitando la luz solar directa.

4. Referencias

Eaton, A. D. et al. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4-114. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Henriques, M., A. Silva & J. Rocha. 2007. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology

Lichtenthaler, H. & A. Wellburn. 1983. Biochemical Society Transactions, London, 11, 591

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	POE - 25 Versión: 2 Fecha: 14/03/ 2019 Página 2 de 5
	CLOROFILA - a: EXTRACCION CON ETANOL	Preparado por: I. Sánchez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Lichtenthaler, H. & C. Buschmann. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS. En: Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Supplement 1.

Nusch, E. y Palme, G. (1975). Biologische methoden fur der praxis der Gewasseruntersuchung, Bestimmung des Chlorophyll-a und phaeopigmentgehaltes in oberflachenwasser. GWF-Wasser/Abwasser 116: 562-565.

Vitta, R. et al. (2009). Determinación Selectiva De Clorofila a Por Fluorescencia Molecular Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, vol. 7, núm. 1, 2009, pp. 1-11.

5. Documentos asociados

Recolección y preservación de muestras POE - 2

Seguridad en el Laboratorio POE - 4

Procedimiento de Lavado de Cristalería POE - 5

Procesamiento de muestras POE – 6

Limpieza de equipo de filtración POE – 21

6. Terminología y abreviaciones

Clorofila *a* (Chlo *a*)

Feofitina (Pheo)

Litro (L)

Mililitros (mL)

Micro litros (μ L)

Normal (N)

Grados centígrados ($^{\circ}$ C)

Ultra violeta (UV)

Concentración (C)

Absorbancias después de acidificar (*A*)


29.6 = constante que depende del solvente y su concentración (etanol 96%)

A^b = absorbancia del extracto original a 665nm menos la absorbancia a 750 nm.

A^a = absorbancia del extracto acidificado a 665nm menos la absorbancia a 750 nm.

v = volumen de etanol utilizado para la extracción (mL)

V = Volumen de agua filtrado (1 L)

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	POE - 25 Versión: 2 Fecha: 14/03/ 2019 Página 3 de 5
	CLOROFILA - a: EXTRACCION CON ETANOL	Preparado por: I. Sánchez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

l = Longitud del paso de luz en la cubeta de espectrofotómetro (1 cm)

7. Materiales y Equipo

7.1 *Reactivos*

Etanol absoluto $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (99.5%)

Ácido clorhídrico HCl al 37%

Agua grado reactivo

7.2 *Cristalería*

20 tubos de ensayo ámbar o forrados con papel aluminio

2 Balones aforados 100 mL

20 beaker de 30 mL

Varillas de vidrio

7.3 *Equipo*

Pipetas 1-10 mL, 100-1000 μL , 20-200 μL

Puntas para pipetas, de volúmenes correspondientes a las mimas

Espectrofotómetro UV-visible

Celda para espectrofotómetro de 1 cm

Centrifuga

8. Seguridad

Seguir las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio.

Cuando realice la solución de ácido clorhídrico 0.4 M utilice la campana de extracción de gases encendida, mascarilla, lentes de seguridad y guantes y recuerde ‘nunca dar a beber a un ácido’.


* Trabajar en un lugar con poca luz ya que la clorofila es fotosensible. *

9. Soluciones necesarias para el análisis (de 10 muestras)

9.1 *Solución ácido clorhídrico 0.4 M (preparación para 100 mL)*

Reactivos: Medir 1.26 mL de ácido clorhídrico 37% y 98.74 mL de agua grado reactivo.

Nota: para 1 litro de solución medir 12.6 mL de ácido clorhídrico concentrado y 987.4 mL de agua grado reactivo.

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	POE - 25 Versión: 2 Fecha: 14/03/ 2019 Página 4 de 5
	CLOROFILA - <i>a</i>: EXTRACCION CON ETANOL	Preparado por: I. Sánchez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Procedimiento: Colocar 80 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL, con una micro pipeta de vidrio agregue lentamente y gota a gota 1.26 mL de ácido clorhídrico y agite suavemente de forma circular. Luego, aforar con agua grado reactivo y agitar nuevamente.

Almacenamiento: Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

9.2 Solución de etanol al 96% (preparación para 100 mL)

Reactivos: Medir 96.5 mL de etanol al 99.5% y 4 mL de agua grado reactivo.

Procedimiento: Colocar 96.5 mL de etanol al 99.5% en un balón aforado de 100 mL y aforar con agua grado reactivo, agitar con cuidado.

Almacenamiento: Almacenar a temperatura ambiente máximo 6 meses.

10. Procedimiento para extracción:

1. Filtrar 1 L de muestra con papel filtro Whatman GF/F de 47 mm de diámetro, previo arme y monte el sistema de filtración, según el procedimiento del POE-21.
2. Con ayuda de un par de pinzas, colocar el papel filtro doblado dentro de un tubo de ensayo con rosca y previamente forrado de papel aluminio.
3. Agregar 10 mL de etanol al 96% en los tubos de ensayo que contenga el filtro.

Nota: el papel filtro contiene los organismos con pigmentos fotosintéticos.

4. Calentar los tubos de ensayo en baño maría a 75°C por 5 minutos, previamente calentado. Enfriar los tubos inmediatamente con un baño de hielo o con agua fría.

Nota: este cambio de temperatura debe ser radical para lograr la lisis de los organismos pigmentosos.


5. Macerar minuciosamente los filtros dentro del tubo de ensayo, utilizando una varilla de vidrio, luego centrifugar a 3000 rpm por 5 a 10 minutos.
6. Con una pipeta de vidrio extraer 5 ml del sobrenadante centrifugado y transferir a una cubeta de 1 cm o 10 mm para espectrofotómetro.
7. Leer la absorbancia en las longitudes de onda 665 nm y 750 nm en un espectrofotómetro.

Nota 1: Utilizar como blanco etanol al 96%.

Nota 2: La medición a 750 nm determina la turbidez de la muestra, para corregir la absorbancia de la Chlo *a* en 665nm de longitud de onda.

8. Añadir 0.01 mL de HCL 0.4 M por cada mL de extracto que se va a medir. Esperar **5-30** minutos para verificar que se ha alcanzado un pH de 2,6-2,8.

Nota: la acidificación es necesaria para medir la feofitina.

 AMSCLAE	LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR	POE - 25 Versión: 2 Fecha: 14/03/ 2019 Página 5 de 5
	CLOROFILA - a: EXTRACCION CON ETANOL	Preparado por: I. Sánchez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9. Leer la absorbancia en las longitudes de onda 665 nm y 750 nm en un espectrofotómetro.
10. Desechar el contenido de la cubeta y enjuagar con etanol luego con agua.
11. **Cálculos**

11.1 *Cálculo para medir la concentración de clorofila a en muestra por medio del método espectrofotométrico*

$$\text{Clorofila } a = \frac{29,6 (A^b - A^a) * v}{V * l} \qquad \text{Feofitina} = \frac{29,6 (1,7 A^b - A^a) * v}{V * l}$$

Nota: los datos de la concentración de Chlo *a* y Pheo se expresan en ug/L o en mg/m³.

12. **Control de calidad**

13.1 *Cálculo de coeficiente de acidificación*

Ecuación


$$\text{Coeficiente de acidificación} = \frac{A^b}{A^a}$$

Coeficiente de acidificación = < 1.4 es necesario agregar ácido

> 1.7 la muestra está muy acidificada

Nota: El coeficiente de acidificación ideal es de 1.5

Si el coeficiente es ≥ 1.7 la muestra se ha perdido en forma de feofitina.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE 26 Versión: 01 Fecha: 23/06/ 2019 Página 1 de 6
	RECuento AERÓBICO TOTAL, HONGOS Y ACTINOMICETOS MEDIANTE EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Describir la metodología llevada a cabo por el laboratorio de Calidad de Aguas, para el procesamiento de suelo o abono orgánico, con el fin de obtener resultados confiables.

2. Aplicación

El procedimiento descrito es aplicable para muestras de suelo o abono orgánico.

3. Principio

El recuento de microorganismos, se basa en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un gramo o mililitro de muestra. Al incubar a la temperatura y tiempo adecuados para los microorganismos de interés, se cuentan las colonias formadas y se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, y que son capaces de formar la colonia (Rosario, 2001). Al considerar que la muestra a analizar posee una carga elevada de microorganismos se le realiza diluciones, esto con el fin de que las colonias puedan contarse de manera confiable, debido a que mediante las diluciones se logra que la densidad de las colonias disminuya. Este método tiene muchas ventajas, una de ellas es que se puede verificar efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección (Rodríguez, 2005). Otra utilidad es la de cuantificar la carga de microorganismos presentes en una muestra de alimentos o de alguna muestra de suelo que se quiera conocer la proporción de cada grupo de microorganismos.

Los medios de cultivo utilizados deben ser específicos para el grupo de microorganismos que se quieren analizar, es por ello que se utilizan tres tipos diferentes de medios de cultivo.

El método de vertido en placa, mide el número de células viables y tiene la característica especial que los microorganismos sensibles al calor no crecen por el agar fundido que se vierte en la muestra. Al realizar una serie de diluciones para disminuir la densidad del crecimiento bacteriano se debe de considerar la dilución para realizar el conteo de microorganismos que crecen (Tortora, 2007).


4. Referencias

Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.

Rosario, M., Calderón, A. (2001). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid: Ediciones Díaz Santos.

Tortora, B., Gerard, J., Case, L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

5. Documentos asociados

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE 26 Versión: 01 Fecha: 23/06/ 2019 Página 2 de 6
	RECuento AERÓBICO TOTAL, HONGOS Y ACTINOMICETOS MEDIANTE EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Registro de muestras ingresadas al laboratorio, POE - 19

Uso y Mantenimiento de autoclave, POE - 20

6. Terminología y abreviaciones

Mililitros (mL)

PCA: plate count agar

PDA: papa dextrosa agar

ATS: agar tripticasa soya

7. Material y equipo

7.1 Material

Rotulador

Guantes

Alcohol al 70%

Fósforos

Lapicero

Tubos con agar PCA

Tubos con agar PDA

Tubos con agar TSA con glicerol

Placas Petri estériles

Agua estéril

Agitador magnético

Balanza

Beaker

Parafilm

8. Preparación de material y equipo previo al procesamiento

Previo al procesamiento de muestras se debe de preparar los medios de cultivo ver cálculos en Anexo 1.


Se debe de preparar el agua estéril, para realizar diluciones.

9. Procedimiento

9.1 Identificación de la muestra

La muestra se debe de ingresar al cuaderno de investigaciones, colocando, el número correlativo que corresponde y el código, ver POE 19

El cual se colocará en la muestra ingresada para todos los análisis a realizarle.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE 26 Versión: 01 Fecha: 23/06/ 2019 Página 3 de 6
	RECuento AERÓBICO TOTAL, HONGOS Y ACTINOMICETOS MEDIANTE EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9.2 Preparación de medios

Realizar los cálculos correspondientes a cada medio de cultivo según el volumen de medio a preparar, ver anexo 1.

Pesar y disolver cada medio de cultivo utilizando el agitador magnético, y calentar hasta que hierva el medio de cultivo.

Agregar 15 ml de medio en tubos y autoclavar.

Nota: el medio tripticasa soya después de hervirlo, se debe agregar glicerol a temperatura de 35 a 37 °C y homogenizar.

9.3 Preparación de muestra

Pesar 10 gramos de muestra y disolver en 90 ml de agua estéril, dilución 1:10, agitar por 30 minutos. Dejar sedimentar por 30 minutos.

9.4 Proceso de vertido en placa

Los medios a utilizar se deben calentar en baño maría.

Etiquetar cada caja con el medio a utilizar y la dilución que se añadirá.

Realizar diluciones hasta 1: 100,000 utilizando agua estéril en tubos o en beaker considerando que se utilizará únicamente 3 ml por dilución.

Al tener listas las diluciones y cajas identificadas, agregar 1ml de muestra en caja Petri estéril, según lo indica el diagrama.


Al tener los medios en estado líquido se sacan del baño maría y se enfrían hasta una temperatura de 35°C, temperatura que sea tolerable al contacto permanente, sin dejar solidificar de nuevo el medio, por lo que se deben de mezclar invirtiendo el tubo con el cuidado de no producir burbujas.

Añadir los 15 ml de medio a temperatura de 35°C en caja Petri con 1ml de muestra evitando la producción de burbujas, al agregar el medio homogenizar con movimiento en forma de ocho.

Dejar solidificar medio en caja e incubar según el medio, ver inciso 10.

A cajas con medio PDA, sellar con Parafilm antes de incubar.

Nota: El medio debe estar a temperatura tolerable con la muñeca del brazo, ya que al agregarse muy caliente ocasiona que los microorganismos se lisen y mueran, lo producirá recuentos no confiables.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE 26 Versión: 01 Fecha: 23/06/ 2019 Página 4 de 6
	RECuento AERÓBICO TOTAL, HONGOS Y ACTINOMICETOS MEDIANTE EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9.4 Recuento de colonias

Existen tres reglas para los cálculos de las colonias según el número de colonias que crecen en los medios.

Menor a 25 colonias: se multiplica el conteo de colonias por la menor dilución contada y se reporta como un número estimado. O recuento estimado UFC/gr o mL.

Entre 25 y 250 colonias: el conteo final se obtiene aplicando la fórmula del anexo 12.2.

Mayor a 250 colonias: cuando existe en todas las diluciones más de 250 colonias: se debe hacer uso de la cámara tipo Quebec, y contar 12 cuadros seleccionando 6 horizontales y 6 verticales, siempre y cuando exista menos de 10 colonias por cuadro. Si existe más de 10 colonias, contar solo 4 cuadros. Al terminar de contar se obtiene el promedio de las colonias por cm^2 , dicho resultado se multiplica por el área total de la caja y por el factor de dilución utilizado colocando a la par del resultado obtenido, "Recuento Estimado".

Si el crecimiento es excesivo, mayor de 100 colonias/ cm^2 , se informa como recuento estimado y se multiplica 100 por el área de la caja, por el factor de dilución.

9.5 Reporte de resultados

Para el caso 1: se reporta el dato obtenido UFC/g Recuento estimado

Para el caso 2: se reporta el dato obtenido UFC/g

Para el caso 3: se reporta el dato obtenido UFC/g Recuento estimado



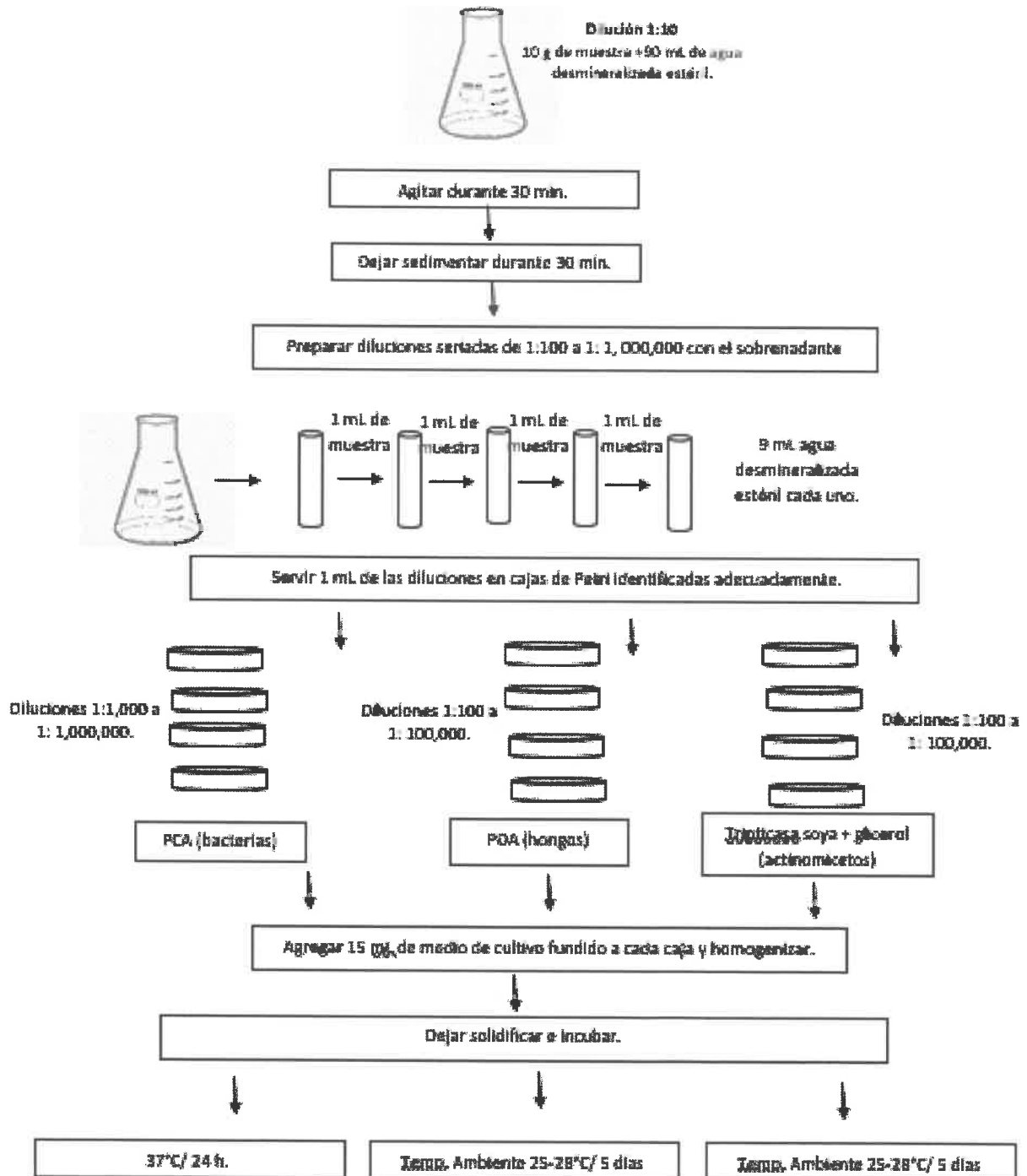
**Procedimiento
Operacional Estándar**

**POE 26
Versión: 01
Fecha: 23/06/ 2019
Página 5 de 6**

**RECuento AERÓBICO TOTAL, HONGOS Y
ACTINOMICETOS MEDIANTE EL MÉTODo DE
VERTIDO EN PLACA**

**Preparado por: K. Mérida
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes**

10. Diagrama de Flujo



 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE 26 Versión: 01 Fecha: 23/06/ 2019 Página 6 de 6
	RECuento AERÓBICO TOTAL, HONGOS Y ACTINOMICETOS MEDIANTE EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

11. Control de calidad y recolección de datos

Registrar el proceso de esterilización de los medios en el formato de registro de esterilización en autoclave. Hacer uso de cinta testigo.

Utilizar un control negativo de cada medio de cultivo e incubarlo junto con las muestras.

Registrar los resultados en el cuaderno de investigaciones.

12. Anexos

12.1 Cálculos para realización de medios de cultivo

$$\text{Medio PCA} \quad \text{volm} * \frac{22.5 \text{ g medio PCA}}{1000 \text{ ml agua}} = \text{g de medio a pesar}$$

$$\text{Medio PDA} \quad \text{volm} * \frac{39 \text{ g medio PDA}}{1000 \text{ ml agua}} = \text{g de medio a pesar}$$

$$\text{Medio ATS} \quad \text{volm} * \frac{40 \text{ g medio ATS}}{1000 \text{ ml agua}} = \text{g de medio a pesar}$$

$$\text{Glicerol para ATS} \quad \text{volm} * \frac{5 \text{ ml de glicerol}}{1000 \text{ ml agua}} = \text{ml de glicerol a agregar}$$

*volm= volumen de medio a preparar, considerando que por cada caja se debe de agregar 15 ml de medio.

12.2 Cálculos de los resultados finales

N= al número de colonias por gramo o ml


Σc= suma de todas las colonias de las cajas contadas

n1= número de cajas contadas en la dilución más baja

n2= número de cajas contadas de la dilución siguiente más alta.

d= dilución menor contada

$$N = \frac{(\Sigma c)}{[(1 * n1) + (0.1 * n2)] * d}$$

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	POE 27 Versión: 01 Fecha: 24/06/2019 Página 1 de 6
	Procedimiento Operativo Estándar CONTROL DE CALIDAD DE EQUIPOS	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Proporcionar directrices para garantizar el control de calidad de equipos en aspectos como limpieza y registro de temperatura, cooperando con el sistema de gestión de la calidad.

2. Aplicación

Se aplicará a todo equipo de laboratorio que pueda recibir una limpieza como: refrigeradoras, incubadoras, hornos, microscopios, estereoscopios, autoclave, campana de extracción de gases.

3. Responsable

Encargado de laboratorio y auxiliar de laboratorio.

4. Principio

El control de calidad consiste en la evaluación continua y sistemática de los procesos con el fin de asegurar que el producto final se encuentra conforme a los límites de precisión y de exactitud previamente establecidos (Koneman, 2006).

Se debe de contar con un programa de mantenimiento de los equipos para asegurar el funcionamiento adecuado de los equipos eléctricos, se deben de monitorear a intervalos preestablecidos (Koneman, 2006), estos registros deben guardarse durante el tiempo que el laboratorio establezca


El control de calidad en equipos también incluye los procedimientos de limpieza y desinfección los cuales deben realizarse de la forma correcta y con periodicidad, quedando evidencia de ello en los registros de control (Caparros, 2013)

5. Referencias

Caparros, F.J. (2013). *Limpieza y desinfección en laboratorios e industrias químicas*. España: IC.

Koneman, E. et. Al. (2006). *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Metrosalud. (2013). *Manual de limpieza y desinfección de equipos y superficies ambientales*. Medellín, Colombia: Alcandía de Medellín.

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	POE 27 Versión: 01 Fecha: 24/06/2019 Página 2 de 6
	Procedimiento Operativo Estándar CONTROL DE CALIDAD DE EQUIPOS	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Documentos asociados

Limpieza de Equipo de Filtración, POE - 21

Uso y mantenimiento de Autoclave POE -20

Formato control de limpieza de equipos

Formato de registro de temperatura de refrigeradora

Formato de registro de temperatura de incubadora

Formato de registro de temperatura de incubadora DBO

7. Terminología y abreviaciones

Desinfección: Proceso químico mediante el cual se elimina los microorganismos patógenos presentes en objetos inanimados y superficies, sin matar esporas (Metroalud, 2013).

Limpieza: Proceso de eliminación de materia orgánica e inorgánica visible que se encuentre presente en las superficies de los instrumentos o equipos para la salud (Metrosalud, 2013).

8. Material y equipo

8.1. Material

Hoja de registro

Lapicero azul


Termómetro

Alcohol al 70%

Algodón

Paño de tela

Medio PCA, PDA

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	POE 27 Versión: 01 Fecha: 24/06/2019 Página 3 de 6
	Procedimiento Operativo Estándar CONTROL DE CALIDAD DE EQUIPOS	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

8.2. Equipo

Incubadora
 Refrigeradoras
 Hornos
 Cámara de extracción de gases
 Autoclave
 Incubadora DBO
 Microscopio
 Estereoscopio

Recomendaciones especiales

- El uso de guantes durante el proceso es obligatorio.

9. Preparación de material y equipo, previo a la limpieza.

Previo a la limpieza de los equipos se debe de preparar el alcohol al 70%

10. Procedimiento

10.1. Limpieza de incubadora y horno

Desconectar antes de iniciar a limpiar.

Con algodón humedecido con alcohol etílico al 70% limpiar las superficies internas, las rejillas y el exterior.


Evitar el contacto con elementos eléctricos, esperar que seque para conectar y encender.

10.2. Limpieza de refrigeradoras

Retirar todo los medios, muestras o reactivos que posea, y mover las rejillas metálicas para proceder en la limpieza.

Aplicar con un paño húmedo de alcohol al 70%, frotarlo suavemente en todas las superficies internas del refrigerador y las rejillas metálicas. Secar y reubicar las rejillas metálicas.

Si dispone de cajones, se deben de desocupar y retirarlos del refrigerador, limpiar paño húmedo de alcohol al 70%, dejar secar e introducir de nuevo.

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	POE 27 Versión: 01 Fecha: 24/06/2019 Página 4 de 6
	Procedimiento Operativo Estándar CONTROL DE CALIDAD DE EQUIPOS	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10.3. Limpieza de microscopio y estereoscopio

Se debe de mantener tapado con funda para evitar suciedad por polvo.

Las partes mecánicas se limpian con un paño humedecido con alcohol, eliminando el exceso que quede. No limpiar las partes ópticas de esta forma.

La parte óptica se debe de limpiar con papel para lentes únicamente frotando de forma circular sobre oculares y los lentes de los objetivos.

Si se usa aceite de inmersión limpiar al terminar de usar.

10.4. Limpieza de campana de extracción de gases

Se deberá retirar el material o equipo que contenga para proceder con la limpieza.

Se limpiará con detergente suave y paño húmedo dejar secar y descontaminar con alcohol etílico al 70%.

Dejar encendida por 15 minutos.

Por último, colocar papel absorbente contra derrames en la superficie de trabajo.

10.5. Limpieza de baño maría

Eliminar el agua periódicamente y limpiar con detergente suave y paño húmedo.


Cambiar de agua semanalmente.

10.6 Control de esterilidad

Al terminar la limpieza de los equipos: incubadora de muestra, incubadora DBO y refrigeradora de medios.

Colocar una caja Petri con medio PCA y PDA, abiertas por 15 minutos; dentro de los equipos ya mencionados. Al haber transcurrido el tiempo cerrar e incubar las cajas, PCA a 37°C/ 24 horas y las cajas PDA a temperatura ambiente, 25-28 °C/ 5 días selladas con Parafilm.

Al cumplirse el tiempo de incubación, contar las colonias que crecieron en los medios, ya que es un control de esterilidad es necesario que no exista crecimiento en ninguna caja, lo cual indica que el procedimiento de limpieza si fue eficaz.

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	POE 27 Versión: 01 Fecha: 24/06/2019 Página 5 de 6
	Procedimiento Operativo Estándar CONTROL DE CALIDAD DE EQUIPOS	Preparado por: K. Mérida Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

11. Control de Calidad


Se debe de registrar las limpiezas mensuales que se le realicen a los equipos y los controles de esterilidad, ver anexo 1. Los cuales se registrarán en el formato de limpieza de equipos.

12. Anexos

12.1. Anexo 1. Cuadro de periodicidad de limpieza de equipos

Equipo	Periodicidad		
	Temperatura	Limpieza	Observaciones
Refrigeradora	Diario	Mensual	
Incubadora	Diario	Mensual	Control de esterilidad
Horno	Diario	Mensual	Control de esterilidad
Autoclave	Cada vez que se use	Mensual	Uso de cinta testigo
Microscopio	N/A	Cada vez que se use	Mantenimiento cada 6 meses
Estereoscopio	N/A	Cada vez que se use	
Campana de extracción de gases	N/A	Diaria	Mantenimiento anual
Baño maría	Diario	Semanal	

N/A: No aplica

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 28 Versión: 1 Fecha: 11/02/2021
	SÓLIDOS SEDIMENTABLES (SS)	Página 1 de 3 Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Proporcionar directrices para la determinación de sólidos sedimentables en aguas superficiales, así como de aguas residuales; los cuales se pueden expresar en función de un volumen (ml/L) o de un peso (mg/L) para propiciar resultados certeros.

2. Aplicación

El método de análisis es el normalizado por APHA - AWWA - WPCF para sólidos sedimentables en aguas naturales y residuales. Este análisis puede realizarse en campo o en el laboratorio recolectando una muestra de 1L.

3. Principio

Los sólidos sedimentables se definen como aquellos que en un tiempo determinado (60 min) se depositan en el fondo de un recipiente de forma cónica (cono de Imhoff) y en condiciones estáticas en el transcurso de un período (Fig. 1) (Metcalf & Eddy, 1995).

4. Referencias

APHA, AWWA, WPCF, (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales*. España, Madrid: Díaz de Santos.

Metcalf & Eddy (1995). *Ingeniería de Aguas Residuales, Volumen I Tratamiento, vertido y reutilización*. 3era Edición. España, Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.

5. Documentos asociados

Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería y materiales, POE 5

6. Terminología y abreviaciones

Mililitros (mL)

Litro (L)


Centímetro (cm)

Minutos (min)

7. Materiales y equipo

7.1. Reactivos

Agua desmineralizada

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 28 Versión: 1 Fecha: 11/02/2021
	SÓLIDOS SEDIMENTABLES (SS)	Página 2 de 3 Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

7.2. Cristalería

Varilla de vidrio

7.3. Equipo

Cono Imhoff

Gradilla para cono Imhoff

Pizeta

Cronometro

Muestreador

Guantes

8. Recomendaciones de seguridad especiales

El uso de guantes durante el proceso es obligatorio.

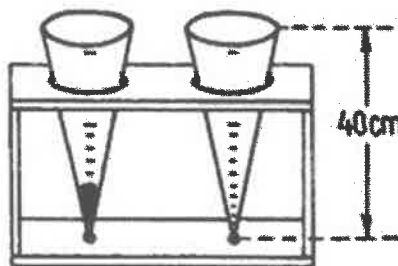
9. Preparación de material y equipo

Previo a la determinación de los sólidos sedimentables, los conos Imhoff deben de estar lavados con agua desmineralizada para evitar un error al momento de realizar la medición.

10. Procedimiento


Recolectar una muestra de agua, de por lo menos 1 L, y homogenizar.

Llenar el cono Imhoff con la muestra homogenizada, hasta la marca de 1 L.



Dejar sedimentar la muestra por 45 min, después de transcurrido este tiempo, con una varilla de vidrio remover suavemente las paredes del cono, de izquierda a derecha. Si no se cuenta con una varilla de vidrio, se puede realizar mediante rotación.

Dejar sedimentar o en reposo 15 minutos más, para completar el tiempo de sedimentación.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 28 Versión: 1 Fecha: 11/02/2021
	SÓLIDOS SEDIMENTABLES (SS)	Página 3 de 3 Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Realizar la lectura del volumen de los sedimentos en el cono Imhoff y registrar el valor volumétrico.

Desechar la muestra y lavar adecuadamente el cono Imhoff.

11. Cálculos para evaluar la eficiencia de un sedimentador

11.1. Eficiencia de sedimentador

Para calcular la eficiencia del sedimentador se necesitan dos conos Imhoff.

Llenar el primer cono Imhoff con la muestra de agua bruta homogenizada del agua que ingresa al sedimentador.

Llenar el segundo cono Imhoff con la muestra de agua homogenizada de la salida del sedimentador.

Dejar sedimentar durante una hora, luego proceder a la lectura correspondiente de los volúmenes de sedimentos.

Calcular la eficiencia de un sedimentador, E, a partir de la fórmula:

$$E = \frac{(e - s)}{e} \times 100$$

donde:

E = porcentaje de eficiencia


e = Volumen del sedimento depositado en el cono que contiene el agua bruta.

s = Volumen del sedimento depositado en el cono que contiene el agua que paso por el sedimentador.

12 Reporte de datos

Reportar los sólidos sedimentables en ml/L.

13 Notas

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 29 Versión: 1 Fecha: 25/04/2022
	GRASAS Y ACEITES	Página 4 de 5 Preparado por: R. Morales Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10. Procedimiento de análisis

10.1. Flotación

Si la ampolla de decantación no esta graduada. Graduarla a 1000 mL en la parte superior y a 100 mL en la parte inferior.

Colocar la ampolla de decantación en forma vertical en un soporte universal utilizando una argolla de metal forrada de papel aluminio.

Verter la muestra en la ampolla, medir el volumen de muestra servida. Si la muestra presentará sólidos flotantes de gran tamaño, hacerla pasar por un colador de plástico.

Puesta la muestra en la ampolla se iniciará el período de flotación, el cual tendrá un tiempo estándar de 30 min. Sí se utilizará más tiempo, deberá indicarse en el informe de resultados.

Al finalizar el período de flotación se deberá vaciar los primeros 900 mL de agua a través de la espita de forma lenta (estos deberán de ser descartados), parando antes de perder el aceite u otras sustancias encontradas en la superficie, retirar el tapón de la ampolla, para evitar que se forme vacío. Posteriormente, gire la ampolla de decantación hacia atrás y adelante alrededor de su eje vertical para poder despegar el lodo de los costados, y dejar reposar durante 5 min.

Finalmente, de manera muy lenta descargue los 100 mL restantes y descarte. Las grasas y aceites quedarán adheridas a la pared de la ampolla y será con lo que se realizará el análisis.

Nota: La capa sobrenadante en la parte superior del líquido (grasas y aceites) puede mezclarse con el agua a medida que desciende por el tubo. Si se produce una mezcla deberá parar antes de perder el material flotante.


10.2. Extracción

Agregar 50-100 mL de cloroformo, con una probeta, a la ampolla de decantación y agitar vigorosamente (quitar la ampolla del soporte universal y agitar).

Colocar la ampolla con la espita levemente hacia arriba y liberar la presión teniendo cuidado. Seguir agitando la ampolla hasta que ya no se genere presión. En esta etapa se formarán dos fases: la inferior que será el solvente con las grasas y aceites disueltos, y la superior que será una fase acuosa. Terminado esta etapa se dejará sedimentar por un tiempo entre 3 a 5 minutos, colocar la ampolla nuevamente en el soporte universal.

Durante el tiempo de espera preparar el equipo de filtrado.

Posteriormente, filtrar toda la muestra a través de un papel filtro de fibra de vidrio AP40 seco en un kitazato de 250 mL, con tara registrada previamente.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 29 Versión: 1 Fecha: 25/04/2022
	GRASAS Y ACEITES	Página 3 de 5 Preparado por: R. Morales Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Bomba de vacío

Pinzas de punta plana

Soporte universal

Anillo

8. Recomendaciones especiales

El procedimiento es aplicable solo para muestras simples.

El uso de guantes durante la toma de muestra es obligatorio.

El tiempo máximo de almacenamiento, previo al análisis y debidamente preservada a un pH 2, es de 30 días.

9. Preparación de material

Los frascos ámbar de vidrio de 1 L deben estar limpios y secos, según el POE - 5 Lavado de cristalería.

Previo a la recolección de muestras de agua, lavar los frascos ámbar de 1 L con un solvente orgánico (acetona o n-hexano) y secarlas al aire, esto con la finalidad de remover cualquier residuo que pueda interferir con el análisis. Debe de considerarse que toda la cristalería utilizada deberá de estar seca.

9.1 Recolección, preservación y almacenamiento de muestras

Rotular el recipiente de toma de muestra con los siguientes datos: Lugar de muestreo, hora y fecha de recolección, nombre de quién recolectó la muestra, previamente a la toma de muestra.


Recolectar la muestra de la superficie del lugar establecido para dicho propósito de forma directa. No se debe de lavar el frasco con la muestra. El volumen a recolectar es de 1 L, en el frasco previamente preparado.

Si en la superficie del agua a muestrear hay presencia de aceites emulsionados, tomar la muestra de 20 a 30 cm de profundidad, en el sitio con menor turbulencia para asegurar una mayor representatividad.

Para preservar la muestra acidificar con ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrados a un valor de pH 2 o menor, utilizar 2 mL para ello.

Transportar y almacenar la muestra de forma vertical y a una temperatura de 4 °C.

Evitar llenar el frasco completamente para evitar pérdidas de grasas y aceites.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 29 Versión: 1 Fecha: 25/04/2022
	GRASAS Y ACEITES	Página 2 de 5 Preparado por: R. Morales Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

Litro (L)

Miligramos por litro (mg/L)

Miligramos (mg)

Mililitros (mL)

Minutos (min)

Grados centígrados (°C)

Centímetros (cm)

7. Materiales, equipos y reactivos

7.1. Reactivos

Agua desmineralizada

Ácido clorhídrico (HCl) o Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) concentrado

Cloroformo

Acetona o n-hexano grado reactivo

Agua grado reactivo

7.2. Cristalería

Frascos ámbar de vidrio de 1 L, con tapadera plástica

Probeta graduada de 100 mL

Ampollas de decantación de 1 L

Kitazatos de 250 mL

7.3. Equipo

Balanza analítica


Filtro de fibra de vidrio AP 40

Cronómetro

Campana de extracción de gases

Baño maría

Equipo de filtrado

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 29 Versión: 1 Fecha: 25/04/2022
	GRASAS Y ACEITES	Página 1 de 5 Preparado por: R. Morales Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Proporcionar directrices para la toma y análisis de muestras de grasas y aceites en muestras de agua recolectadas.

2. Aplicación

El método es aplicable a muestras líquidas tales como, aguas naturales, residuales crudas, residuales tratadas e industriales. El método no es aplicable a fracciones de bajo punto de ebullición que se volatilicen por debajo de los 85 grados centígrados.

El método de análisis es el normalizado por APHA-AWWA-WPCF (1992) y APHA-AWWA-WEF (2017) para grasas y aceites flotables solubles. La medición de grasas y aceites es indicativa del grado de contaminación del agua por usos industriales y humanos.

3. Principio

Se considera como aceites y grasas a los materiales recuperados que son solubles en un solvente. Por lo que no mide una sustancia específica, sino un grupo de sustancias susceptibles a disolverse en el solvente. Los ácidos grasos y las grasas insaturadas se oxidan fácilmente, por lo que se debe minimizar este efecto agregando un preservante como ácido clorhídrico o sulfúrico.

4. Referencias

APHA, AWWA, WPCF, (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales*. España, Madrid: Díaz de Santos.

APHA, AWWA, WEF, (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Estados Unidos: Cenvco Publisher Services.

NMX-AA-005-SCFI-2013 (2013). *Análisis de agua – Medición de Grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba*. Norma mexicana. Dirección General de Normas de la secretaria de Economía.


5. Documentos asociados

Seguridad de laboratorio, POE - 4

Lavado de cristalería, POE - 5

Registro de muestras, POE - 19

Limpieza de equipo de filtración, POE - 21

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 29 Versión: 1 Fecha: 25/04/2022
	GRASAS Y ACEITES	Página 5 de 5 Preparado por: R. Morales Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Realizar una segunda extracción si los materiales flotantes sobrepasan los 4 mg/L, añadiendo 25 mL de cloroformo a la fase acuosa que quedó en la ampolla. Seguir las recomendaciones del segundo párrafo de este inciso. Si es necesario realizar una tercera extracción.

Lavar el papel filtro con 10 mL de cloroformo, con una pipeta fina, y poner el kitazato en un baño maría a 70 °C. Anotar el volumen utilizado de cloroformo. El volumen a utilizar de solvente dependerá de cuanta grasa este presente.

Nota: El punto de ebullición del cloroformo es de 61°C.

Para cada muestra se deberá determinar el peso del residuo que queda tras la evaporación del solvente (ver formula 11.1).

Así mismo, para cada muestra se realizará un blanco ejecutando el mismo procedimiento de la muestra y utilizando el mismo solvente, volumen y ampolla, esto con el fin de tener un control sobre el proceso. La muestra del blanco se deberá filtrar y colectar en un nuevo kitazato de 250 mL con tara registrada. Luego se deberá poner en baño maría a 70 °C y posteriormente determinar el peso del residuo.

11. Cálculos

11.1. Grasas soluble flotantes, 30 minutos

Las grasas y aceites flotables solubles en cloroformo, tiempo de sedimentación 30 minutos, mg/L

$$= \frac{(A - B) \times 1000}{muestra (mL)}$$


Donde:

A= ganancia de peso total del kitazato tarado (mg), y

B= residuo calculado a partir del blanco de solvente del mismo volumen que el utilizado en la prueba (mg).

NOTA: este análisis no tiene un estándar con el cual se pueda comparar los resultados. La variabilidad de las repeticiones está influenciada por la heterogeneidad de la muestra. Si aparecen partículas grandes de grasas o aceites, el elemento de cambio en la toma de la muestra podrá ser un factor importante.

Se recomienda trabajar este análisis por duplicado o incluso por triplicado.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 1 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN Lodos Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Detección, cuantificación y viabilidad de huevos de helmintos en lodos y biosólidos residuales para una disposición final adecuada.

2. Aplicación

El método es aplicable para muestras de lodos y biosólidos residuales

3. Principio

Los lodos frescos son sometidos a digestión química, lavados continuos, etapas de filtración y flotación, lo cual permite la separación de los huevos de helmintos del resto de partículas de mayor y menor tamaño, con el fin de aumentar su concentración y así facilitar el conteo directo de viabilidad de los huevos de helminto al microscopio.

4. Referencias

Norma oficial mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección ambiental – Lodos y biosólidos – especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final (Diario Oficial de la Federación, 2003).

APHA, AWWA, WPCF. (1992). Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. España, Madrid: Díaz de Santos

5. Documentos asociados

Seguridad en el laboratorio POE – 4

Procedimiento de lavado de cristalería POE – 5

Registro de muestras ingresadas al laboratorio POE – 19


6. Terminología y abreviaciones

Biosólidos: lodos que han sido sometidos a procesos de estabilización y que, por las características adquiridas, pueden ser susceptibles a un aprovechamiento.

Detritus: residuos sólidos que provienen de la descomposición de materia orgánica.

Fase: segmento que resulta de la separación de los componentes de una mezcla, en este caso, por diferencia de densidades.

Filtrado: líquido que atraviesa el medio filtrante.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 2 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

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

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

Helminetos: grupo de gusanos parásitos (de humanos, animales y vegetales), de vida libre, con forma y tamaños variados. Sus ciclos vitales comprenden la producción de huevos o larvas, infecciosas o no.

Huevo de helminto viable: huevos de helmintos susceptibles a desarrollarse e infectar.

Parásito: organismo animal o vegetal que vive sobre o dentro de un individuo de otra especie.

Sobrenadante: líquido que queda sobre un sedimento o precipitado, después de producida la sedimentación.

Sólidos totales (ST): materia que permanece como residuo después de la evaporación y secado a 103-105 °C.

Gramos (gr)

Fuerza relativa de centrifugación (g)

Constante (k) cuyo valor es 89.456

Radio de la centrífuga (r)

Revoluciones por minuto (rpm)

7. Materiales y reactivos

7.1 *Reactivos*

Sulfato de cobre pentahidratado (CAS Nro: 7758-99-8)

Alcohol etílico al 95 % (Index-Nro: 603-002-00-5)


Ácido sulfúrico 95-97 % (CAS-Nro: 7664-93-9)

Formaldehído al 37%

Tween 80%

Agua grado reactivo

Agua desmineralizada


 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 3 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

7.2 *Cristalería*

- 3 Beaker 1 L
- 3 Balones aforados 1 L
- 2 Beaker 50 mL
- 1 Caja de Petri
- 1 Cámara de Sedgwich-Rafter
- 1 Probeta de 25 mL

7.3 *Equipo*

- Gradillas para tubos de ensayo
- 16 o más tubos de centrífuga de 10 mL
- Pipetas de 5 y 10 mL
- Puntas para pipetas de 5 y 10 mL
- Centrifuga
- Estufa con agitador magnético
- Agitador
- Balanza
- Tamiz de 125-170 μm (micras) de poro y reservorio
- Tamiz de 20 μm (micras) de poro (opcional)
- Espátulas
- Bomba de vacío (en su defecto, jeringas o pipetas de 10 mL o más)
- Microscopio óptico con objetivo de 10X
- Refrigerador con capacidad de operar a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
- Campana de extracción de gases (para el uso de éter etílico o acetato de etilo)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 4 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Piseta de plástico de 500 mL

Pipeta Pasteur

8. Recomendaciones de seguridad específicas

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes como importantes y obligatorias:

Existe riesgo de infección por huevos de helmintos por ingestión o contacto de huevos de helmintos con la piel. Utilizar guantes de látex, mascarilla y bata de manga larga en todo momento. En caso de salpicaduras en la ropa, remover la prenda afectada. Se recomienda limpiar las superficies de trabajo con alcohol al 70% o cloro antes y después de trabajar las muestras. En caso de ingestión, consultar a su médico.

Se

9. Soluciones necesarias para el análisis (para 20 muestras)

Previo a realizar el análisis se deberán preparar, almacenar y tener listas las siguientes soluciones.

9.1 *Solución ácido sulfúrico 0.1 N*

Reactivos: 1.05 mL de ácido sulfúrico al 95 - 97%

998.95 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Colocar 500 mL de agua grado reactivo, en un balón aforado de 1000 mL, agregar lentamente 1.05 mL de ácido sulfúrico concentrado. Realizar el procedimiento con precaución ya que este eleva la temperatura y en la campana de extracción de gases. Aforar con agua grado reactivo y mezclar.


9.2 *Solución ácido alcohol (preparación para 1 L)*

Reactivos: 650 mL de ácido sulfúrico 0.1 N

350 mL de alcohol etílico al 95%

Procedimiento: Colocar 650 mL de ácido sulfúrico 0.1 N en un balón aforado de 1000 mL, agregar lentamente 350 mL de alcohol etílico al 95% y mezclar.

Almacenamiento: Mantener a 4°C en un recipiente hermético.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 5 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9.3 Solución de formalina al 0.5% (preparación para 1 L)


Reactivos:	5 mL de formaldehído al 37%
	995 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 500 mL de agua grados reactivo, agregar 5 mL del formaldehído al 37%, en un balón aforado de 1000 mL. Aforar con agua grado reactivo y mezclar.
Almacenamiento:	Almacenar en recipiente hermético.

9.4 Solución de sulfato de cobre (preparación para 1 L)

Reactivos:	600 gr de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
	1000 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 600 gr de sulfato de cobre en un balón aforado de 1000 mL. Agregar agua grado reactivo y mezclar en la estufa a 80 °C (o donde la solución tenga mayor densidad) hasta homogeneizar totalmente. Medir la densidad con ayuda de una probeta y una balanza y, según sea el caso, ajustar la densidad a 1.2 gr/mL agregando sulfato de cobre o agua grado reactivo. (Recordar: densidad = masa/volumen)
Almacenamiento:	Almacenar en recipiente hermético y previo a su uso, verificar la densidad. Se recomienda utilizar la solución a 80 °C, puesto que al enfriarse disminuye su densidad por la precipitación del sulfato de cobre.

9.5 Tween 80 al 0.1% (1 L para cada muestra)

Reactivos	1 mL de Tween 80
	999 mL de agua grado reactivo
Procedimiento	Colocar 100 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 1000 mL. Agregar 1 mL de Tween 80 y mezclar con ayuda de un agitador magnético. Aforar con agua grado reactivo.
Almacenamiento	Almacenar en un recipiente hermético durante 2 a 3 meses.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 6 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10. Procedimiento para el análisis

10.1 *Procedimiento para el cálculo de la muestra a analizar*

Medir el peso de una caja Petri.

Tomar y pesar una submuestra de 25 a 30 gr de lodos frescos en la caja, para determinar la cantidad de lodo fresco equivalente a 2 gr de ST.

Introducir la caja con la muestra dentro del horno de secado a 103-105 °C durante 24 horas.

Retirar la caja del horno y enfriarla en un desecador, para equilibrar la temperatura.

Calcular el peso de muestra a procesar con la fórmula del apartado 11.1.

10.2 *Procesamiento de muestras*

En una placa de Petri previamente tarada, pesar una muestra con el peso del lodo fresco calculado con la fórmula del apartado 11.1.

En un beaker de 1000 mL colocar la muestra previamente pesada y 200 mL de la solución de Tween 80 al 0.1%. Enjuagar la placa de Petri con agua desmineralizada e integrar los enjuagues al beaker.

Con la ayuda del agitador magnético, homogenizar la muestra con la solución de Tween 80 al 0.1% durante 1 minuto.

Agregar 800 mL de la solución de Tween 80 al 0.1% al beaker que contiene la muestra y volver a homogenizar.

Dejar sedimentar durante al menos 3 horas.


Transcurrido el tiempo. Extraer el sobrenadante por vacío y/o manualmente con pipeteador y desecharlo. Reservar el sedimento.

Filtrar el sedimento a través de un tamiz de 125-170 µm de poro. Para ello, colocar el tamiz sobre el reservorio y verter el sedimento sobre el tamiz.

Enjuagar el beaker y el tamiz con 1000 mL de agua desmineralizada con la ayuda de una piseta con el fin de recuperar todo el sedimento posible de menor tamaño en el reservorio. Para no perder sedimento por rebalse, trasvasar el contenido del reservorio de vuelta al beaker, enjuagar el reservorio.

Dejar sedimentar durante al menos 3 horas.

Transcurrido el tiempo, aspirar el sobrenadante por vacío y/o manualmente con pipeteador y desecharlo. Reservar el sedimento.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 7 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Trasvasar el sedimento y enjuagues del beaker, con agua desmineralizada, en 8 o más tubos de centrífuga de 10 mL.

Centrifugar cada tubo a 660 g durante 5 minutos. (Vea apartado 11.2 para calcular la rapidez en rpm). Nota: En la centrífuga Ample Scientific Champion S 50-D, la fuerza 660 g se obtiene al utilizar el rotor 4 de la centrífuga y ajustar la rapidez a 2300 rpm.

Extraer el sobrenadante de cada tubo por vacío y/o manualmente con pipeteador y desecharlo. Reservar el sedimento.

Agregar 5 mL de la solución de sulfato de cobre a cada tubo. Utilizar la solución inmediatamente después de alcanzar la densidad de 1.2 gr/mL, (Ver apartado 9.4).

Resuspender y homogenizar el sedimento en la solución de sulfato de cobre con la ayuda de un agitador vortex.

Centrifugar cada tubo a 660 g durante 5 minutos, según la velocidad correspondiente.

Después de centrifugar, deberán observarse tres fases. Trasvasar el sobrenadante a un beaker de 1 L por vacío y/o manualmente con pipeteador, con el cuidado de no perder la materia flotante en la fase superior, pues ahí se encuentran los huevos de helmintos; desechar las dos fases inferiores.

OPCIONAL: En caso de contar con un tamiz de 20 μm de poro, se recomienda un segundo filtrado para remover el sedimento de menor tamaño y facilitar la lectura de los huevos de helmintos al microscopio. Para ello, filtrar el sobrenadante y recuperar, con ayuda de una piseta con agua desmineralizada, la película que haya quedado retenida sobre el tamiz en 4 o más tubos de centrífuga. Desechar el filtrado. Centrifugar los tubos a 660 g durante 5 minutos, según la velocidad correspondiente. Extraer el sobrenadante y desechar. Depositar la pastilla (muestra) en un beaker de 1 L y agregar 1000 mL de agua desmineralizada, sedimentar por al menos 3 horas y continuar con el procedimiento

Si no se realiza la parte opcional, agregar 1000 mL de agua destilada al beaker con el sobrenadante. Sedimentar por al menos 3 horas.


Extraer el sobrenadante por vacío y desecharlo. Reservar el sedimento.

Trasvasar el sedimento (muestra) y los enjuagues del beaker en 8 o más tubos de centrífuga.

Centrifugar cada tubo a 660 g durante 5 minutos.

Extraer el sobrenadante por vacío y desecharlo. Reservar el sedimento.

Agregar 3 mL de agua desmineralizada a cada tubo y resuspender el sedimento con ayuda de un agitador vortex.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 8 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Reducir el número de tubos empleados a la mitad. Para ello, tomar dos tubos y verter el contenido de uno en el otro, incluyendo los enjuagues. Repetir para todos los pares.

Centrifugar cada tubo a 660 g durante 5 minutos.

Aspirar el sobrenadante por vacío y/o manualmente con pipeteador y desecharlo. Reservar el sedimento.

Agregar 4 mL de la solución de alcohol-ácido a cada tubo y resuspender el sedimento con ayuda de un agitador.

Centrifugar cada tubo a 660 g durante 5 minutos.

Extraer el sobrenadante, dejando 1 mL en cada tubo, y desechar. Reservar el sedimento.

Reducir el número de tubos empleados a la mitad. Para ello, tomar dos tubos y verter el contenido de uno en el otro. Utilizar el agitador vortex para resuspender el sedimento y así facilitar el trasvase.

Enjuagar todos los tubos con 5 mL de la solución de formalina al 0.5% con el fin de recuperar el sedimento pegado a las paredes.

Centrifugar cada tubo a 660 g durante 5 minutos.

Extraer el sobrenadante, por vacío y/o manualmente con pipeteador dejando 2 mL en cada tubo, y desechar. Reservar el sedimento.

Reducir el número de tubos a uno. En el tubo final, conservar 5 mL del sobrenadante (formalina al 0.5%). Lavando las paredes mientras se agrega la formalina para recuperar mayor cantidad de muestra.


10.3 *Determinación de la viabilidad y lectura al microscopio*

Incubar las muestras a una temperatura de 26°C ±0,2 durante 4 semanas.

Cubrir los tubos con Parafilm, haciendo pequeños agujeros en él para que las muestras tengan oxígeno suficiente.

Verificar una vez a la semana que el volumen de formalina no disminuya, en caso contrario llevar la muestra hasta la marca de 5 mL con formalina.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, homogenizar la muestra y proceder a la cuantificación de los huevos.

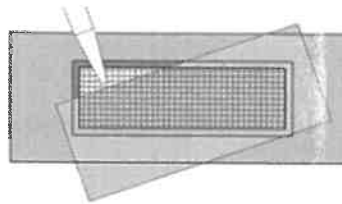
 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 9 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10.4 *Procedimiento para observación al microscopio*

Anotar el volumen total (V_T) de la mezcla de sedimento, sobrenadante y agua desmineralizada.

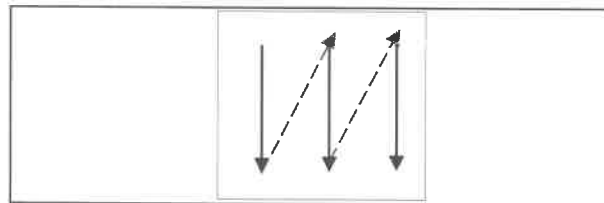
Pipetear 1 mL de la mezcla previamente homogeneizada y verter la muestra en la cámara de Sedgwich-Rafter.

Figura 1: Montaje de la muestra



Observar al microscopio y cuantificar los huevos de helmintos (Figura 3 y 4).

Figura 2: Ruta para el conteo



Repetir los pasos anteriores las veces necesaria hasta cuantificar al menos el 50% del volumen total de la mezcla.

Calcule el número de huevos de helmintos en 2 gr de sólidos totales (vea apartado 11.3).

11. Cálculos

11.1 *Peso de muestra de lodo fresco equivalente a 2 gr de ST (en gr)*


$$\text{Peso de la muestra} = \frac{C - B}{A - B} \times 2$$

Donde,

A : Peso del lodo seco + caja Petri (gr)

B : Peso de la caja Petri (gr)

C : Peso del lodo húmedo + caja Petri (gr).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 10 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

11.2 Rapidez de la centrifuga (en rpm)

$$\text{Rapidez} = \sqrt{\frac{K \cdot g}{r}}$$

Donde,

K : Constante cuyo valor es 89,456

g : Fuerza relativa de centrifugación

r : Radio de la centrifuga (cm)

11.3 Número total de huevos de helmintos en 2 gr de sólidos totales (en H/2 gr ST)

Si no se observó al microscopio la totalidad de la muestra, extrapolar:

$$H = \frac{H_1}{V_1} \times V_T$$

Donde,

H : Número total de huevos

H_1 : Número de huevos cuantificados

V_1 : Volumen observado al microscopio (mL)

V_T : Volumen total (mL)


Expresar los resultados en número de huevos (H) en 2 gr de sólidos totales (2 gr ST):

H/2 gr ST

12. Interferencias

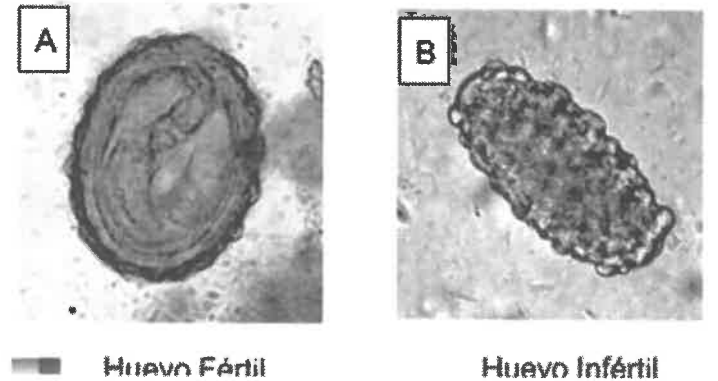
La sobreposición de estructuras y/o detritus no eliminados en el sedimento puede dar una evaluación errónea al interferir la lectura al microscopio. En tal caso, es importante diluir con agua destilada y hacer las alícuotas que se consideren necesarias para que en cada una se realice el conteo.

La falta de experiencia en la identificación de huevos de helmintos es un elemento común de sobreconteo.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 30 Versión: 2 Fecha: 30/08/2024 Página: 11 de 11
	CUANTIFICACION Y VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS Y BIOSÓLIDOS	Preparado por: J. Rodríguez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

13. Anexos

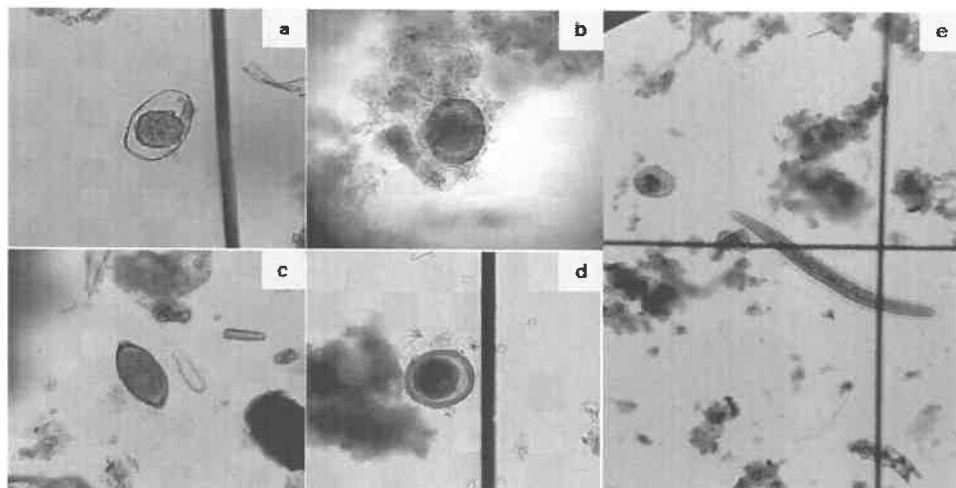
Figura 3. Huevos de *Ascaris lumbricoides* fértil e infértil.




A: Los huevos fértiles son anchos y ovoides, con una cápsula gruesa y transparente, constituida por una membrana vitelina interna relativamente impermeable y de naturaleza lipóide, tiene una capa media transparente y gruesa, derivada de glicógeno y una capa externa mamelonada y teñida de café dorado. Miden alrededor de 35-50 μm de diámetro. Se pueden observar las larvas dentro del huevo.

B: Los huevos infértiles tienen una forma irregular o alargada, miden de 85-95 μm con una sola capa.

Figura 4: Huevos de helmintos y larva



En la figura 4 se puede observar a) *Ancylostoma duodenale* infértil, b) *Ascaris lumbricoides* fértil, c) *Trichuris trichiura* fértil y d) *Toxocara canis* fértil y un e) larva de *Ancylostoma duodenale*.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 1 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Determinar cuantitativa/cualitativamente anatoxina-a en muestras de agua dulce.

2. Aplicación

Varias especies de cianobacterias en ambientes acuáticos, pueden producir potentes toxinas. En muchos casos, las toxinas son metabolitos secundarios en la formación de los fotopigmentos, que se acumulan en el citoplasma en determinadas situaciones (Paerl & David, 1996). La producción de estas endotoxinas es máxima cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, por este motivo, se observa una producción directamente proporcional al aumento de la biomasa (Robillot, Winh, Puiseus-Dao, & Hennion, 2000). Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, las cianobacterias mueren, produciéndose la lisis celular y la liberación de las toxinas al medio (Paerl & David, 1996).


Los kits de placas de ELISA son un inmunoensayo sensible para el cribado cuantitativo de anatoxina-a en muestras de agua potable y recreativa. Las muestras que requieran medidas reglamentarias deben confirmarse mediante HPLC, GC/MS u otros métodos convencionales.

3. Principio

Es una prueba directa competitiva ELISA basada en el reconocimiento de la anatoxina-a por un anticuerpo monoclonal. La anatoxina-a cuando está presente en una muestra, y un conjugado de anatoxina-a-enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-anatoxina-a en solución. A continuación, los anticuerpos de anatoxina-a se unen mediante un segundo anticuerpo inmovilizado en la placa de microtitulación. Después de una etapa de lavado y la adición de la solución de sustrato, se genera una señal de color. La intensidad del color azul es inversamente proporcional a la concentración de Anatoxina-a presente en la muestra. La reacción de color se detiene después de un tiempo especificado y el color se evalúa usando un lector de ELISA. Las concentraciones de las muestras se determinan por interpolación utilizando la curva estándar construida con cada ejecución.

4. Referencias

- Paerl, H., & David, F. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35, 160-167.
- Robillot, C., Winh, J., Puiseus-Dao, S., & Hennion, M. (2000). Hepatotoxin production kinetic of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC- Mass Spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environmental Science and Technology*, 3372-3378.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 2 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

5. Documentos asociados

Seguridad en viajes en lancha POE-1

Recolección y preservación de muestras POE-2

Parámetros *In Situ* POE-3

Seguridad en el laboratorio POE-4

Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería y materiales POE-5

Procesamiento de muestras POE-6

Análisis de Plancton POE-12

Seguimiento en caso de Florecimiento: Recolección, Procesamiento y Análisis a Realizar POE-14

Registro de muestras ingresadas al laboratorio POE-19

6. Terminología y abreviaciones

Anatoxina-a: es una neurotoxina alcaloide producida por algunas especies de cianobacterias (algas verde-azuladas)

Anatoxina total: toxinas que se encuentran disueltas en el agua más las toxinas que se encuentran dentro de la célula y se liberan al agua después de la lisis.

Anatoxina libre: toxinas disueltas en el agua.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Litro (L)

Mililitro (mL)


Micro litro (μ L)

Microgramo (μ g)

Miligramo (mg)

Grado Celsius ($^{\circ}$ C)

Polietileno de alta densidad (HDPE)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 3 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Parte por billón (ppb) (equivalente a $\mu\text{g/L}$)

Densidad óptica (Absorbancia) (DO)

Desviación estándar (SD)

Coefficiente de variación (RSD)

Absorbancia media del calibrador (B)

Absorbancia media del control negativo (B_0)

7. Materiales, equipos y reactivos

7.1 Reactivos

Conjugado enzimático de anatoxina a-HRP liofilizado, 3 viales

Diluyente conjugado, 12 mL

Anticuerpo anti-anatoxina-a liofilizado, 3 viales

Diluyente de anticuerpos, 12 mL

(+) Estándares de anatoxina-a (6): 0, 0.15, 0.40, 1.0, 2.5, 5.0 ppb, 1 mL cada uno

Control a 0.75 - 0.185 ppb, 1 mL

Diluyente de muestra (10X) Concentrado, 2 X 25 mL

Solución de lavado (5X) concentrado, 100 mL

Solución de color (sustrato) (TMB), 12 mL

Solución de parada, 12 mL

Agua desmineralizada


Agua grado reactivo

Ácido ascórbico (CAT Nro: 1831)

Ácido clorhídrico (HCl) fumante 37%

Hidróxido de sodio en lentejas (NaOH) (CAS No.: 1310-73-2)

Tiras Indicadoras de pH

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 4 de 13
	<i>Anatoxina-a</i>	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

7.2 *Cristalería*

Placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo secundario

Botellas vacías de HDPE transparente y ámbar para combinar el conjugado enzimático reconstituido y el anticuerpo

Puntas de plástico desechables para micropipetas (10-200 y 200-1000 μ L)

Recipiente con 500 mL de capacidad (para solución de lavado 1X diluida).

Recipientes de vidrio ámbar de 10 mL

Beacker de 10 mL

Tubos de ensayo de plástico

Balón aforado de 100 mL

Parafilm

7.3 *Equipo*

Vortex

Lector de placas de microtitulación (longitud de onda 450 nm)

Micropipetas

Sonificador o baño ultrasonico


Balanza analítica

8. **Recomendaciones de seguridad específicas**

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

Las soluciones estándar del kit de prueba contienen pequeñas cantidades de anatoxina-a. Además, la solución de sustrato contiene tetrametilbencidina y la solución de parada (stop) contiene ácido sulfúrico diluido.

Evite el contacto de estas soluciones con la piel y las membranas mucosas. Si estos reactivos entran en contacto con la piel, lávese bien con agua.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 5 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9. Soluciones necesarias para el análisis

9.1 Diluyente de la muestra (preservante)


Reactivos	Diluyente de la muestra 10X concentrado
Procedimiento	La solución está lista para usar y no requiere ningún procedimiento (ver apartado 10.1)
Almacenamiento	Mantener a 4°C en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

9.2 Conjugado enzimático de anatoxina reconstituido

Reactivos	Conjugado enzimático de anatoxina Diluyente conjugado
Procedimiento	Reconstituir el conjugado enzimático de anatoxina, previo a ser utilizado. Agregar 3 mL del diluyente conjugado al vial que contiene el conjugado enzimático de anatoxina y agitar en el vórtex. Dejar reposar durante al menos 10 minutos y volver a agitar antes de usar. Si se requiere más de un vial para la prueba, combinar los viales de conjugado enzimático reconstituido en el frasco ámbar de HDPE
Almacenamiento	Mantener a 4°C o congelado en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

9.3 Anticuerpo de anatoxina-a

Reactivos	Anticuerpo de anatoxina-a Diluyente de anticuerpo
Procedimiento	Reconstituir el anticuerpo de anatoxina-a, previo a ser utilizado. Agregar 3 mL del diluyente de anticuerpo al vial que contiene el anticuerpo de anatoxina-a y agitar en el vórtex. Dejar reposar al menos 10 min y volver a agitar antes de usar. Si se requiere más de un vial para la prueba, combinar los viales de anticuerpo de anatoxina-a reconstituido en el frasco transparente de HDPE.
Almacenamiento	Mantener a 4°C o congelado en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 6 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

9.4 Estándares de referencia, control, solución color y solución parada

Reactivos	Estándares de anatoxina-a: 0, 0.15, 0.40, 1.0, 2.5, 5.0 ppb Control: 0.75 - 0.185 ppb Solución color (sustrato) Solución de parada (stop)
Procedimiento	Las soluciones están listas para usar y no requieren ningún procedimiento.
Almacenamiento	Mantener a 4°C o congelado en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

9.5 Solución de lavado

Reactivos	Solución de lavado 5X
Procedimiento	Preparar una dilución 1:5. Si se usa la botella completa (100 mL), agregar 400 mL de agua grado reactivo. Se recomienda preparar únicamente lo que se utilizará. Si se necesita preparar 10 mL, agregar 2 mL de solución de lavado y 8 mL de agua grado reactivo.
Almacenamiento	Mantener a 4°C o congelado en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

9.6 Solución de hidróxido de sodio 1.0 M (preparación para 100 mL)


Reactivos:	4.0 g de hidróxido de sodio en lentejas 100 mL de agua grado reactivo
Procedimiento:	Colocar 50 mL de agua grado reactivo en un balón aforado de 100 mL. Agregar lentamente 4.0 g de hidróxido de sodio en lentejas, agitar lentamente hasta disolver. Aforar con agua grado reactivo y agitar de nuevo.
Almacenamiento:	Mantener a 4°C por un máximo de 6 meses.

10. Procedimiento

10.1 Procedimiento para recolección y manejo de la muestra

Recolectar las muestras de agua en recipientes de vidrio ámbar. Forrar con papel aluminio los recipientes donde se coleccionará la muestra, transportar en hieleras con hielo a 4°C.

Las muestras de agua dulce deben conservarse utilizando el diluyente de muestra (10x) concentrado (**1 ml de diluyente de muestra concentrado 10x por cada 9 ml de muestra de agua**), para evitar la degradación de la anatoxina-a (Ver apartado 9.1).

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 7 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Ajustar el pH de la muestra entre pH 5 y pH 7, utilizar la solución de hidróxido de sodio 1.0 M (Ver apartado 9.6), agregar gota a gota hasta lo lograr el pH deseado, utilizar tiras indicadoras y verificar en laboratorio.

Proteger la muestra de la exposición a la luz natural y artificial, ya que la exposición a la luz y/o un pH alto provocarán la degradación de la anatoxina-a.

Almacenar las muestras refrigeradas (hasta 5 días). Para períodos de almacenamiento superiores a 5 días, las muestras deben almacenarse congeladas.

Para propósito de archivo separar 10 mL de muestras en un tubo de ensayo y guardar congelado protegido de la luz.

Las muestras de agua potable deben tratarse con ácido ascórbico (hasta 1 mg/mL) inmediatamente después de la recolección para eliminar el cloro residual. No usar tiosulfato de sodio. El tiosulfato de sodio se degradará con la anatoxina-a.

10.2 Procedimiento previo al análisis

Para el análisis de cianotoxinas totales, separar 10 mL de muestra en un tubo de ensayo y sonificar por un total de 30 segundos a potencia máxima (3 ciclos de 10 s con descanso de 5 s entre ciclos).

Para el análisis de cianotoxinas libres, y si la muestra presenta material suspendido, filtrar 10 mL de muestra con un trozo de red de plancton (de al menos 40 micras) para eliminar partículas que pueden interferir con el análisis.

10.3 Procedimiento para análisis de muestras

Preparación del Test de Anatoxina-a

Colocar la placa de microtitulación, los reactivos y las muestras a temperatura ambiente antes de usarlas.

El conjugado de enzima y el anticuerpo deben estar reconstituidos antes de su uso (Ver apartado 9.2 y 9.3).


Sacar el número de tiras de placas de microtitulación necesarias de la bolsa de aluminio. Las tiras restantes se almacenan en la bolsa de aluminio y se cierra.

Las soluciones estándar, el sustrato y las soluciones de parada (stop) están listas para usar y no requieren más diluciones.

Diluir las soluciones de lavado (5x) concentradas a una proporción de 1:5 (Ver apartado 9.5).

La solución de parada (stop) debe manipularse con cuidado ya que contiene H₂SO₄ diluido.

Después del análisis, guardar los componentes restantes del kit en el refrigerador (4 - 8 °C)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31
	Anatoxina-a	Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 8 de 13 Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Esquema de trabajo

La placa de microtitulación consta de 12 columnas de 8 pocillos, que se pueden utilizar individualmente para la prueba. Los estándares deben correrse con cada prueba. Nunca usar los valores de los estándares que se han determinado en una prueba realizada previamente. Si se utiliza blanco, este debe de ir en la primera posición.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 0	Std 4	Samp2									
B	Std 0	Std 4	Samp2									
C	Std 1	Std 5	etc.									
D	Std 1	Std 5	etc.									
E	Std 2	Contr.										
F	Std 2	Contr.										
G	Std 3	Samp1										
H	Std 3	Samp1										


Procedimiento del ensayo de Anatoxina-a

Añadir 50 µL de las soluciones estándar, el control y las muestras en los pocillos de las columnas reactivas de acuerdo con el esquema de trabajo proporcionado. Se recomienda el análisis por duplicado o triplicado.

Añadir sucesivamente 50 µL de la solución de conjugado enzimático reconstituido a los pocillos individuales con una pipeta escalonada.

Añadir sucesivamente 50 µL de la solución de anticuerpo reconstituida a los pocillos individuales con una pipeta escalonada.

Cubrir los pocillos con parafilm y mezclar moviendo el soporte de las columnas con un movimiento circular en la mesa de trabajo durante 60 segundos. Tener cuidado de no derramar. Incubar las columnas durante 60 minutos a temperatura ambiente.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 9 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Retirar la tapa y decantar el contenido de los pozos en un fregadero. Lavar las columnas cuatro veces con la solución tampón de lavado 1x. Utilizar al menos un volumen de 250 μL de tampón de lavado para cada pocillo y cada paso de lavado.

El tampón de lavado restante en los pocillos debe eliminarse secando la placa. Evitar que queden burbujas en el fondo de los pozos.

Añadir sucesivamente 100 μL de solución de sustrato (color) a los pocillos individuales con una pipeta.

Cubrir los pocillos con parafilm y mezclar el contenido moviendo el soporte de las columnas con un movimiento circular en la mesa de trabajo durante 30 segundos.

Tener cuidado de no derramar el contenido. Incubar las columnas durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Proteger las columnas de la luz solar.

Añadir 100 μL de solución de parada (stop) a los pocillos en la misma secuencia que para la solución de sustrato (color) utilizando una pipeta.

Leer la absorbancia a 450 nm de la placa utilizando un lector de placas de microtitulación dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución stop.

10.4 Uso del lector de placas de microtitulación

Colocar en la posición ON el interruptor de poder localizado en el módulo de la fuente.

Seleccionar el formato de franja antes de programar un nuevo ensayo, puede ser de 8 o 12, según los pocillos a trabajar.

Ir al menú, en configuración seleccionar la opción 'Formato de tira'. Se mostrará el tipo de franja de 8 y 12 pozos. Hacer una selección y pulsar guardar. La impresora imprimirá el formato de tira habilitado.

En el menú seleccionar 'Manejo de pruebas' y luego 'Crear prueba'.

Pulsar modo y seleccionar 'Regresión'.

Escoger si habrá blanco.

Seleccionar '>>'


Seleccionar nuevamente '>>' y colocar la cantidad de decimales que se van a utilizar. Regresar al menú anterior '<<'

Colocar el número de estándares y las concentraciones de cada uno.

Colocar el número de las repeticiones de los estándares de la prueba

Activar el número de controles de la prueba y el número de repeticiones. Regresar al menú anterior '<<'

Seleccionar '>>'

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 10 de 13
	<i>Anatoxina-a</i>	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Pulsar 'Unidades' y seleccionar las unidades de concentración de la prueba.

Colocar el número de decimales que se desean utilizar.

Colocar el número de repeticiones de muestras.

Antes de instalar el transportador de las franjas, notar la ubicación del pin metálico y la ranura del transportador.

Colocar la ranura del transportador sobre la barra metálica del instrumento de medición.

Asegurarse de que los pozos son empujados hacia abajo y sentados firmemente para que el transportador no se atasque en la entrada.

Deslizar el transportador a su posición, a la izquierda, para que la flecha de posición de lectura del instrumento se alinee con la posición A1 en la franja.

Seleccionar 'Guardar'

Seleccionar 'Correr'. La impresora imprimirá el formato de la prueba creada.

Seleccionar '# de muestras ' y colocar el número de muestras de la prueba.

Pulsar 'Enter'.

Seleccionar 'Aceptar' y posteriormente 'Start'.

11. Resultados

11.1 Cálculos

Después de leer todos los pozos, promediar la DO de cada conjunto de estándares, controles y muestras. Calcular el B/B₀ de la siguiente manera:

$$B/B_0 = \frac{B \text{ (DO promedio del calibrador, control o muestra)}}{B_0 \text{ (DO promedio del control negativo)}}$$

$$\text{Logit } B/B_0 = \log \left(\frac{B/B_0}{1-B/B_0} \right)$$

Donde:

DO: Densidad óptica (Absorbancia)

B: absorbancia media del calibrador

B₀: absorbancia media del control negativo

Log (conc): Logaritmo de las concentraciones estándar



Procedimiento Operacional Estándar

Anatoxina-a

POE – 31

Versión: 2

Fecha: 11/02/2022

Página: 11 de 13

Preparado por: K. Solorzano

Revisado por: F. Barreno

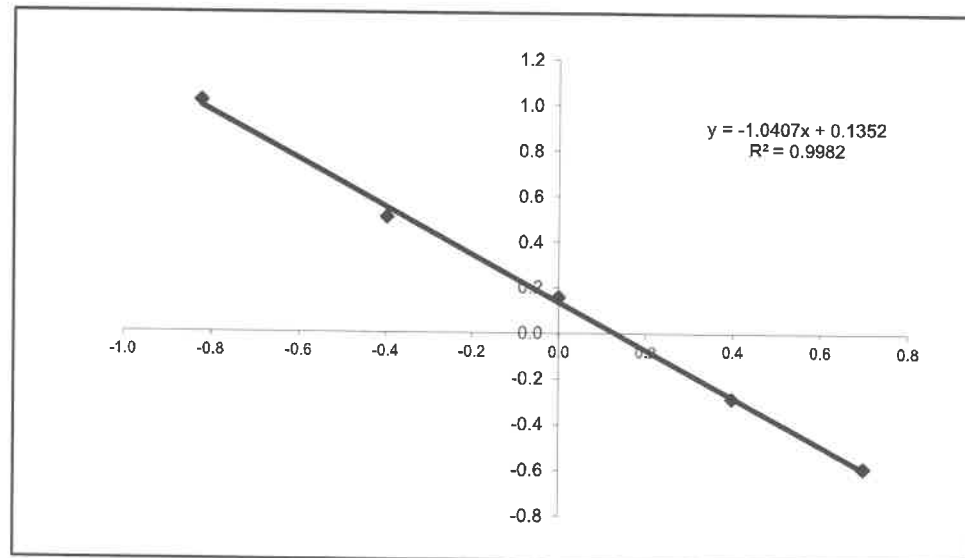
Aprobado por: F. Reyes


Contenido de Celdas	OD	Promedio OD±SD	B/B ₀	Log (conc. Estándar)	Logit B/B ₀
Control negativo	0.63 1.015	0.82 ± 0.19	100	N/A	N/A
Estándar 0.15 ppb	0 0.75	0.75 ± 0.38	0.91	-0.82	1.01
Estándar 0.4 ppb	0.659 0.595	0.63 ± 0.3	76	-0.40	0.51
Estándar 1 ppb	0.489 0.481	0.49 ± 0.0	59	0	0.16
Estándar 2.5 ppb	0.294 0.268	0.28 ± 0.01	34	0.40	-0.28
Estándar 5 ppb	0.174 0.164	0.17 ± 0.00	21	0.70	-0.59

11.2 Curva de calibración

Construir una curva estándar trazando el Logit B/B₀ para cada estándar en un eje vertical lineal (y) versus el logaritmo de las concentraciones estándar de Anatoxina-a en el eje horizontal (x).

Logit B/B₀ para el control y las muestras producirán niveles en ppb (µg/L) de anatoxina-a por interpolación utilizando la curva estándar. Agregar la línea de tendencia y la ecuación de la recta.



 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 12 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

11.3 Cálculo de la concentración de la muestra

Se determina la concentración de anatoxina-a de cada muestra encontrando su valor de absorbancia y el nivel de concentración correspondiente en el gráfico, con la siguiente ecuación:

$$y = a x + b$$

Donde:

y: Logit B/B₀ de la muestra,

a: es la pendiente (en este ejemplo es -1.0407),

b: es el intercepto (en este ejemplo es 0.1352)

x: es la concentración.

El logit B/B₀ de cada muestra se puede calcular utilizando el promedio de la absorbancia de cada estándar y el promedio de la absorbancia del estándar negativo (11.1). Posteriormente se despeja “x” en la ecuación de la recta para encontrar la concentración de la muestra a la cual se le aplica el antilogaritmo para encontrar la concentración en ppb, ver apartado 11.2

Contenido de celdas	OD	Promedio	%B ₀	Logit B/B ₀
Muestra	0.417 0.415	0.416 ± 0.000	51%	0.01

$$\%B_0 = \left(\frac{0.416 \times 100}{0.82} \right) = 50.7$$


$$Y = -1.0407x + 0.1352$$

$$\frac{Y - 0.1352}{-1.0407} = X$$

$$\frac{0.01 - 0.1352}{-1.0407} = X$$

$$0.129 = X$$

$$\text{Antilog}(0.129) = 1.32 \text{ ppb}$$

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 31 Versión: 2 Fecha: 11/02/2022 Página: 13 de 13
	Anatoxina-a	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

12. Criterios de aceptación

El límite de detección de la anatoxina es de 0.1 a 5.0 ppb ($\mu\text{g/L}$). La media de la prueba (50% B/B₀) es de aproximadamente 1.38 ppb ($\mu\text{g/L}$).

Las concentraciones de las muestras se determinan utilizando la curva estándar ejecutada con cada ensayo. Las muestras que registran una concentración más baja de anatoxina-a que el estándar 1 (0.15 ppb) deben reportarse como <0.15 ppb de anatoxina-a (<0.165 ppb para muestras de agua preservada).

Las muestras que presenten una concentración superior a la del estándar 5 (5,0 ppb) deben indicarse como > 5,0 ppb de anatoxina-a (>5,5ppb para muestras de agua preservada) o deben diluirse con diluyente de muestras 1X para obtener resultados precisos.

La concentración del control positivo proporcionado debe ser de 0.75 ± 0.185 ppb.

13. Reporte

13.1 Curva de calibración

Reportar la gráfica de Logit B/B₀ de la muestra (eje y) vs. logaritmo de las concentraciones estándar de Anatoxina-a concentración (eje x) de la curva de calibración (11.2) y la ecuación ($y = ax + b$) (11.3). Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto.

13.2 Concentración de muestras

Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra ($\mu\text{g/L}$ o ppb)


13.3 Presentación de datos

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.


14. Notas

Las muestras se pueden filtrar antes del análisis utilizando filtros de jeringa o filtros de jeringa de membrana supor. El uso de filtros de fibra de vidrio puede producir resultados de muestra falsamente bajos, ya que la anatoxina-a puede unirse al filtro y eliminarlo de la muestra.


#

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	Índice - 1 Versión: 1 Fecha: 04/02/2020 Página: 1 de 3
	INDICE DE DOCUMENTOS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes


ID	NOMBRE	VERSIÓN	FECHA
MANUALES			
M-001	Manual de Bioseguridad	01	30/04/2019
M-002	Manual de Calidad del Laboratorio	01	25/01/2019
M-003	Manual de Procedimientos Analíticos (Procedimientos Operacionales Estándares (POE))	01	25/01/2019
M-004	Manual de Manejo de Vales de Agua Desmineralizada	01	26/11/2024
PROCEDIMIENTOS OPERACIONALES ESTÁNDARES (POE)			
POE-001	Seguridad de Viajes en Lancha	3	10/10/2016
POE-002	Recolección y Preservación de Muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de Plancton	3	06/02/2017
POE-003	Parámetros <i>In Situ</i>	3	08/02/2017
POE-004	Seguridad en el Laboratorio	4	01/03/2017
POE-005	Procedimiento de Lavado, Secado y Almacenamiento de Cristalería y Materiales	6	20/11/2018
POE-006	Procesamiento de Muestras: Nutrientes y Clorofila a	2	09/02/2017
POE-007	Análisis de Amonio	5	20/11/2018
POE-008	Análisis de Nitratos y Nitritos	6	11/12/2018
POE-009	Análisis de Fósforo Reactivo Soluble (Ortofosfatos)	6	20/11/2018
POE-010	Fósforo Total	5	25/01/2019
POE-011	Nitrógeno Total	1	02/02/2016
POE-012	Análisis de Plancton	3	01/03/2017
POE-013	Clorofila A	4	01/03/2017
POE-014	Seguimiento en caso de Florecimiento: Recolección, Procesamiento y Análisis a Realizar	4	11/11/2024
POE-015	Calidad de Agua Mediante el Índice BMWP/Atitlán (macroinvertebrados Acuáticos)	1	31/03/2017
POE-016	Análisis Microbiológico de Aguas: Fermentación en Tubos Múltiples	2	31/10/2018
POE-017	Análisis Microbiológico de Aguas: Método Filtración por Membrana	2	31/10/2018
POE-018	Recolección de Muestras para Análisis Microbiológico	1	11/12/2018
POE-019	Registro de Muestras Ingresadas al Laboratorio	1	11/12/2018
POE-020	Uso y Mantenimiento de Autoclave	1	11/12/2018
POE-021	Limpieza de Equipo de Filtración	1	11/12/2018
POE-022	Uso de Baño Ultrasónico	1	11/12/2018
POE-023	Procedimiento para la Recolección y Transporte de muestras de agua para consumo humano para consumo humano.	2	02/05/2019

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	Índice - 1 Versión: 1 Fecha: 04/02/2020 Página: 2 de 3
	INDICE DE DOCUMENTOS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

POE-024	Sólidos Totales en Suspensión (TSS)	4	29/08/2024
POE-025	Clorofila – a: Extracción con Etanol	2	14/03/2019
POE-026	Recuento Aeróbico Total, Hongos y Actinomicetos mediante el método de vertido en placa	1	23/06/2019
POE-027	Control de Calidad de Equipos	1	24/06/2019
POE - 28	Sólidos Sedimentables	1	11/02/2021
POE - 29	Grasas y aceites	1	25/04/2022
POE - 30	Cuantificación de Huevos de Helminthos en Lodos y Biosólidos	2	30/08/2024
POE- 31	Anatoxina a	2	11/02/2022
POE- 32	Microcistina	2	24/08/2021
POE- 33	Saxitoxina	1	19/07/2021
POE- 34	Cuantificación e identificación de microplásticos en agua y sedimentos	1	11/02/2022
POE- 35	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	1	30/11/2022
POE - 36	Lodos Activados	1	04/07/2022
BOLETAS DE CAMPO			
B - 1	Monitoreo de Calidad de Agua del Lago Atitlán	4	27/09/2019
B - 2	Monitoreo de Florecimientos de cianobacterias	2	27/09/2019
B - 3	Monitoreo de Calidad de Agua de Ríos	3	26/09/2019
B - 4	Monitoreo de Calidad de Agua de Ríos -ICA	2	26/09/2018
B - 5	Monitoreo de Caudales	2	01/10/2019
B - 6	Monitoreo Climático	2	01/10/2019
B - 7	Monitoreo del Nivel del lago	2	01/10/2019
B - 8	Monitoreo de Salubridad (Uso Recreacional)	2	25/09/2019
B - 9	Monitoreo de Salubridad (Consumo Humano)	2	26/09/2019
B - 10	Monitoreo de Vegetación Acuática	3	26/09/2019
B - 11	Monitoreo de Siembras de Tul	2	26/09/2019
B - 12	Monitoreo de Puntos de Contaminación	2	30/09/2019
B - 13	Muestreo Planta de Tratamiento	2	27/09/2019
B - 14	Cadena de Custodia	2	07/10/2019
FORMULARIOS REGISTRO DE USO DE EQUIPO			
FRE-001A	Equipo de laboratorio	2	06/02/2020
FRE-001B	Equipo de laboratorio	2	05/02/2021
FRE-002	Equipo de campo	1	13/05/2020

 AMSCLAE	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS	Índice - 1 Versión: 1 Fecha: 04/02/2020 Página: 3 de 3
	INDICE DE DOCUMENTOS	Preparado por: F. Barreno Revisado por: F. Reyes Aprobado por: F. Reyes

FRE-003	Otros equipos	1	13/05/2020
FRE-004	Tanques de buceo (llenado y uso)	1	15/04/2020
FORMULARIOS REGISTRO VARIOS			
FRV-001	Uso de reactivos líquidos	3	09/02/2021
FRV-002	Control de Temperatura	4	09/02/2021
FRV-003	Material Autoclaveado	3	09/02/2021
FRV-004	Limpieza de equipos	2	09/02/2021
FRV-005	Cristalería quebrada	3	09/02/2021
FRV-006	Uso de Agua desmineralizada	1	/2024
CUADERNOS DE LABORATORIO			
C-L.A.8	Limnológico (Microbiología y DBO)	8	03/2018 -
C-L.B.9	Limnológico (Nutrientes)	9	09/2020 - 05/2023
C - P.5	Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales	5	09/2020 -
C - R.4	Ríos (Ríos - Caudales)	4	02/2020 -
C - S.4	Salubridad (Consumo Humano y Recreacional)	4	03/2018 -
C - O.4	Otras Investigaciones e Inspecciones	4	10/2019 -
C - B.1	Biológico (Vegetación Acuática, Macros y Fitoplancton)	1	01/2016 -
C - RE.1	Registro de Ingreso al Laboratorio	1	05/2017 -
PLAN DE MANTENIMIENTO DE EQUIPOS			
PM-001	Plan de Mantenimiento de Equipo de Laboratorio	1	31/03/2020
PM-002	Plan de Mantenimiento de Equipo de Campo	1	14/04/2020
PM-003	Plan Mantenimiento de Otros Equipos	1	31/03/2020
FORMULARIO DE REGISTRO MANTENIMIENTO DE EQUIPOS			
FRM-001	Equipo de Laboratorio	1	31/03/2020
FRM-002	Equipo de Campo	1	14/04/2020
FRM-003	Otros Equipos	1	14/04/2020

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 1 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

1. Propósito

Determinar cuantitativamente las microcistinas en muestras de agua dulce.

2. Aplicación

Las microcistinas son péptidos cíclicos no ribosomales producidos por algunas cianobacterias como *Microcystis aeruginosa*, el principal productor de estas cianotoxinas. Se las considera hepatotoxinas poderosas y se las trata como muy peligrosas (Scoglio, 2018). Son muy estables y termorresistentes existiendo más de 100 variedades distintas, cuatro de ellas (LR, RR, LA y YR) son especialmente las más frecuentes (Quesada, Sanchis, & Carrasco, 2004)

Las microcistinas son metabolitos secundarios que normalmente se encuentran en el interior de la célula. Sin embargo, cuando la toxina es liberada, normalmente por lisis celular, el agua queda contaminada y su consumo es nocivo no solo para el ser humano sino también para los animales. Un factor a tener en cuenta cuando se analizan estas toxinas es que la ausencia de microcistinas libres no indica la ausencia del microorganismo en el agua, algunos tratamientos podrían provocar la rotura de las células y su liberación en el agua (Pham, Dao, Tran, Nimptsch, Wiegand, & Motoo, 2007).

El kit de placa de microcistina utiliza un anticuerpo policlonal que se une tanto a las microcistinas como a un conjugado de microcistina y enzima. Las microcistinas en la muestra compiten con el conjugado microcistina-enzima por un número limitado de sitios de unión de anticuerpos. Dado que el mismo número de sitios de unión de anticuerpos está disponible en cada pocillo, y cada pozo recibe el mismo número de moléculas conjugadas de microcistina-enzima, una muestra que contiene una concentración baja de microcistinas permite que el anticuerpo se una a muchas moléculas conjugadas microcistina-enzima. El resultado es una solución azul oscuro. Por el contrario, una alta concentración de microcistinas permite que menos moléculas conjugadas de microcistina-enzima se unan a los anticuerpos, lo que da como resultado una solución azul más clara.

3. Principio

El kit de placa Microcystin es un inmunoensayo competitivo marcado con enzimas. El conjugado enzimático de microcistina HRP se pipetea en los pocillos de prueba seguido de estándares o extracto de muestra. Luego se agrega una solución de anticuerpo de microcistina en los pocillos de prueba para iniciar la reacción. Durante un período de incubación de 30 minutos, la microcistina de la muestra y el conjugado de HRP de microcistina compiten por unirse al anticuerpo de microcistina. Después de esta incubación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier microcistina no unida y conjugado de microcistina HRP.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 2 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

A continuación del lavado, se agrega un sustrato incoloro a los pocillos y cualquier conjugado enzimático unido convertirá el sustrato en un color azul. Posteriormente de otra incubación de 30 minutos, la reacción se detiene con la adición de solución stop y se mide la cantidad de color en cada pocillo. El color de la muestra desconocida se compara con el color de los estándares y se deriva la concentración de microcistina de la muestra. La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de microcistina presente.

4. Referencias


- Pham, T., Dao, T., Tran, N., Nimptsch, J., Wiegand, C., & Motoo, U. (2007). Influence of environmental factors on cyanobacterial biomass and microcystin concentration in the Dau Tieng Reservoir, a tropical eutrophic water body in Vietnam. *International Journal of Limnology*, 53, 89-100.
- Scoglio, S. (2018). Microcystins in water and in microalgae, Do microcystins as microalgae contaminants warrant the current public? *Toxicology Reports*, 785-792.
- Pham, T., & Dang, T. (2019). Microcystins in Freshwater Ecosystems: Occurrence, Distribution, and Current Treatment Approaches. *Water and Wastewater Treatment Technologies*, 15-36.
- Quesada, A., Sanchis, D., & Carrasco, D. (2004). Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica*, 109-118.

5. Documentos asociados

- Seguridad en viajes en lancha POE-1
- Recolección y preservación de muestras POE-2
- Parámetros *In Situ* POE-3
- Seguridad en el laboratorio POE-4
- Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería y materiales POE-5
- Procesamiento de muestras POE-6
- Análisis de Plancton POE -12
- Seguimiento en caso de Florecimiento: Recolección, Procesamiento y Análisis a Realizar POE -14
- Registro de muestras ingresadas al laboratorio POE-19

6. Terminología y abreviaciones

- Peroxidasa del rábano (HRP)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 3 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Microcistina total: toxinas que se encuentran disueltas en el agua más las toxinas que se encuentran dentro de la célula y se liberan al agua después de la lisis.

Microcistina libre: toxinas disueltas en el agua

Litro (L)

Mililitro (mL)

Micro litro (μL)

Microgramo (μg)

Miligramo (mg)

Grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$)

Parte por billón (ppb) (equivalente a $\mu\text{g/L}$)

Densidad óptica (Absorbancia) (DO)

Desviación estándar (SD)

Coefficiente de Variación (RSD)

Absorbancia media del calibrador (B)

Absorbancia media del control negativo (B_0)

7. Materiales, equipo y reactivos

7.1 *Reactivos*

Conjugado enzimático de microcistina HRP- 1 frasco que contiene 8 mL

Solución de anticuerpo de microcistina 1 frasco que contiene 8 mL

(+) Estándares de microcistina L - R (4): 0.1, 0.3, 0.8 y 2.0 ppb, 2 mL cada uno

Control positivo de microcistina LR: 1 vial de 1,0 ppb, 2 mL


Control negativo de microcistina - LR: 0,0 ppb, 2 mL

Sustrato - 1 frasco que contiene 14 mL

Solución stop: 1 frasco que contiene 14 mL

Solución de lavado 100X: (1) frasco que contiene 25 mL

Agua grado reactivo

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 4 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

7.2 *Cristalería*

Placa que contiene 12 tiras de test, recubierto de 8 pocillos cada una.

Recipiente para desechos.

Puntas de plástico desechas para micropipetas (10-100 y 100-1000 μ L)

Recipientes de vidrio ámbar de 10 mL

Beacker de 10 mL

Tubos de ensayo de plástico

7.3 *Equipo*

Micropipetas

Lector de placas de microtitulación (longitud de onda 450 nm)

Temporizador

Vortex

Sonificador o baño ultrasonico

Parafilm

8. **Recomendaciones de seguridad específicas**

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

La solución stop contiene ácido clorhídrico 1N, evitar el contacto de esta solución con la piel, ojos y las membranas mucosas. Si estos reactivos entran en contacto con la piel, lávese bien con agua.


9. **Soluciones necesarias para el análisis**

9.1 *Solución estándar, sustrato y solución de parada (stop)*

Reactivos Soluciones estándares, sustrato y solución de parada (stop).

Procedimiento Las soluciones están listas para usar y no requieren más diluciones.

Almacenamiento Mantener a 4°C en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 5 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

9.2 Solución de lavado

Reactivos	Solución de lavado 100X Agua grado reactivo
Procedimiento	Preparar una dilución 1:100, de la solución de lavado 1X diluyendo 1 mL de 100X en 99 mL de agua grado reactivo, en una botella de lavado. Se recomienda preparar únicamente lo que se va a utilizar.
Almacenamiento	Mantener a 4°C o congelado en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

10. Procedimiento

10.1 Procedimiento para recolección y manejo de la muestra

Ajustar las muestras a un pH neutro.

Transportar las muestras en hieleras a 4°C.

Las muestras de agua deben estar libres de partículas, si es necesario, centrifugar o filtrar las muestras antes de ejecutar el ensayo.

Almacenar las muestras refrigeradas

Si es necesario, para las muestras que contienen algas vivas se debe realizar una lisis antes del análisis para liberar las toxinas en las células. Un simple ciclo de congelación/descongelación logrará esto.

10.2 Procedimiento previo al análisis


Para el análisis de microcistinas totales, separar 10 mL de muestra en un tubo de ensayo y sonificar por un total de 30 segundos a potencia máxima (3 ciclos de 10 s con descanso de 5 s entre ciclos).

Para el análisis de microcistinas libres, y si la muestra presenta material suspendido, filtrar 10 mL de muestra con un trozo de red de plancton (de al menos 40 micras) para eliminar partículas que pueden interferir con el análisis.

10.3 Procedimiento para análisis de muestras

Preparación del Test de Microcistinas

Colocar la placa de microtitulación, los reactivos y las muestras a temperatura ambiente antes de usarlas.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 6 de 11
	<i>Microcistina</i>	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Preparar la solución de lavado 1X, ver apartado 9.2.

Colocar la cantidad adecuada de pocillos en la placa. Asegurarse de volver a sellar los pocillos no utilizados en la bolsa con cierre hermético con desecante.

La solución estándar, el sustrato y las soluciones de parada (stop), están listas para usar.

Después del análisis, guardar los componentes restantes del kit en el refrigerador (4-8°C)

Esquema de trabajo

La placa de microtitulación consta de 12 columnas de 8 pocillos, que se pueden utilizar individualmente para la prueba. Los estándares deben correrse con cada prueba. Nunca usar los valores de los estándares que se han determinado en una prueba realizada previamente. Si se utilizará blanco este debe de ir en la primera posición.


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std. 1	Contr.	etc.									
B	Std. 1	Contr.	etc.									
C	Std. 2	Samp. 1										
D	Std. 2	Samp. 1										
E	Std. 3	Samp. 2										
F	Std. 3	Samp. 2										
G	Std. 4	Samp. 3										
H	Std. 4	Samp. 3										

Procedimiento del ensayo de Microcistina

Añadir 50 µL del conjugado enzimático HRP en cada pocillo.

Añadir 50 µL de estándares, controles o extracto de muestra en los pocillos de prueba correspondientes. Asegúrese de utilizar una punta de pipeta limpia para cada uno.

Añadir 50 µL de la solución de anticuerpos en cada pocillo.

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 7 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Agitar la placa suavemente durante 30 segundos con un movimiento hacia adelante y hacia atrás. Luego incubar los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Decantar el contenido de los pocillos en un contenedor de desechos apropiado, evitando que queden burbujas al fondo del pocillo.

Llenar los pocillos con solución de lavado 1X y luego decantar. Repetir 4 veces para un total de cinco lavados.

Después del último lavado, invertir la placa y golpear ligeramente los pocillos sobre papel absorbente para eliminar lo último de la solución de lavado.

Añadir 100 μ L del sustrato en cada pocillo. Agitar el plato suavemente durante 30 segundos con un movimiento hacia adelante y hacia atrás.

Incubar los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Añadir 100 μ L de la solución stop en cada pocillo.

Medir y registrar la absorbancia de los pocillos a 450 nm.

10.4 Uso del lector de placas

Colocar en la posición ON el interruptor de poder localizado en el módulo de la fuente.

Seleccionar el formato de franja antes de programar un nuevo ensayo, puede ser de 8 o 12, según los pocillos a trabajar.

Ir al menú, en configuración seleccionar la opción 'Formato de tira'. Se mostrará el tipo de franja de 8 y 12 pozos. Hacer una selección y pulsar guardar. La impresora imprimirá el formato de tira habilitado.

En el menú seleccionar 'Manejo de pruebas' y luego 'Crear prueba'.

Pulsar modo y seleccionar 'Regresión'.

Escoger si habrá blanco.

Seleccionar '>>'

Seleccionar nuevamente '>>' y colocar la cantidad de decimales que se van a utilizar. Regresa al menú anterior '<<'

Colocar el número de estándares y las concentraciones de cada uno.

Colocar el número de las repeticiones de los estándares de la prueba

Activar el número de controles de la prueba y el número de repeticiones.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 8 de 11
	<i>Microcistina</i>	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Seleccionar '>>'

Seleccionar nuevamente '>>' y colocar la cantidad de decimales que se van a utilizar

Pulsar 'Unidades' y seleccionar las unidades de concentración de la prueba.

Colocar el número de decimales que se desean utilizar.

Colocar el número de repeticiones de muestras.

Antes de instalar el transportador de las franjas, notar la ubicación del pin metálico y la ranura del transportador.

Colocar la ranura del transportador sobre la barra metálica del instrumento de medición

Asegurarse de que los pozos son empujados hacia abajo y sentados firmemente para que el transportador no se atasque en la entrada.

Deslizar el transportador a su posición, a la izquierda, para que la flecha de posición de lectura del instrumento se alinee con la posición A1 en la franja.

Seleccionar 'Guardar'

Seleccionar 'Correr'. La impresora imprimirá el formato de la prueba creada.

Seleccionar '# de muestras' y colocar el número de muestras de la prueba.

Pulsar 'Entre'.

Seleccionar 'Aceptar' y posteriormente 'Start'

11. Resultados

11.1 Cálculos

Después de leer todos los pozos, promediar la DO de cada conjunto de estándares y controles, calcular el B/B₀ y Logit B/B₀

$$B/B_0 = B \frac{(\text{DO promedio del calibrador, control o muestra})}{\text{Bo (DO promedio del control negativo)}}$$

$$\text{Logit } B/B_0 = \log \left(\frac{B/B_0}{1 - B/B_0} \right)$$

Donde:

DO: Densidad óptica (Absorbancia)

B: absorbancia media del calibrador

B₀: absorbancia media del control negativo

Log (conc): Logaritmo de las concentraciones estándar



Procedimiento Operacional Estándar

Microcistina

POE – 32
Versión: 2
Fecha: 24/08/2021
Página: 9 de 11
Preparado por: K. Solorzano
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes

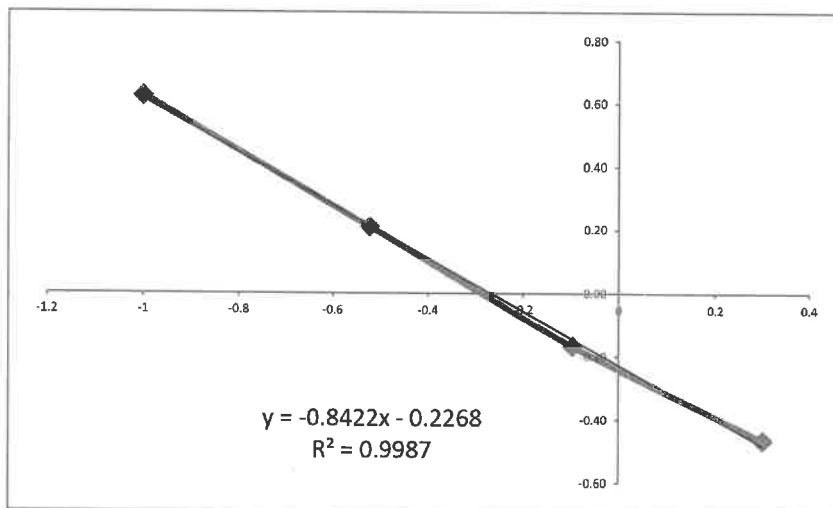
#

Contenido de Celdas	OD	Promedio OD±SD	%B/B ₀	Log (conc.)	Logit B/B ₀
Control negativo	1.478	1.515 ± 0.052	100	N/A	N/A
	1.552				
Estándar 0.1 ppb	1.255	1.225 ± 0.043	80.8	-1	0.62
	1.194				
Estándar 0.3 ppb	0.941	0.937 ± 0.006	61.8	-0.52	0.21
	0.932				
Estándar 0.8 ppb	0.626	0.614 ± 0.017	40.5	-0.10	-0.17
	0.602				
Estándar 2.0 ppb	0.389	0.388 ± 0.002	25.6	-0.30	-0.46
	0.386				

11.2 Curva de calibración

Graficar una curva estándar trazando el Logit B/B₀ de cada estándar en el eje vertical lineal (y) versus el logaritmo de las concentraciones de microcistina en el eje horizontal (x). Agregar la línea de tendencia y la ecuación de la recta.

Logit B/B₀ para el control y las muestras producirán niveles de ppb (µg/L) de microcistina por interpolación utilizando la curva estándar.



 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 10 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

11.3 Cálculo de la concentración de la muestra

Se determina la concentración de microcistina de cada muestra encontrando su valor de Logit B/B₀ y el nivel de concentración correspondiente en el gráfico.

Utilizando la siguiente ecuación:

$$y = ax + b$$

Donde:

y: Logit B/B₀ de la muestra,

a: es la pendiente,

b: es el intercepto y

x: es la concentración.

El Logit B/B₀ de cada muestra se puede calcular utilizando el promedio de la absorbancia de cada estándar y el promedio de la absorbancia del estándar negativo (11.1). Posteriormente se despeja “x” en la ecuación de la recta para encontrar la concentración de la muestra a la cual se le aplica el antilogaritmo para encontrar la concentración en ppb.

Contenido de celdas	OD	Promedio	%B/B ₀	Logit B/Bo
Muestra	0.769 0.771	0.770 ± 0.001	50.8%	0.01

$$\%B_0 = \left(\frac{0.770 \times 100}{1.515} \right) = 50.8$$


$$Y = -0.8422x - 0.2268$$

$$\frac{Y + 0.2268}{-0.8422} = X$$

$$\frac{0.01 + 0.2268}{-0.8422} = X$$

$$-0.28 = X$$

$$\text{Antilog}(-0.28) = 0.52 \text{ ppb}$$

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 32 Versión: 2 Fecha: 24/08/2021 Página: 11 de 11
	Microcistina	Preparado por: K. Solorzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

12. Criterios de aceptación

El límite de detección del microcistina es < 0.1 o > 2.0 ppb ($\mu\text{g/L}$)

Las muestras con una concentración de microcistinas más baja que el estándar 1 (0.1 ppb) deben reportarse como que contienen < 0.1 ppb de microcistinas. Las muestras que presenten una concentración superior al estándar 4 (2,0 ppb) deben diluirse con agua grado reactivo para obtener resultados precisos y repetir. Luego, los resultados deben multiplicarse por el factor de dilución utilizado.

La concentración del control positivo proporcionado (1.0 ppb) debe de ser de 0.80 – 1.30ppb

13. Reporte

13.1 Curva de calibración

Reportar la gráfica de $\log_{10} B/B_0$ de la concentración (eje x) vs. $\text{Logit } B/B_0$ (eje y) de la curva de calibración (11.2) y la ecuación ($y = ax + b$) (11.3). Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto.

Concentración de muestras

Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra ($\mu\text{g/L}$ o ppb)

Presentación de datos

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

14. Notas

Las muestras se pueden filtrar antes del análisis utilizando filtros de jeringa o filtros de jeringa de membrana supor. Almacenar todos los componentes del kit a una temperatura de 4°C a 8°C (39°F a 46°F) cuando no esté en uso.


No congelar los componentes del kit ni exponerlos a temperaturas superiores a 37°C (99°F).

Dejar que todos los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

No mezclar los reactivos del kit con diferentes números de lote.

Las muestras que tengan o se espera que tengan concentraciones de microcistina superiores a 2,0 ppb deben diluirse antes del análisis.

#

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33
	Saxitoxinas	Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 1 de 11 Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

1. Propósito

Determinar cuantitativamente las saxitoxinas en muestras de agua dulce.

2. Aplicación

La saxitoxina es uno de los “venenos paralíticos de los mariscos” (PSP), producido por varios dinoflagelados marinos y algas de agua dulce. La contaminación de los mariscos con saxitoxina se ha asociado con la proliferación de algas nocivas en todo el mundo.

El ELISA de saxitoxina es un inmunoensayo para la detección cuantitativa y sensible de saxitoxina. Esta prueba es adecuada para la detección cuantitativa de saxitoxina en muestras de agua, así como otras muestras contaminadas. Para las muestras de mariscos, se requiere una preparación de la muestra. Si es necesario, las muestras positivas se pueden confirmar mediante HPLC, GC/MS u otros métodos convencionales.


3. Principio

El kit de placa saxitoxina es un inmunoensayo competitivo marcado con enzimas. La saxitoxina de la muestra y el conjugado de saxitoxina HRP compiten por unirse al anticuerpo de saxitoxina. El anticuerpo de saxitoxina se captura en las paredes del pozo de prueba. Después de la incubación, se extrae el contenido del pocillo y se lavan los pocillos para eliminar cualquier saxitoxina no unida, conjugado de saxitoxina HRP y anticuerpo de saxitoxina libre. Después del lavado, se añade un sustrato a los pocillos y cualquier conjugado enzimático unido provoca la conversión a un color azul.

La intensidad del color azul es inversamente proporcional a la concentración de la saxitoxina presente en la muestra. La reacción de color se detiene después de un tiempo especificado y el color se evalúa usando un lector de placas ELISA. Las concentraciones de las muestras se determinan por interpolación utilizando la curva estándar construida con cada ejecución.

4. Referencias

- Andrinolo, D., Michea, L., & Lagos, N. (1999). Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP) in cats. *Toxicon*, 37, 447-464.
- García, C., Barriga, A., Díaz, J., Lagos, M., & Lagos, N. (2010). Route of metabolism and detoxification of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon*, 15, 135-144
- Quesada, A., Sanchis, D., & Carrasco, D. (2004). Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica*, 109-118.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 2 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

5. Documentos asociados

Seguridad en viajes en lancha POE-1

Recolección y preservación de muestras POE-2

Parámetros *In Situ* POE-3

Seguridad en el laboratorio POE-4

Procedimiento de lavado, secado y almacenamiento de cristalería y materiales POE-5

Procesamiento de muestras POE-6

Análisis de Plancton POE-12

Seguimiento en caso de Florecimiento: Recolección, Procesamiento y Análisis a realizar POE-14

Registro de muestras ingresadas al laboratorio POE-19

6. Terminología y abreviaciones

Saxitoxina: Es una neurotoxina paralizante producidas por varias especies de microalgas dinoflageladas y también por cianobacterias.

Saxitoxina total: toxina que se encuentra disuelta en el agua más la toxina que se encuentra dentro de la célula y se libera al agua después de la lisis.

Saxitoxina libre: toxinas disueltas en el agua

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Litro (L)

Mililitros (mL)

Micro litros (μ L)


Microgramos (μ g)

Miligramo (mg)

Grados Celcius ($^{\circ}$ C)

Parte por billón (ppb) (equivalente a μ g/L)

Densidad óptica (Absorbancia) (DO)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33
	<i>Saxitoxinas</i>	Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 3 de 11 Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Desviación estándar (SD)

Coefficiente de variación (RSD)

Absorbancia media del calibrador (B)

Absorbancia media del control negativo (B₀)

Peroxidasa del rábano (HRP)

Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA)

7. Materiales, equipos y reactivos

7.1 *Reactivos*

Control negativo: 1 vial de 2 mL de 0,0 ppb (µg/L) de saxitoxina

Estandares de saxitoxina: 3 viales que contienen cada uno 2 mL con una concentración de 0,02, 0,08 y 0,32 ppb (µg /L) (ppb) de saxitoxina.

Conjugado enzimático de saxitoxina HRP, 1 vial de 7 mL

Anticuerpo policlonal anti-saxitoxina, 1 vial de 7 mL

Solución de lavado (10X) concentrada, botella de 50 mL

Solución de color (sustrato), 1 vial de 14.

Solución de parada (stop), 1 vial de 14 mL.

Agua desmineralizada

Agua grado reactivo

7.2 *Cristalería*


Placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo secundario.

Recipiente con 500 mL de capacidad.

Puntas de plástico desechable para micropipetas (10-20 y 200-1000µL)

7.3 *Equipo*

Pipeta con puntas desechables capaz de dispensar 50 µL

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 4 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Pipeta multicanal; 8 canales capaces de dispensar 50 y 100 μ L

Lector de placas de microtitulación (longitud de onda 450 nm)

Temporizador

Vortex

Parafilm

8. Recomendaciones de seguridad específicas

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

La solución de paradas (stop) contiene ácido clorhídrico 1N, evitar el contacto con la piel y las membranas mucosas. Limpiar inmediatamente cualquier derrame y lavar el área con abundante agua. Si ocurriera contacto, enjuague inmediatamente con abundante agua.


9. Soluciones necesarias para el análisis

9.1 Solución estándar, sustrato y solución de parada (stop)

Reactivos	Soluciones estándares, sustrato y solución de parada (stop)
Procedimiento	Las soluciones están listas para usar y no requieren ninguna preparación
Almacenamiento	Mantener a 4°C en su recipiente. Desechas transcurrido 1 mes.

9.2	Solución de lavado

Reactivos	Solución de lavado 10X Agua grado reactivo
Procedimiento	Preparar una dilución 1:10, de la solución de lavado 10X diluyendo 1 mL de 10X en 9 mL de agua grado reactivo, en una botella de lavado. Se recomienda preparar únicamente lo que se va a utilizar.
Almacenamiento	Mantener a 4°C o congelado en su recipiente. Desechar transcurrido 1 mes.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 5 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

10. Procedimiento

10.1 Procedimiento para recolección y manejo de la muestra

Transportar las muestras en hieleras a 4°C.

Las muestras de agua deben de estar libres de partículas, si es necesario centrifugar o filtrar las muestras antes de ejecutar el ensayo.

Almacenar las muestras refrigeradas.

Si es necesario, para las muestras que contienen algas vivas se debe realizar una lisis antes del análisis para liberar las toxinas en las células. Un simple ciclo de congelación/descongelación logrará esto.

10.2 Procedimiento previo al análisis

Para el análisis de cianotoxinas totales, separar 10 mL de muestra en un tubo de ensayo y sonificar por un total de 30 segundos a potencia máxima (3 ciclos de 10 s con descanso de 5 s entre ciclos).

Para el análisis de saxitoxinas libres, y si la muestra presenta material suspendido, filtrar 10 mL de muestra con un trozo de red de plancton (de al menos 40 micras) para eliminar partículas que pueden interferir con el análisis.

10.3 Procedimiento para análisis de muestras

Preparación del Test de Saxitoxina


Colocar la placa de microtitulación, reactivos y los extractos de muestra a temperatura ambiente antes de ejecutar la prueba.

Prepara la solución de lavado 1X, ver apartado 9.2.

Colocar la cantidad adecuada de pocillos en la placa. Volver a sellar los pocillos no utilizados en la bolsa con cierre hermético con desecante.

La solución estándar, el sustrato y la solución de parada (stop), están listas para usar.

Después del análisis, guardar los componentes restantes del kit en el refrigerador (4-8°C)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 6 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Esquema de trabajo

La placa de microtitulación consta de 12 columnas de 8 pocillos, que se pueden utilizar individualmente para la prueba. Los estándares deben correrse con cada prueba. Nunca usar los valores de los estándares que se han determinado en una prueba realizada previamente. Si se utiliza blanco, este debe de ir en la primera posición.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std. 1	Samp. 1										
B	Std. 1	Samp. 1										
C	Std. 2	Samp. 2										
D	Std. 2	Samp. 2										
E	Std. 3	Samp. 3										
F	Std. 3	Samp. 3										
G	Contr.											
H	Contr.											

Procedimiento del ensayo de Saxitoxinas

Añadir 50 μ L de conjugado enzimático a cada pocillo.


Añadir 50 μ L de calibradores, controles o extracto de muestra en los pocillos de prueba correspondiente. Utilizar una punta de pipeta limpia para cada uno

Agregar 50 μ L de solución de anticuerpos en cada pocillo de prueba.

Agitar la placa suavemente durante 30 segundos e incubar los pocillos de prueba durante 30 minutos.

Decantar el contenido de los pocillos en un contenedor de desechos apropiado. Llenar los pocillos hasta rebosar con solución de lavado y vaciar (ver apartado 9.2). Repetir tres veces más, para un total de cuatro lavados. Se utiliza 250 μ L por lavado, calcular que para cada pocillo se necesita 1 mL, preparar la cantidad de solución lavado que se utilizará.

Después del último lavado, golpear ligeramente los pocillos invertidos sobre papel absorbente para eliminar lo último de la solución de lavado.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 7 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Agregar 100 µL de sustrato en cada pocillo.

Incubar los pocillos durante 30 minutos.

Agregar 100 µL de solución de parada (stop) en cada pocillo de prueba.

Leer y registrar la absorbancia de los pocillos a 450 nm utilizando un lector de placas de microtitulación.

10.4 Uso del lector de placas

Colocar en la posición “ON” el interruptor de poder localizado en el módulo de la fuente.

Seleccionar el formato de franja antes de programar un nuevo ensayo, puede ser de 8 o 12, según los pocillos a trabajar.

Ir al menú, en configuración seleccionar la opción 'Formato de tira'. Se mostrará el tipo de franja de 8 y 12 pozos. Hacer una selección y pulsar guardar. La impresora imprimirá el formato de tira habilitado.

En el menú seleccionar 'Manejo de pruebas' y luego 'Crear prueba'.

Pulsar modo y seleccionar 'Regresión'.

Escoger si habrá blanco.

Seleccionar '>>'

Seleccionar nuevamente '>>' y colocar la cantidad de decimales que se van a utilizar. Regresa al menú anterior '<<'

Colocar el número de estándares y las concentraciones de cada uno.

Colocar el número de las repeticiones de los estándares de la prueba.

Activar el número de controles de la prueba y el número de repeticiones.

Seleccionar '>>'

Seleccionar nuevamente '>>' y colocar la cantidad de decimales que se van a utilizar.


Colocar el número de repeticiones de muestras.

Antes de instalar el transportador de las franjas, notar la ubicación del pin metálico y la ranura del transportador.

Colocar la ranura del transportador sobre la barra metálica del instrumento de medición

Asegurarse de que los pozos son empujados hacia abajo y sentados firmemente para que el transportador no se atasque en la entrada.

Deslizar el transportador a su posición, a la izquierda, para que la flecha de posición de lectura del instrumento se alinee con la posición A1 en la franja.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 8 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

Seleccionar 'Guardar'

Seleccionar 'Correr'. La impresora imprimirá el formato de la prueba creada.

Seleccionar '# de muestras ' y colocar el número de muestras de la prueba.

Pulsar 'Enter'.

Seleccionar 'Aceptar' y posteriormente 'Start'

11. Resultados

11.1 Cálculos

Después de leer todos los pozos, promediar la DO de cada conjunto de estándares y controles, calcular el B/B₀ y el Logit B/B₀.

$$B/B_0 = B \frac{(\text{DO promedio del calibrador, control o muestra})}{\text{Bo (DO promedio del control negativo)}}$$

$$\text{Logit } B/B_0 = \log \left(\frac{B/B_0}{1-B/B_0} \right)$$

Donde:


DO: Densidad óptica (Absorbancia)

B: absorbancia media del calibrador

B₀: absorbancia media del control negativo

Log (conc): Logaritmo de las concentraciones estándar

Contenido de celdas	OD	Promedio OD±SD	B/B ₀	Log (conc)	Logit B/B ₀
Control negativo	2.149 2.072	2.110 ± 0.055	100	N/A	N/A
Estándar 0.02 ppb	1.775 1.804	1.789 ± 0.020	84.8	-1.70	0.75
Estándar 0.08 ppb	1.242 1.193	1.218 ± 0.035	57.7	-1.10	0.13
Estándar 0.32 ppb	0.489 0.482	0.486 ± 0.005	23.0	-0.49	-0.52

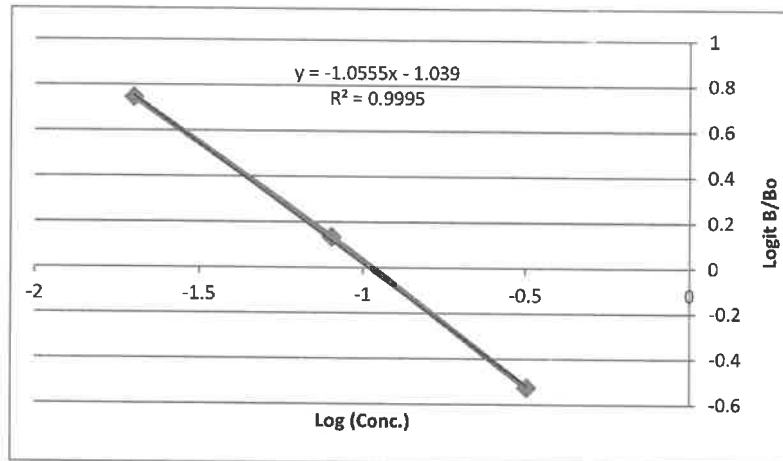
 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 9 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

11.2 Curva de Calibración

Graficar una curva estándar trazando el Logit B/B₀ de cada estándar en el eje vertical lineal (y) versus el logaritmo de las concentraciones de saxitoxina en el horizontal (x). Agregar la línea de tendencia y la ecuación de la recta.

Logit B/B₀ para el control y las muestras producirán niveles de ppb (µg/L) de saxitoxina por interpolación utilizando la curva estándar.



11.3 Cálculo de la concentración de la muestra

Se determina la concentración de saxitoxina de cada muestra encontrando su valor de Logit B/B₀ y el nivel de concentración correspondiente en el gráfico.

Utilizando para ello la siguiente ecuación:

$$y = ax + b$$


Donde:

y: Logit B/B₀ de la muestra,

a: es la pendiente,

b: es el intercepto y

x: es la concentración.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 10 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

El Logit B/B₀ de cada muestra se puede calcular utilizando el promedio de la absorbancia de cada estándar y el promedio de la absorbancia del estándar negativo (11.1). Posteriormente se despeja “x” en la ecuación de la recta para encontrar la concentración de la muestra a la cual se le aplica el antilogaritmo para encontrar la concentración en ppb.

Contenido de celdas	OD	Promedio	B/B ₀	Logit B/Bo
Muestra	0.491 0.511	0.501± 0.010	23.7%	-0.507

$$Y = -1.0555x - 1.039$$

$$\frac{Y + 1.039}{-1.0555} = X$$

$$\frac{-0.507 + 1.039}{-1.055} = X$$

$$-0.504 = X$$

$$\text{Antilog}(-0.504) = 0.313 \text{ ppb}$$


12. Criterios de aceptación

El límite de detección de la saxitoxina es < 0.02 o > 0.32 ppb (µg/L)

Las muestras con absorbancias mayores que el calibrador más bajo o menores que el estándar más alto deben reportarse como <0.02 ppb o > 0.32 ppb, respectivamente.

Las muestras que presenten una concentración superior al estándar 3 (0.32 ppb) deben diluirse con agua grado reactivo para obtener resultados precisos y repetir. Luego, los resultados deben multiplicarse por el factor de dilución utilizado.

El límite de detección de la saxitoxina es de 0,015 ppb (media de seis determinaciones, en blanco menos tres SD). La mitad de la prueba (50% B/B₀) es de aproximadamente 0,09 ppb.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 33 Versión: 1 Fecha: 19/07/2021 Página: 11 de 11
	Saxitoxinas	Preparado por: K. Solórzano Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

#

13. Reporte

13.1 *Curva de calibración*

Reportar la gráfica de logit B/Bo de la concentración (eje x) vs. Logit B/Bo (eje y) de la curva de calibración (11.2) y la ecuación ($y = ax + b$) (11.3). Donde X es la concentración, a es la pendiente, b es el intercepto y Y absorbancia. Incluir el coeficiente de correlación de Pearson, pendiente e intercepto.

13.2 *Concentración de muestras*

Reportar la absorbancia y concentración de cada muestra (ppb)

13.3 *Presentación de datos*

El reporte debe incluir lugar de las muestras, fecha y hora del análisis y de la recolecta de las muestras, nombre de los responsables de la recolecta y de los análisis, nombre del análisis y del laboratorio, identificación de la muestra y observaciones del analista.

14. Notas

Almacenar todos los componentes del kit a una temperatura de 4 °C a 8 °C (39 °F a 46 °F) cuando no esté en uso.

Cada reactivo está optimizado para su uso en el kit de placas de saxitoxina. No sustituir reactivos de ningún otro fabricante en el kit de prueba. No combinar reactivos de otros kits de placas de saxitoxina con números de lote diferentes.


La dilución o adulteración de reactivos o muestras no requeridas en el procedimiento puede dar como resultado resultados inexactos.

No usar reactivos después de la fecha de vencimiento.

Los reactivos deben llevarse a temperatura ambiente, 20 - 28°C (62 - 82°F) antes de su uso. Evite el almacenamiento prolongado (> 24 horas) a temperatura ambiente.

La saxitoxina es una toxina y debe tratarse con cuidado.

#

	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 1 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1. Propósito

Detección, identificación y clasificación de microplásticos en muestras de agua y sedimentos.

2. Aplicación

El método es aplicable para la determinación de microplásticos comunes, incluido el polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo y poliestireno en muestras de agua y sedimentos.

3. Principio

De manera exponencial, en los últimos años se ha visto un incremento en el uso de plásticos, en especial en su aplicación a productos de un solo uso. Su difícil reciclaje y baja capacidad de degradación tienen como consecuencia la acumulación en el medio ambiente provocando diversos problemas sanitarios. Este riesgo se ve incrementado cuando dichos productos sufren descomposición mecánica, fotoquímica o térmica ya que pasan a formar parte de los microplásticos que son partículas menores a 5 mm.

Para evaluar la presencia de microplásticos; las muestras de agua y sedimento deben ser sometidas a diversas etapas de procesamiento: filtración por medio de tamices de diferente calibre, digestión de materia orgánica y separación por densidades. Este procedimiento permite la separación de los microplásticos del resto de partículas orgánicas y no orgánicas, con el fin de aumentar su concentración y así facilitar su identificación, clasificación (fibra, fragmento, film, micro esfera o espuma), conteo y medición al estereoscopio.

4. Referencias

Masura, J., et al. 2015. Métodos de laboratorio para el análisis de microplásticos en el medio marino: recomendaciones para cuantificar partículas sintéticas en aguas y sedimentos. Memorandum técnico de la NOAA NOS-OR&R-48.

López, N. (2018). Contaminación por microplásticos en la superficie del lago Atitlán, Sololá. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.

5. Documentos asociados


Recolección y preservación de muestras POE – 2

Seguridad en el laboratorio POE – 4

Procedimiento de lavado de cristalería POE – 5

Registro de muestras ingresadas al laboratorio POE – 19

Limpieza de equipo de filtración POE – 21

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 2 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

6. Terminología y abreviaciones

Microplásticos: Se definen como cualquier material sólido cuyas dimensiones sean menores a 5 mm que sea resistente a la oxidación húmeda del peróxido, muestre flotación en una solución de NaCl 5 M (d=1,15 g/mL) o metatungstato de litio ~5,4 M (d=1,62 g/mL), y que pase la inspección visual positiva bajo un estereoscopio a un aumento de 40X.

Sedimentos: Se definen como residuos sólidos que se mueven y depositan en una nueva ubicación. Pueden estar constituidos por rocas y minerales, así como restos de plantas y animales.

Oxidación húmeda de peróxido (OHP): Es un tipo de tecnología de oxidación avanzada desarrollada sobre la base de la oxidación con aire húmedo. La OHP utiliza peróxido de hidrógeno como oxidante y se lleva a cabo en condiciones suaves, por lo que puede reducir el consumo de energía y la intensidad del equipo.

Separación por densidades: Proceso por medio del cual se separan partículas de diferentes densidades utilizando un medio acuoso.

Tamiz: Utensilio que se utiliza para separar partículas de diferente grosor.

Gramos (g)

Grados centígrados (°C)

Ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Sulfato de cobre (CuSO₄)

Sulfato de Hierro (FeSO₄)

Mililitro (mL)

Micrómetro (µm)

Milímetro (mm)

Molar (M)


7. Materiales, equipos y reactivos

7.1 Reactivos

Sulfato de hierro heptahidratado (FeSO₄•7H₂O) o Sulfato de Cobre pentahidratado (CuSO₄•5H₂O)

Ácido sulfúrico concentrado H₂SO₄ 95-97% (CAS Nro.: 7664-93-9)

Peróxido de hidrógeno al 30% (H₂O₂)

 <p>AMSCLAE</p>	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 3 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Cloruro de sodio (sal de mesa es suficiente) (NaCl)

Agua grado reactivo

Agua desmineralizada

7.2 *Cristalería*

Balón aforado 100 mL

Kitasato 125 mL

Beaker 200 mL

Vidrio reloj

Vial de vidrio

Embudo de vidrio de 122 mL de diámetro

7.3 *Equipo*

Equipo de filtración por vacío

Filtros de fibra de vidrio de 0.5 μm

Estufa con agitador

Puntas para micropipetas de 1 mL y 5 mL

Agitador magnético

Estufa con agitador magnético

Balanza analítica

Tamiz de 4000 μm de poro

Tamiz de 2000 μm de poro


Tamiz de 250 μm de poro

Espátula

Estereoscopio

Horno para secado de muestras

Campana de extracción de gases (para preparación de soluciones)

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 4 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Piseta de plástico de 500 mL

Abrazadera de resorte

Aro de metal

Manguera

Soporte universal

Papel aluminio

Pinzas

Micropipetas de 1 mL y 5 mL

Mortero

8. Recomendaciones de seguridad específicas

Además de las consideraciones generales de seguridad en el laboratorio, deben considerarse las siguientes como importantes y obligatorias:

Al momento de realizar la oxidación húmeda con peróxido de hidrógeno es importante tener en cuenta que esta solución puede hervir violentamente si se calienta sobre los 75° C por lo que es imperativo vigilar la reacción constantemente, dejarla enfriar y/o agregar agua desmineralizada de ser necesario.

9. Soluciones necesarias para el análisis (preparación para 20 mL por muestra)

Previo a realizar el análisis se deberán preparar, almacenar y tener listas las siguientes soluciones.

9.1 *Solución acuosa de Fe (II) 0.05 M*


Reactivos: 0.3 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.12 mL H_2SO_4 concentrado

20 mL de agua grado reactivo

Procedimiento: Colocar 0.3 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un beaker y posteriormente agregar 0.12 mL de H_2SO_4 concentrado. Finalmente se debe de aforar a 20 mL con agua grado reactivo y agitar hasta disolver.

Almacenamiento: Almacenar a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 5 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

10. Construcción de separador de densidades

Colocar sobre la mesa de laboratorio un soporte universal

En el soporte universal colocar un aro de metal

Sobre el aro de metal colocar un embudo de vidrio de 122 mm de diámetro

En la parte inferior del embudo de vidrio se acopla un segmento de 50 mm de tubo de látex y se une a una pinza de presión para controlar el flujo de líquido desde el embudo (ver Figura 1).

11. Procedimiento para el análisis

11.1 *Procedimiento para preparación de las muestras*

11.1.1 *Muestras de sedimentos*

Pesar, tarar y etiquetar un beaker limpio y seco de 600 mL.

Pesar 100 g de sedimento húmedo y añadir al beaker.

Introducir el beaker con la muestra dentro del horno de secado a 60°C durante 24 horas o hasta que esté completamente seco.

Retirar el beaker del horno y pesarlo para determinar el peso seco de la muestra.

Calcular el peso de muestra a procesar con la fórmula del apartado 12.1.

Triturar levemente la muestra con la ayuda de un mortero.

Filtrar por medio de tamices de diferente calibre (4 mm, 2 mm y 0.25 mm), trasladar las partículas retenidas por los tamices a un beaker de por lo menos 200 mL.

11.1.2 *Muestras de agua*


Filtrar la muestra de agua por medio de tamices de diferente calibre (4 mm, 2 mm y 0.25 mm), enjuagar repetidamente el recipiente de muestreo con agua desmineralizada con el fin de que todas las partículas sean trasladadas a los tamices.

Trasladar las partículas retenidas por los tamices a un beaker de 200 mL con la ayuda de una piseta y agua desmineralizada.

Introducir el beaker con la muestra dentro del horno de secado a 60°C durante 24 horas o hasta que esté completamente seco.

Retirar el beaker con la muestra seca del horno y dejar enfriar.

Nota: si la muestra de agua no tiene material en suspensión filtrar directamente en un filtro de fibra de vidrio de 0.5 μm y cubrirlo con papel aluminio para sus almacenamiento, clasificación y cuantificación de los microplásticos.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 6 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

11.2 *Procesamiento de muestras*

11.2.1 *Oxidación húmeda de peróxido*

Agregar 20 mL de solución acuosa de hierro 0.05 M (ver apartado 9.1), al beaker que contiene los sólidos recolectados. (Muestras de sedimentos y/o agua)

Agregar 20 mL de peróxido de hidrógeno al 30%, realizar el proceso en la campana de extracción.

Dejar reposar la mezcla durante 5 minutos sobre una superficie a temperatura ambiente.

Agregar un agitador magnético al beaker, tapar con un vidrio reloj y colocar sobre una estufa cubierta con papel aluminio a 75°C.

Dejar calentar por 30 min, al observar burbujas de gas en la superficie, retirar el beaker de la estufa y colocar en la campana extractora hasta que deje de hervir.

Calentar por 30 min adicionales a 75°C.

Si aún se observa materia orgánica en el beaker se debe añadir 20 mL más de peróxido de hidrógeno al 30%.

Repetir hasta que no se observe materia orgánica.

Agregar 6 g de sal (NaCl) por cada 20 mL de muestra para aumentar la densidad de la solución acuosa (5 M NaCl).

Calentar la mezcla a 75°C hasta que la sal se disuelva.

11.2.2 *Sistema de separación por densidades*

Trasladar la muestra resultante de la oxidación húmeda de peróxido al separador de densidades (Figura 1), enjuagar el beaker con agua desmineralizada las veces que sea necesario para asegurarse de que todos los microplásticos sean transferidos.


Cubrir ligeramente el sistema con aluminio.

Dejar sedimentar los sólidos durante toda la noche.

Inspeccionar visualmente los sólidos sedimentados en busca de microplásticos. Si hay alguno presente, retirar con pinzas.

Drenar los sólidos sedimentados del separador y desecharlos.

Recolectar los sólidos flotantes en un beaker limpio.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 7 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

Enjuagar el separador de densidades varias veces con agua desmineralizada para transferir todos los sólidos flotantes al beaker.

Trasladar los microplásticos resultantes del paso anterior a un sistema de filtración por vacío para retenerlos en un filtro de fibra de vidrio de 0.5 µm y cubrirlo con papel aluminio para su almacenamiento.

Introducir los filtros con microplásticos en el horno a 60°C por 30 min o hasta que estén secos.

11.3 *Procedimiento para observación al microscopio*

Pesar y tarar un vial limpio y seco.

Colocar el filtro de fibra de vidrio con los microplásticos previamente colectados bajo un estereoscopio (muestras de agua y sedimentos)

Se debe identificar cada uno de los microplásticos y clasificarlos (e.g. fragmento, film, fibra, microesfera y espuma) (Figura 2). Posteriormente se deben medir utilizando pinzas y papel milimetrado.

Cada uno de los microplásticos ya identificados, clasificados y medidos deben ser almacenados en el vial previamente pesado y tarado.

Para las muestras de sedimentos, se debe determinar la masa total de microplásticos con la fórmula del apartado 12.2 y

Para las muestras de agua, se debe determinar la densidad con la fórmula del apartado 12.3.

Etiquetar el vial con la información requerida por el laboratorio para ser almacenado.

12. Cálculos

12.1 *Masa total de sólidos (g) (para muestras de sedimentos)*


$$C = b - a$$

Donde, C : Masa total de sólidos

b : Masa del beaker con sólidos secos

a : Masa del beaker tarado.

12.2 *Densidad de microplásticos (g) (para muestras de sedimentos)*

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 8 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

$$d = \frac{q}{g}$$

Donde,

d: Densidad de microplásticos (mp/g)

q: Número de microplásticos contabilizados

g: Masa de sedimento seco para la muestra

12.3 *Densidad de microplásticos (para muestras de agua)*

$$d = \frac{q}{v}$$

Donde,

d: Densidad de microplásticos (mp/L)

q: Número de microplásticos contabilizados

v: Volumen de agua filtrado para la muestra


13. **Control de calidad**

Es ampliamente conocido que los microplásticos pueden encontrarse en el aire que respiramos por lo que es necesario evaluar una posible contaminación en las muestras. Para ello se deben utilizar muestras control y el procedimiento es el mismo tanto para muestras de sedimentos como para muestras de agua.

Al momento de realizar la oxidación húmeda de peróxido se debe de llenar un segundo beaker con agua. Dicho beaker debe estar expuesto al ambiente durante el mismo periodo de tiempo que la muestra, posteriormente se debe filtrar el agua y observar al estereoscopio para determinar si hay presencia de microplásticos.

También se debe tener un control para las fases de identificación, clasificación, medición y almacenamiento. En este caso se deja un filtro de fibra de vidrio expuesto al ambiente durante el mismo periodo de tiempo en el que el filtro de fibra de vidrio con los microplásticos procesados es evaluado en el estereoscopio y posteriormente, el filtro control también es observado al estereoscopio para determinar la presencia de microplásticos.

14. **Interferencias**

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE – 34 Versión: 1 Fecha: 11/02/2022 Página: 9 de 9
	CUANTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA Y SEDIMENTOS	Preparado por: I. Pérez Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

La superposición de estructuras o de materia orgánica no eliminadas en las muestras puede dificultar la identificación y clasificación de los microplásticos cuando son observados al estereoscopio.

La falta de experiencia en la identificación y clasificación de microplásticos es un elemento común de sobre conteo y/o de confusión al momento de incluir un microplástico dentro de alguna categoría.

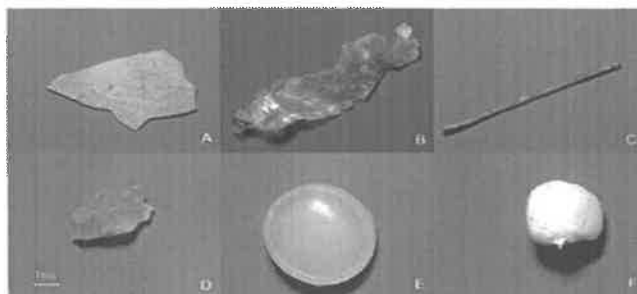
15. Recomendaciones

Poner especial énfasis en las etapas de oxidación húmeda por peróxido y en la separación por densidades ya que de esto va a depender la eficiencia con que las muestras puedan ser trabajadas posteriormente en el estereoscopio. Prestando atención a lo anteriormente mencionado se puede evitar una sobre estimación de datos y confusiones al momento de la clasificación de los microplásticos.


Figura 1: Sistema de separación por densidades



Figura 2: Tipos de microplásticos vistos al estereoscopio



En la figura se observan diferentes tipos de microplásticos A) y D) Fragmento, B) Film, C) Fibra, E) Microesfera y F) Espuma.

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 35 Versión: 1 Fecha: 30/11/2022
	DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO5)	Página 1 de 6 Preparado por: R. Morales Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1.	Propósito La determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) por medio del sistema respirométrico OxiTop® en aguas residuales, efluentes, contaminadas y naturales.
2.	Aplicación El método es aplicable en aguas residuales, así como en aguas naturales. No es aplicable a muestras de agua que contengan cloro residual o elimine el cloro.
3.	Principio La prueba mide el oxígeno utilizado durante la degradación bioquímica de materia orgánica (requerimiento de carbono), sulfuros y el ion ferroso por medio de microorganismos por un período de incubación de cinco días a 20°C. Puede medir también el oxígeno utilizado para oxidar las formas reducidas del nitrógeno (requerimiento de nitrógeno) a menos que se impida la oxidación por medio de un inhibidor. El método respirométrico consiste en la medición del consumo de oxígeno disuelto que los microorganismos utilizan para degradar la materia orgánica presente en la muestra de agua. Durante este proceso se produce dióxido de carbono (CO ₂) el cual es absorbido por el hidróxido de sodio ubicado en el vaso de caucho en la parte superior de la botella. La reacción de neutralización del CO ₂ produce un vacío dentro de la botella y ésta diferencia de presión es medida directamente por un sensor electrónico de presión ubicado dentro del sistema OxiTop®.
4.	Referencias APHA, AWWA, WPCF, (1992). <i>Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales</i> . España, Madrid: Díaz de Santos. APHA, AWWA, WEF, (2017). <i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i> . Estados Unidos: Cenvo Publisher Services. MERCK, <i>Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)</i>
5.	Documentos asociados Recolección y preservación de muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de plancton, POE – 2 Seguridad en el laboratorio, POE - 4 Lavado de cristalería, POE – 5




**Procedimiento
Operacional Estándar**

**DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO
(DBO5)**

**POE - 35
Versión: 1
Fecha: 30/11/2022
Página 2 de 6**

**Preparado por: R. Morales
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes**

	Registro de muestras, POE – 19 Control de calidad de equipos, POE - 27
6.	Terminología y abreviaciones
	Litro (L) Miligramos por litro (mg/L) Miligramos (mg) Mililitros (mL) Minutos (min) Grados centígrados (°C) Centímetros (cm) Microorganismos (moo) Dióxido de carbono (CO ₂)
7.	Materiales, equipos y reactivos
	7.1. Reactivos
	Hidróxido de sodio (NaOH) Inhibidor de nitrificación
	7.2. Cristalería
	Frascos ambar de vidrio de 1L, con tapadera plástica Probeta graduada de 100mL Botella de incubación ambar de 500 mL del sistema OxiTop® Agitador o barra magnética Vaso de caucho del sistema OxiTop®
	7.3. Equipo
	Cabina termostática Sensor o Cabezal del sistema OxiTop®

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 35 Versión: 1 Fecha: 30/11/2022
	DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO5)	Página 3 de 6 Preparado por: R. Morales Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

	<p>Control del sistema OxiTop®</p> <p>Bandeja de agitación magnética</p>
8.	Recomendaciones especiales
	<p>En campo</p> <p>Si las muestras van a ser analizadas en un plazo de dos horas a partir de la toma de la muestra, el almacenamiento en frío es innecesario. Si el análisis no se va a realizar en dicho plazo, conservar la muestra a 4°C o por debajo de esta temperatura, desde el momento de la toma de muestra. Toda muestra debe analizarse antes de las 6 horas desde la toma de muestra. En ningún caso se debe empezar el análisis después de 24 horas de la toma de muestra.</p> <p>En laboratorio</p> <p>Las muestras deben estar a temperatura ambiente antes de ser procesadas.</p> <p>El pH de la muestra debe estar entre 6.5 y 7.5. Si es necesario acidificar o alcalinizar, puede hacerse con ácido sulfúrico (H₂SO₄) o hidróxido de sodio (NaOH), respectivamente.</p> <p>Añadir inhibidor de nitrificación a los siguientes tipos de muestras: efluentes tratados biológicamente, muestras sembradas con efluentes tratados biológicamente y aguas fluviales.</p> <p>NOTA: Si las muestras serán compuestas, deberán cumplir con todas las recomendaciones anteriores.</p>
9.	Preparación de equipos
	<p>Previo a procesar las muestras se debe de realizar lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Encender la cabina termostática, esperar que se estabilice a 20°C. - Corroborar que las baterías (AAA y CR 2430) del control OxiTop® estén cargadas. - Comprobar que el sensor o cabezal OxiTop® este libre (ver apartado 10.2, inciso d y e). - Verificar que las baterías (CR 2430) del sensor o cabezal OxiTop® estén cargadas (ver apartado 10.2, inciso f)
10.	Procedimiento de análisis
	10.1 Preparación de muestra
	<p>Servir en una probeta el volumen específico de la muestra según el DBO esperado. Para ello se utilizará de referencia la tabla 1 <i>Volumen de muestra a analizar de acuerdo a la DBO esperada</i> (ver Anexos).</p>



Procedimiento
Operacional Estándar

POE - 35
Versión: 1
Fecha: 30/11/2022

DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO
(DBO5)

Página 4 de 6
Preparado por: R. Morales
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes

Servir el volumen de la muestra dentro de la botella de incubación ambar del sistema OxiTop® para realizar el análisis.

Introducir el agitador magnético dentro de la botella de incubación.

Colocar de 3 a 5 lentejas de hidróxido de sodio en el vaso de caucho del sistema OxiTop®.

Colocar el vaso de caucho en el cuello de la botella de incubación ambar del sistema OxiTop®.



Cerrar firmemente las botellas con el sensor o cabezal del sistema OxiTop®.

Activar el sensor o cabezal del sistema OxiTop® (ver apartado 10.2)

Después de la activación del cabezal, colocar la botella de incubación sobre la bandeja agitadora ubicada dentro de la cabina termostática. La cabina termostática debe de estar a 20°C.

La botella de incubación debe de mantenerse en incubación dentro de la cabina termostática por cinco días.

10.2 Activación del sensor o cabezal OxiTop® (registro de muestras)

- a. Encender el control  en la tecla **ON/OFF**
- b. Presionar la tecla **GLP/HERRAMIENTAS** y seleccionar la opción **PARÁMETROS [RUN/ENTER]**. En ésta opción se podrá configurar el idioma, tipo de operación, fecha y hora. En **TIPO DE OPERACIÓN** seleccionar la opción operación de 5 días, presionar la tecla **[RUN/ENTER]**. Regresar al menú **GLP/HERRAMIENTAS** presionando la tecla correspondiente.
- c. En el mismo menú de **GLP/HERRAMIENTAS**, seleccionar la opción **MOSTRAR CABEZALES LIBRE**, presionar la tecla **[RUN/ENTER]**. En esta opción se podrán observar los cabezales libres disponibles para utilizar en el análisis. Los cabezales libres se observarán mediante un parpadeo intermitente de una luz roja. Si no está libre, liberarlo. Para liberarlo en el menú **GLP/HERRAMIENTAS**, seleccionar la opción **MANTENIMIENTO**, presionar la tecla **[RUN/ENTER]**. Seleccionar la opción **RESET/LIBERAR CABEZAL**, presionar **[RUN/ENTER]**, regresar al menú **GLP/HERRAMIENTAS**.
- d. En el menú **GLP/HERRAMIENTAS**, seleccionar la opción **CHEQUEAR**, presionar la tecla **[RUN/ENTER]**. Seleccionar la opción **cabezal INFO**, presionar la tecla **[RUN/ENTER]**. Acercar el control al cabezal, verificar que las baterías estén OK, sino proceder a colocar nuevas baterías.
- e. Posteriormente, realizar la activación de los cabezales. Presionar la tecla de activación . En esta opción seleccionar **ACTIVAR CABEZAL [RUN/ENTER]**. Se desplegará la tabla 1, seleccionar el rango del DBO esperado **[RUN/ENTER]**. Registrar el código o número de la muestra (no. de id.) **[RUN/ENTER]**. Ingresar el dato de la muestra **[RUN/ENTER]**. Finalmente, seleccionar la opción **INICIAR [RUN/ENTER]** para activar el cabezal, colocar






**Procedimiento
Operacional Estándar**

**POE - 35
Versión: 1
Fecha: 30/11/2022**

**DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO
(DBO5)**

**Página 5 de 6
Preparado por: R. Morales
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes**

	<p>el lector del control frente al cabezal donde está la muestra para iniciar el proceso de registro de DBO.</p> <p>Nota: para registrar otra muestra se deberá de repetir el paso “e”.</p> <p>f. Leer diariamente la curva de DBO. (Ver apartado 11).</p> <p>g. Al finalizar cada programación se debe borrar las muestras concluidas (Ver apartado 12) y liberar los cabezales (Ver inciso 10.2.c).</p>
11.	Curvas de DBO
	<p>Para observar la curva de DBO, encender el control en la tecla ON/OFF. Ir a la tecla de activación , seleccionar la opción LLAMAR TODOS LOS DATOS, los cabezales se iluminarán.</p> <p>Ir a la tecla MUESTRA STATUS TIPO , dentro de este comando se seleccionará la muestra que se desea observar, presionar la tecla CURVA . Instantáneamente se observará el registro en mg/L de la Demanda Biológica de Oxígeno que se tiene hasta el momento en una curva ascendente, al terminar el período del análisis (5 días) se podrá observar la curva completa y el resultado final del DBO registrado.</p> <p>El control mostrará el símbolo ✓ el cual indicara que ha finalizado el proceso.</p>
12.	Finalización de programación
	<p>Encender el control en la tecla ON/OFF. Ir a la tecla GLP/HERRAMIENTAS, seleccionar la opción MANTENIMIENTO, presionar la tecla [RUN/ENTER]. Seleccionar la opción BORRAR M. CONCLUIDAS presionar la tecla [RUN/ENTER], seleccionar la opción TODAS y seleccionar BORRAR presionar la tecla [RUN/ENTER].</p>
13.	Control de calidad
	<p>Para detectar interferencias que produzcan resultados erróneos, es aconsejable preparar una solución de control en compuestos orgánicos puros y/o muestras con adiciones conocidas, que permita evaluar si las condiciones en que se esta desarrollando el análisis son correctas.</p>
14.	Anexos
	<p>Tabla 1. <i>Volumen de muestra a analizar de acuerdo a la DBO esperada</i></p>



**Procedimiento
Operacional Estándar**


**POE - 35
Versión: 1
Fecha: 30/11/2022**

**DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO
(DBO5)**

Página 6 de 6

**Preparado por: R. Morales
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes**

DBO esperado (mg/L)	Volumen de muestra a tomar (mL)	Factor
0-40	432	1
0-80	365	2
0-200	250	5
0-400	164	10
0-800	95	20.1
0-2000	43.50	50.3
0-4000	22.7	100.5

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 36 Versión: 1 Fecha: 04/07/2022
	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LODOS ACTIVADOS	Página 1 de 8 Preparado por: J. López y J. Rodríguez. Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

1.	Propósito
	Identificar y cuantificar microorganismos indicadores implicados en los procesos biológicos de tratamiento de las aguas residuales y madurez de lodos activados, como control operativo
2.	Aplicación
	Esta metodología es aplicable para la identificación y cuantificación de microorganismos indicadores en los lodos activados de las muestras obtenidas de un reactor correspondiente a evaluar de la planta de tratamiento seleccionada.
3.	Principio
	<p>Las aguas residuales pueden ser degradadas por medios biológicos, por lo cual es de gran importancia que se conozcan los diferentes tipos de microorganismos que lo realizan.</p> <p>El principal uso del tratamiento biológico es la remoción de los compuestos orgánicos biodegradables nutrientes, la aplicación más conocida es el de lodos activados.</p> <p>Lodo activado consiste en una masa floculenta de m.o., materia orgánica muerta y materiales inorgánicos; tienen la propiedad de poseer una superficie altamente activa para la adsorción de materiales coloidales y suspendidos, a lo cual debe su nombre de activado.</p> <p>Consiste en obtener una porción del volumen total de la muestra, la cual debe conservar la integridad de todos sus constituyentes desde el momento de la toma de muestra hasta el final de su análisis o determinación en el laboratorio. Es importante considerar el sitio de muestreo, la homogeneidad y representatividad de la muestra, ya que el reactor debe de haber estado oxigenado al menos 15 minutos para que la muestra sea homogénea.</p>
4.	Referencias
	Moeller, G. y Tomasini, A. (2004). <i>Microbiología de lodos activados</i> . Recuperado de: http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/5Microbiologiadelodosactivados.pdf
	Romero, Jairo (2010). <i>Tratamiento de Aguas Residuales: Teoría y principios de diseño</i> . Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Colombia.
5.	Documentos asociados



**Procedimiento
Operacional Estándar**

**IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN LODOS
ACTIVADOS**

**POE - 36
Versión: 1
Fecha: 04/07/2022**


Página 2 de 8

**Preparado por: J. López y J.
Rodríguez.**

Revisado por: F. Barreno

Aprobado por: F. Reyes

	Seguridad en el Laboratorio, POE - 4 Lavado de Cristalería, POE - 5 Registro de muestras, POE - 19
6.	Terminología y abreviaciones
	Floc biológico:
	Mililitros (mL)
	Microorganismos (m.o.)
7.	Materiales, equipos y reactivos
	7.1. Reactivos
	Agua desmineralizada Alcohol al 70%
	7.2. Cristalería 2 Beakers de 500 mL 1 Cámara de Sedgwich-Rafter Cubreobjetos para la Cámara de Sedgwich-Rafter
	7.3. Equipo
	Microscopio Piseta de plástico de 500 mL Pipeta Pasteur Guantes desechables Muestreador de agua residual Frascos de plástico de 50 mL Marcador permanente

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 36 Versión: 1 Fecha: 04/07/2022
	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LODOS ACTIVADOS	Página 3 de 8 Preparado por: J. López y J. Rodríguez. Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

	<p>Papel absorbente</p> <p>Red de Plancton</p>
8.	Recomendaciones especiales
	<p>Colocarse equipo de protección personal (guantes y mascarillas), manipular con cuidado la muestra, ya que es agua residual.</p> <p>No se permite la colecta de una muestra sin haberse aireado previamente (por lo menos 15 minutos).</p> <p>Recolectar la muestra de un solo reactor.</p> <p>Recolectar la muestra periódica y constantemente para obtener resultados verídicos del ciclo.</p> <p>No contar más de 100 microorganismos por cada mL de muestra.</p>
	<p>Es necesario medir la Temperatura en el tanque de aireación, el oxígeno, pH y el DBO. La concentración crítica de oxígeno esta entre 0.5 y 2.0 mg/L, una concentración menor de este valor inhibe el metabolismo aeróbico. La temperatura ideal es de 20°C, pH 6.5-8.5, concentración de oxígeno mayor a 2.0 mg/L.</p>
9.	Preparación de material previo al muestreo o toma de muestra
	<p>Preparar los insumos necesarios (muestreador, frasco de plástico de 50 mL, guantes, marcador permanente, piseta y alcohol al 70%)</p>
	9.1 Recolección, preservación y almacenamiento de muestras
	<p>Colocarse el equipo de protección personal (guantes y mascarilla).</p> <p>Identificar el frasco de plástico de 50 mL antes de la recolección de las muestras con la fecha, hora, lugar de muestreo y responsables del muestreo.</p> <p>Recolectar la muestra en el frasco de plástico de 50mL utilizando el muestreador de aguas residuales.</p> <p>Lavar el exterior del frasco para eliminar residuos de los lodos activados.</p> <p>Retirar los guantes utilizados en el procedimiento y aplicar un poco de alcohol al 70%.</p>



**Procedimiento
Operacional Estándar**

**IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN LODOS
ACTIVADOS**

**POE - 36
Versión: 1
Fecha: 04/07/2022
Página 4 de 8**

**Preparado por: J. López y J.
Rodríguez.
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes**

Transportar las muestras de forma vertical a temperatura ambiente y lo más pronto posible para evitar la degradación de los microorganismos.

Ver al microscopio en las próximas 3 horas o almacenarlo en la refrigeradora.

10. Procedimiento de análisis

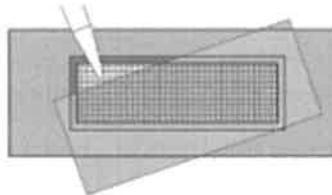
10.1. Diluciones

Utilizando la pipeta pasteur, el agua destilada y en un beaker de 500 mL realizar diluciones de la muestra a una concentración de (1:4) o (1:7) dependiendo de la concentración de la muestra madre.

10.2. Procedimiento para observación al microscopio

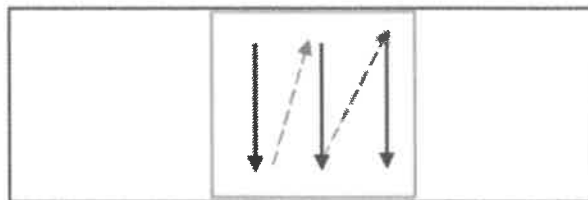
Homogenizar la muestra diluida y agregar 1 mL a la cámara de Sedgewick-Rafter y colocar el cubreobjetos sobre la misma (Ver Figura 1).

Figura 1: Montaje de la muestra




Observar la muestra en 10x, realizando un barrido de arriba hacia abajo, de izquierda a derecha para tener un orden y poder observar la muestra completa (Ver Figura 2).

Figura 2: Ruta para el conteo



10.3. Conteo

 AMSCLAE	Procedimiento Operacional Estándar	POE - 36 Versión: 1 Fecha: 04/07/2022
	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LODOS ACTIVADOS	Página 5 de 8 Preparado por: J. López y J. Rodríguez. Revisado por: F. Barreno Aprobado por: F. Reyes

	<p>De la primera muestra colocada en la cámara de Sedgewick-Rafter, contar 100 m.o. e identificar cada uno de ellos (bacterias, ciliados fijos, ciliados libres, rotíferos y sarcodinas), al completarlos lavar la cámara con agua desmineralizada y secarla con papel absorbente. Repetir el proceso 2 veces más o hasta completar 300 microorganismos (no contar más de 100 microorganismos en cada 1 mL).</p>										
11. Cálculos	<p>Como se gráfica?</p> <p>Diagrama de predominio Relativo: Se representa las etapas en las cuales los organismos alcanzan su número máximo. En este diagrama el eje horizontal representa el tiempo de aireación o la edad de lodos (25 a 30 días) y en el eje vertical representa el número relativo de organismos. Se debe de sacar la abundancia relativa.</p> <p>En rendimiento óptimo de una planta de lodos activados ocurre cuando el lado es de buen asentamiento y existe una población equilibrada de ciliados libre y adheridos, así como de rotíferos y flagelados.</p> <p>NOTA: este análisis no tiene un estándar con el cual se pueda comparar los resultados. La variabilidad de las repeticiones está influenciada por la heterogeneidad de la muestra.</p>										
12. Interpretación	<p>Después de sacar la abundancia relativa</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Condiciones</th> <th style="width: 50%;">Grupo predominante</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>	Condiciones	Grupo predominante								
Condiciones	Grupo predominante										
13. Anexos											



**Procedimiento
Operacional Estándar**

**IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN LODOS
ACTIVADOS**

**POE - 36
Versión: 1
Fecha: 04/07/2022
Página 6 de 8**

**Preparado por: J. López y J.
Rodríguez.
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes**

Microorganismos más comunes:

Bacterias: Son las más importantes en el proceso de lodos activados, por su función en la estabilización del material orgánico y en la formación del floc de lodo activo. Dentro de las que se pueden encontrar los géneros más comunes Alcaligenes, bacillus, Pseudomonas, Nitrosomonas y Nitrobacter, Zooglea ramigera. La presencia de bacterias filamentosos es adversa a las buenas características del sedimentabilidad del floc de lodos activados.

Hongos: no deben de estar presente en los lodos activados, se presentan cuando hay una deficiencia de nitrógeno, son tan efectivos como las bacterias, sin embargo, su asentamiento es más difícil pues producen floc biológico flotante y que este no logre asentarse.

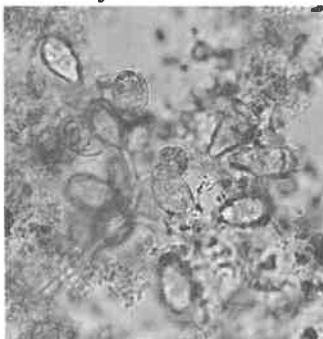
Algas: generalmente no logran sobrevivir debido a la ausencia de luz y la mezcla intensa hace que normalmente no se encuentren en los lodos activados.

Protozoos, son muy abundantes en los lodos activados pueden ser sapróbicos y holozoicos. Los más comunes pueden ser protozoos flagelados, amibas.

Rotíferos: Poner información

A continuación algunos ejemplos

Ciliados fijos



Epistylis pplicatilis (fotografía)

Carchesium sp.

Vorticella sp.

Opercularia sp.

Ciliados móviles

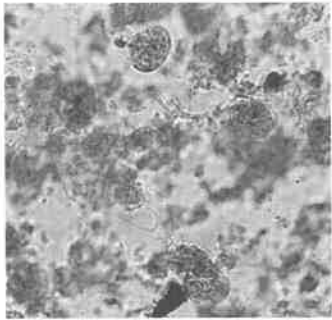


**Procedimiento
Operacional Estándar**

**IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN LODOS
ACTIVADOS**

**POE - 36
Versión: 1
Fecha: 04/07/2022
Página 7 de 8**

**Preparado por: J. López y J.
Rodríguez.
Revisado por: F. Barreno
Aprobado por: F. Reyes**



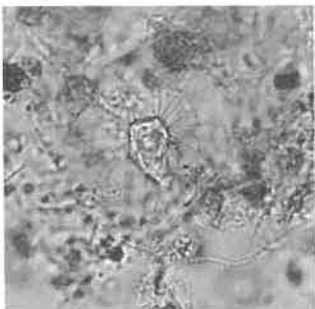
Euplotes sp. (fotografía)
Litonotus sp.
Paramecium caudatum.
Spirostomum sp.

Rotíferos



Rotaria rotatoria. (fotografía)
Cephalodella sp.
Colurella sp.

Sarcodinas



Acineta tuberosa (fotografía)
Podophrya fixa



AMSCLAE

**Procedimiento
Operacional Estándar**

**IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN LODOS
ACTIVADOS**

**POE - 36
Versión: 1
Fecha: 04/07/2022**

Página 8 de 8

**Preparado por: J. López y J.
Rodríguez.**

Revisado por: F. Barreno

Aprobado por: F. Reyes

**BOLETAS
DE
CAMPO**



MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA DEL LAGO ATITLÁN

DATOS GENERALES

Lugar: _____ Fecha: _____ Hora Inicio: _____ Hora Final: _____

Participantes: _____

Estación	Prof. (m)	Hora muestreo	Secchi Inicial	Secchi Final	Secchi (m)	T° Ambiental	No. muestras	Observaciones
							M F N DBO	
							M F N DBO	
							M F N DBO	
							M F N DBO	
							M F N DBO	
							M F N DBO	
							M F N DBO	
							M F N DBO	

TIPO DE MUESTREO:

Puntual: _____ Estratificado: _____

Equipo de muestreo utilizado: _____

Observaciones: _____

Nombre de la persona que toma la muestra:

Para Uso del laboratorio: Analista a cargo: _____
Código de muestra en el laboratorio: _____

Control de emisión

Elaboró: F: Domingo Ujpán Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Flor Mayarí Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa María Reyes Jefe DICA
Fecha: 23/06/2020	Fecha: 23 Jun 2020	Fecha: 23 Jun 2020

Condiciones climáticas: N = Nublado S = Soleado L = Lluvioso



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
 UNIDAD DE MONITOREO AMBIENTAL
 BOLETA DE CAMPO
 MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA DEL LAGO ATITLÁN

Código: B - 1
 Versión: 5
 Emisión: 22/Jun/2020
 Página: 2 de 2

Indice de calidad de Agua ICA/NSF

Estación	Promedio Sat. Oxi 0-30 m	Promedio Col. Fecales 0 - 30 m	Promedio pH 0-30 m	DBO Integrada 0-30 m	Promedio T° agua 0-30 m	Promedio Fosfatos 0 - 30 m	Promedio Nitratos 0 - 30 m	Turbidez Integrada 0-30 m	TDS Integrada 0-30 m
WG									
Santiago									
WP									
\bar{X}									
Wi									

Valor de calidad del agua _____ Calidad _____ Color _____

Observaciones _____

Control de emisión		
Elaboró: F: Domingo Ujpan Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Flor Mayari Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa María Reyes Jefe DICA
Fecha: 23/06/2020	Fecha: 23 Jun 2020	Fecha: 23 Jun 2020



DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del río: _____ Microcuenca: _____
 Fecha: _____ Hora: _____
 Coordenadas: X _____ Y _____ Altitud: _____ (msnm)
 Tipo de curso: _____ inicial _____ medio _____ bajo _____ desembocadura
 Velocidad del agua: _____ rápida _____ moderada _____ lenta _____ estancada
 Ancho: _____ cauce (m) _____ banco (m) Profundidad: _____ (m) Caudal _____ (m³/s)
 Tipo de sustrato: _____ arena _____ piedras-arena gruesa _____ concreto
 _____ arcillo-lodoso
 Rocas: _____ muy grandes _____ grandes _____ medianas _____ pequeñas
 Superficie de rocas: _____ limpia _____ perifiton _____ musgo _____ sedimento
 En el sitio hay: _____ hojarasca _____ troncos/ ramas sumergidos
 _____ raíces sumergidas
 Otra fauna: _____ renacuajos _____ peces _____ otros
 Color del agua: _____ Olor del agua: _____
 Presencia de: _____ des. org. _____ espuma _____ aceite _____ org. muertos
 _____ des. sólidos _____ des. aguas residuales _____ Otros
 Tiempo mx macroinvertebrados: _____
 Índice **BMWP - Atitlán** _____ Calidad _____ Color _____

CONDICIONES AMBIENTALES

Soleado _____ Nublado _____ Lluvioso _____ Otras condiciones _____
 Vegetación de la orilla: _____
 Vegetación dentro del agua: _____
 Exposición: _____ 100% sombra _____ sombra con ventanas
 _____ grandes claros _____ 100% expuestos
 Observaciones: _____

CAUDAL

V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	Vel. m/s
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Prof. (m)

* 0 - 1 m = 0.20 m; 1 - 2 m = 0.25 m; 2 - 4 m = 0.50 m; 4 - 8 m = 1.0 m

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)	Sat. Oxígeno	_____ (%)
Temperatura del agua	_____ °C	Salinidad	_____ (mg/L)
Temperatura ambiental	_____ °C	pH	_____
Sólidos sedimentables	_____ (mg/L)	DBO _(5, 20)	_____ (mg/L)
Conductividad	_____ (μS/cm)	Fosfatos	_____ (mg/L)
Coliformes fecales (NMP/100 ml)	_____ (NMP)	Nitratos	_____ (mg/L)
Secchi	_____ cm	Turbidez	_____ FAU
Cod. Lab.	_____	TDS	_____ (mg/L)

Índice de calidad de agua (ICA) _____ Calidad _____ Color _____

Participantes: _____

Encargado de toma de muestras: _____

Control de emisión

Elaboró: F: Domingo Ujpan Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Flor Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa Reyes Morales Jefe DICA
Fecha: 22/06/2020	Fecha: 22/06/2020	Fecha: 24 Jun 2020



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL

UNIDAD DE MONITOREO AMBIENTAL

BOLETA DE CAMPO

MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA DE RÍOS

Código: B - 3
 Versión: 4
 Emisión: 22/Jun/2020
 Página: 2 de 2

EVALUACIÓN DE CALIDAD DE HÁBITAT

Parámetro	Óptimo	Subóptimo	Marginal	Pobre
1. Heterogeneidad de sustratos disponibles para la epifauna	Más del 70 % del sustrato es estable y puede ser colonizado por la epifauna (el trecho presenta una mezcla de piedras, troncos sumergidos o cualquier otro sustrato estable)	Entre el 40 y 70% del sustrato es estable. Además, existe un sustrato nuevo aun sin condiciones para ser habitado	Entre 20 y 40% del sustrato es estable. Frecuentemente perturbado o removido	Menos de un 20% del sustrato es estable. Ausencia de hábitats adecuados
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1
2. Empotramiento del sustrato	Entre 0 y 25% de la superficie de rocas, piedras y grava está rodeado de sedimento fino	Entre 25 y 50% de la superficie de rocas, piedras y grava está rodeado de sedimento fino	Entre 50 y 75% de la superficie de rocas, piedras y grava está rodeado de sedimento fino	Más de un 75% de la superficie de rocas, piedras y grava está rodeado de sedimento fino
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1
3. Relación profundidad y velocidad	El trecho del río presenta las cuatro combinaciones: a)lento/ profundo b) lento/bajo c)rápido/profundo y d)rápido/ bajo	Solo tres combinaciones. La ausencia de rápido/bajo determina el menor puntaje	Sólo dos combinaciones. La ausencia de rápido/bajo y lento/bajo determina el menor puntaje	Una cosa combinación presente. Usualmente lento/profundo.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1
4. Deposición de sedimentos	Ausencia de istlas o bancos de arena. Menos del 5% del fondo afectado por deposición de sedimentos.	Reciente y escasa formación de bancos de piedra, arena o sedimento fino. Entre 5 y 30% del fondo afectado por deposición de sedimento, ligera deposición en pozos	Deposición moderada de grava, arena o sedimento fino sobre bancos viejos y nuevos. Entre 30 y 50% del fondo afectado. Sedimento sobre obstrucciones, constricciones y recodos. Moderada deposición en pozos	Grandes depósitos de material fino. Muchos bancos. Más del 50% del fondo cambia con frecuencia. Pozos casi ausentes debido a la gran deposición de sedimentos.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1
5. Estado del cause de flujo	El nivel del agua alcanza la base de las márgenes y la exposición del sustrato de fondo es mínima.	El agua sólo cubre el 75% del cauce o menos del 25% del sustrato de fondo queda expuesto.	El nivel del agua cubre entre el 25 y 75% del cauce y queda expuesta la mayor parte del sustrato de los rápidos	Muy poca agua sobre el cauce y la mayoría como pozos.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1
6. Alteración del cauce	Ausencia o mínima presencia de canalización o dragado. Corriente con cauce normal.	Cierta canalización presente por puentes. Evidencia de canalización actual o pasada	Canalización extensiva. Diques u otras estructuras presentes en ambas márgenes. Entre el 40 y 80% del trecho del río canalizado y alterado.	Márgenes protegidas con gabiones o cemento. Más del 80% del trecho del río canalizada y alterado. Los hábitats internos eliminados totalmente.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1
7. Frecuencia de rápidos	Ocurrencia de rápidos relativamente frecuente. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río es < 7 (generalmente 5 o 7).	Ocurrencia de rápidos poco frecuente. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río se encuentra entre 7 y 15.	Ocurrencia ocasional de rápidos. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río se encuentra entre 15 y 25.	Por lo general el agua corre sin interrupción o rápidos muy bajos. La relación distancia entre rápidos y el ancho del río es mayor a 25.
Puntos:	20 19 18 17 16	15 14 13 12 11	10 9 8 7 6	5 4 3 2 1
8. Estabilidad de las márgenes	Márgenes estables. Ausencia de erosión o desprendimientos. Poca posibilidad de problemas futuros. Menos del 5% de la margen está afectada	Estabilidad moderada. Pequeñas áreas de erosión. Entre 5 y 30% de las márgenes del trecho tiene áreas de erosión.	Inestabilidad moderada Entre 30 y 60% de las márgenes del trecho tiene áreas de erosión. Posibilidad de fuerte erosión durante las crecidas.	Inestabilidad completa. Áreas muy erosionadas. Frecuencia de áreas despejadas en trechos rectos y recodos. Entre 60 y 100% de las márgenes del trecho erosionadas.
Puntos:	Margen Izquierda 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
Puntos:	Margen Derecha 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
9. Vegetación protectora de las riberas	Más del 90% de las márgenes y la zona ribereña está cubierta por vegetación nativa incluyendo árboles, arbustos, macrofitas. Vegetación tupida natural.	Entre el 70 y 90% de las márgenes cubiertas por vegetación nativa. Vegetación algo abierta.	Entre el 50 y 70% de las márgenes cubiertas por vegetación nativa. Vegetación abierta.	Menos del 50% de las márgenes cubiertas por vegetación nativa.
Puntos:	Margen Izquierda 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
Puntos:	Margen Derecha 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
10. Amplitud de la vegetación ribereña	Extensión de la vegetación ribereña mayor a 18 m y sin impacto antrópico.	Extensión de la vegetación ribereña entre 12 y 18 m y un mínimo impacto antrópico	Extensión de la vegetación ribereña entre 6 y 12 m y un impacto antrópico evidente.	Extensión de la vegetación ribereña menor a 6 m. Poca o ninguna vegetación debido a un fuerte impacto antrópico.
Puntos:	Margen Izquierda 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0
Puntos:	Margen Derecha 10 9	8 7 6	5 4 3	2 1 0

RBP

Calidad

Color

Control de emisión		
F:	F:	F:
Tec. Sistemas de Información	Encargada de Laboratorio	Elsa Reyes Morales Jefe DICA
Fecha: 22/06/2020	Fecha: 22/06/2020	Fecha: 24 Jun 2020



DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del sitio: _____
Fecha: _____ Hora: _____ ICA valor: _____ Calidad: _____

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Temperatura del agua	_____ °C	Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)
Temperatura ambiental	_____ °C	% Saturación	_____ %
Cambio de temperatura	_____ °C	Coliformes fecales	_____ (NMP)
Fosfatos	_____ (mg/L)	pH	_____
Nitratos	_____ (mg/L)	DBO	_____ (mg/L)
Turbidez	_____ (FAU)	Salinidad	_____ (%)
Sólidos disueltos totales (TDS)	_____ (mg/L)	Conductividad	_____ (µS/cm)

Observaciones: _____

DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del sitio: _____
Fecha: _____ Hora: _____ ICA valor: _____ Calidad: _____

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Temperatura del agua	_____ °C	Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)
Temperatura ambiental	_____ °C	% Saturación	_____ %
Cambio de temperatura	_____ °C	Coliformes fecales	_____ (NMP)
Fosfatos	_____ (mg/L)	pH	_____
Nitratos	_____ (mg/L)	DBO	_____ (mg/L)
Turbidez	_____ (FAU)	Salinidad	_____ (%)
Sólidos disueltos totales (TDS)	_____ (mg/L)	Conductividad	_____ (µS/cm)

Observaciones: _____

DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del sitio: _____
Fecha: _____ Hora: _____ ICA valor: _____ Calidad: _____

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Temperatura del agua	_____ °C	Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)
Temperatura ambiental	_____ °C	% Saturación	_____ %
Cambio de temperatura	_____ °C	Coliformes fecales	_____ (NMP)
Fosfatos	_____ (mg/L)	pH	_____
Nitratos	_____ (mg/L)	DBO	_____ (mg/L)
Turbidez	_____ (FAU)	Salinidad	_____ (%)
Sólidos disueltos totales (TDS)	_____ (mg/L)	Conductividad	_____ (µS/cm)

Observaciones: _____

Participantes: _____

Encargado de toma de muestras: _____

Control de emisión		
Elaboró: F: Domingo Ujpan Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Flor Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa Reyes Morales Jefe DICA
Fecha: 24/06/2020	Fecha: 24/06/2020	Fecha: 24.06.2020



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
UNIDAD DE MONITOREO AMBIENTAL
BOLETA DE CAMPO
MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA DE RÍOS - ICA

Código: B - 4
Versión: 3
Emisión: 24/Jun/2020
Página: 2 de 2

DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del sitio: _____
Fecha: _____ Hora: _____ ICA valor: _____ Calidad: _____

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Temperatura del agua	_____ °C	Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)
Temperatura ambiental	_____ °C	% Saturación	_____ %
Cambio de temperatura	_____ °C	Coliformes fecales	_____ (NMP)
Fosfatos	_____ (mg/L)	pH	_____
Nitratos	_____ (mg/L)	DBO	_____ (mg/L)
Turbidez	_____ (FAU)	Salinidad	_____ (%)
Sólidos disueltos totales (TDS)	_____ (mg/L)	Conductividad	_____ (µS/cm)

Observaciones: _____

DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del sitio: _____
Fecha: _____ Hora: _____ ICA valor: _____ Calidad: _____

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Temperatura del agua	_____ °C	Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)
Temperatura ambiental	_____ °C	% Saturación	_____ %
Cambio de temperatura	_____ °C	Coliformes fecales	_____ (NMP)
Fosfatos	_____ (mg/L)	pH	_____
Nitratos	_____ (mg/L)	DBO	_____ (mg/L)
Turbidez	_____ (FAU)	Salinidad	_____ (%)
Sólidos disueltos totales (TDS)	_____ (mg/L)	Conductividad	_____ (µS/cm)

Observaciones: _____

DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del sitio: _____
Fecha: _____ Hora: _____ ICA valor: _____ Calidad: _____

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Temperatura del agua	_____ °C	Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)
Temperatura ambiental	_____ °C	% Saturación	_____ %
Cambio de temperatura	_____ °C	Coliformes fecales	_____ (NMP)
Fosfatos	_____ (mg/L)	pH	_____
Nitratos	_____ (mg/L)	DBO	_____ (mg/L)
Turbidez	_____ (FAU)	Salinidad	_____ (%)
Sólidos disueltos totales (TDS)	_____ (mg/L)	Conductividad	_____ (µS/cm)

Observaciones: _____

Participantes: _____
Encargado de toma de muestras: _____

Control de emisión		
Elaboró: F: Domingo Ujpan Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Flor Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa Reyes Morales Jefe DICA
Fecha: 24/06/2020	Fecha: 24/06/2020	Fecha: 24.06.2020



MONITOREO DE CAUDALES

Localidad:	Día:	Mes:	Año:
Participantes:			
Hora de inicio:	Fin:	Coordenadas:	
Ancho de Banco:		N:	
Ancho de Cauce:		W:	msnm:

VELOCIDAD EN SECCIONES PARCIALES										
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11

PROFUNDIDAD EN SECCIONES PARCIALES										
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11

Caudal	(L/s)	(m ³ /s)
--------	-------	---------------------

PARAMETROS FÍSICOS			
Temperatura	(°C)	Oxí. Disuelto	(mg/L)
PH		Sat. Oxígeno	(%)
Secchi	(cm)	Salinidad	(%)
Sólidos Totales Disueltos	(mg/L)	Conductividad	(μS/cm)
Nitrógeno Total	(mg/L)	Fosforo Total	(mg/L)
Sólidos Sedimentables	(mg/L)	Cod. Lab.	

Cuadro 1. Espaciamiento de sondeos según el ancho del cauce.

X	ANCHO DE CAUCE (m)		ESPACIO ENTRE SECCIONES (m)	Observaciones:
	De:	A:		
	0	1	0.20	
	1	2	0.25	
	2	4	0.50	
	4	8	1.00	
	8	15	1.50	
	15	25	3.00	
	25	50	3.00	

Fuente: Manual de Hidrología (Herrera Ibáñez, 2011)

Control de emisión		
Elaboró: Natanaél Xamínez Téc. Monitoreo Climático Fecha: 01/10/2019	Revisó: Mingo Ujpán Téc. Sistema de Información Fecha: 02/10/19	Aprobó: Elsa María Reyes Jefe DICA Fecha: 03. Oct. 2019



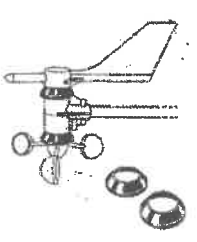
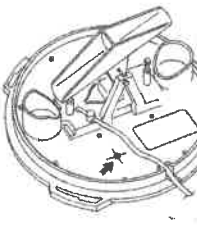
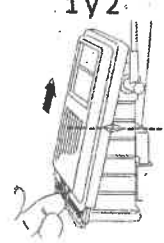
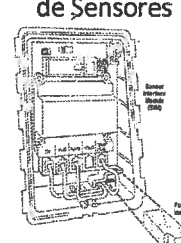
Nombre de la Estación: _____ Día: _____ Mes: _____ Año: _____



Descarga de Datos del: _____ Al _____ Mes: _____

Participantes: _____

Observaciones Generales: _____

Coordenadas: X _____ Y _____ Altitud: _____

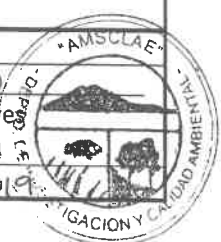
<p>Anemómetro</p> 	<p>Observaciones</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>Limpieza <input type="checkbox"/></p>	<p>Colector de Lluvias</p> 	<p>Observaciones</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>Limpieza <input type="checkbox"/></p>
<p>Paneles Solares 1 y 2</p> 	<p>Observaciones</p> <p>1. _____</p> <p>_____ 2. _____</p> <p>_____</p> <p>1) Limpieza <input type="checkbox"/> 2) Limpieza <input type="checkbox"/></p>	<p>Panel de Conexión de Sensores</p> 	<p>Observaciones</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>Limpieza <input type="checkbox"/></p>

Protectores de Sensores de Temperatura		Limpieza:	Observaciones:
Sensores de Radiación UV & SOLAR		Limpieza:	Observaciones:

Batería 6 Voltios		Limpieza	Panel Solar 6v:	Limpieza:
Batería 3 Voltios ISS		Limpieza	Panel Solar 2v:	Limpieza:
Baterías 1.5 V. Data Logger			Limpieza	

Cambio de Baterías			Funcionamiento		
1.5 v	3. v	6. v	M	R	B

Control de emisión					
Elaboró:		Revisó:		Aprobó:	
Francisco Xamín		Domingo Ujpan		Elsa María Reyes	
Monitoreo Climático		Téc. Sistema de Información		Jefe DICA	
30. Oct. 2019		Fecha: 30. Oct. 2019		Fecha: 31. Oct. 2019	





DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
 UNIDAD DE MONITOREO AMBIENTAL
 BOLETA DE CAMPO
 MONITOREO DEL NIVEL DEL LAGO

Código: B-7
 Versión: 2
 Emisión: 01/Oct/2019
 Página: 1 de 1

ESTACIÓN:	Capitanía y Apostadero	LAGO:	Atitlán
MES:		CUENCA:	Lago de Atitlán
AÑO:		MUNICIPIO:	Panajachel
		DEPTO:	Sololá
		Escala No.	2

No.	Lectura en la mañana		Lectura en la tarde		Promedio	Observaciones
	Hora	Metros	Hora	metros		
1	7:00					
2	7:00					
3	7:00					
4	7:00					
5	7:00					
6	7:00					
7	7:00					
8	7:00					
9	7:00					
10	7:00					
11	7:00					
12	7:00					
13	7:00					
14	7:00					
15	7:00					
16	7:00					
17	7:00					
18	7:00					
19	7:00					
20	7:00					
21	7:00					
22	7:00					
23	7:00					
24	7:00					
25	7:00					
26	7:00					
27	7:00					
28	7:00					
29	7:00					
30	7:00					
31	7:00					
Mínimo			Promedio		Nombre del Observador(a):	
Máximo			Oscilación			

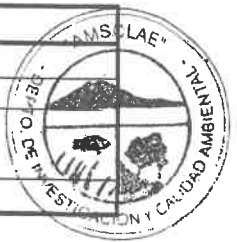


Elaboró:
 Natalael Xamínez
 Jefe. Monitoreo Climático
 30. Oct. 2019

Control de emisión

Revisó:
 Domingo Ujpán
 Téc. Sistema de Información
 Fecha: 30. Oct. 2019

Aprobó:
 Elsa María Reyes
 Jefe DICA
 Fecha: 30. Oct. 2019





DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
 UNIDAD DE CALIDAD AMBIENTAL
 BOLETA DE CAMPO
 MONITOREO DE SALUBRIDAD (CONSUMO HUMANO)

Código: B-9
 Versión: 2
 Emisión: 26/Sep/2019
 Página: 1 de 2


Parámetro	Sitios de muestreo							
Hora								
Fecha								
Coordenadas Y								
Coordenadas X								
P. muestreo (m)								
P. punto (m)								
Oxi. Dis. (mg/L)								
Sat. Oxi. %								
T° (°C)								
Cond (µS/cm)								
TDS (mg/L)								
Salinidad %								
pH								
E. coli (UFC/ 100 ml)								
Col. Tot. (UFC/ 100 ml)								
E. coli (NMP/100ml)								
Col. Tot. (NMP / 100 ml)								
Turbidez (FAU)								
Turbidez (NTU)								
Cloro residual								
Color (PT-Co)								
Dureza (mg/L)								
Calcio (mg/L)								
Hierro (mg/L)								
Magnesio (mg/L)								
Manganeso (mg/L)								
Código Lab.								
Otros								

Participantes _____
 Encargado de tomar la muestra _____

Control de emisión

Elaboró: F: Domingo Ujpan Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Fico Barreno Encargado de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa María Reyes Jefe DICA
Fecha: 26/09/19	Fecha: 30/09/2019	Fecha: 01. Oct. 2019



	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL UNIDAD DE CALIDAD AMBIENTAL BOLETA DE CAMPO MONITOREO DE VEGETACIÓN ACUÁTICA	Código: B - 10 Versión: 3 Emisión: 26/Sep/2019 Página: 1 de 2
	DATOS GENERALES No.: _____ Nombre del sitio: _____ Fecha: _____ Hora: _____ Coordenadas: X: _____ Y: _____	

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS			
Temperatura del agua	_____ °C	pH	_____
Sólidos disueltos totales (TDS)	_____ (mg/L)	Conductividad	_____ (µS/cm)
Oxígeno disuelto	_____ (mg/L)	% Saturación	_____ %
Otras medidas: _____			

CONDICIONES AMBIENTALES			
_____ Soleado	_____ Nublado	_____ Lluvioso	_____ Otro
Observaciones: _____			

ESCALA DE ABUNDANCIA

Escala	Abundancia	Cobertura
1	Rara	Individuos aislados
2	Ocasional	1-10%
3	Frecuente	10-50%
4	Abundante	10-70%
5	Muy abundante	>70%

VEGETACIÓN ACUÁTICA		Inflorescencia		Abundancia				
No.	Especie	Sí	No	1	2	3	4	5
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								

Observaciones: _____

Participantes: _____

Control de emisión		
Elaboró:  Domingo Upan Tec. Sistemas de Información	Revisó:  Flor Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobó:  Elsa Reyes Morales Jefe DICA
Fecha: 26/09/19	Fecha: 30/09/2019	Fecha: 01. Oct. 2019





DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
 UNIDAD DE CALIDAD AMBIENTAL
 BOLETA DE CAMPO
 MONITOREO DE VEGETACIÓN ACUÁTICA

Código: B - 10
 Versión: 3
 Emisión: 26/Sep/2019
 Página: 2 de 2

DATOS GENERALES

No. _____ Nombre del sitio: _____
 Fecha: _____ Hora: _____
 Coordenadas: X: _____ Y: _____

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Temperatura del agua _____ °C pH _____
 Sólidos disueltos totales (TDS) _____ (mg/L) Conductividad _____ (µS/cm)
 Oxígeno disuelto _____ (mg/L) % Saturación _____ %
 Otras medidas: _____

CONDICIONES AMBIENTALES

_____ Soleado _____ Nublado _____ Lluvioso _____ Otro
 Observaciones: _____

ESCALA DE ABUNDANCIA

Escala	Abundancia	Cobertura
1	Rara	Individuos aislados
2	Ocasional	1-10%
3	Frecuente	10-50%
4	Abundante	10-70%
5	Muy abundante	>70%

VEGETACIÓN ACUÁTICA

No.	Especie	Inflorescencia		Abundancia				
		Sí	No	1	2	3	4	5
1				1	2	3	4	5
2				1	2	3	4	5
3				1	2	3	4	5
4				1	2	3	4	5
5				1	2	3	4	5
6				1	2	3	4	5
7				1	2	3	4	5
8				1	2	3	4	5
9				1	2	3	4	5
10				1	2	3	4	5
11				1	2	3	4	5
12				1	2	3	4	5
13				1	2	3	4	5
14				1	2	3	4	5
15				1	2	3	4	5

Observaciones: _____

Participantes: _____

Control de emisión

F: Domingo Ujpan Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Flor Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobo: F: Elsa Reyes Morale Jefe DICA
Fecha: 26/09/19	Fecha: 30/09/2019	Fecha: 01 Oct. 2019





DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
 UNIDAD DE MONITOREO AMBIENTAL
 BOLETA DE CAMPO
 MONITOREO DE PUNTOS DE CONTAMINACIÓN

Código: B - 12
 Versión: 2
 Emisión: 30/Sep/2019
 Página: 1 de 1

DATOS GENERALES

Lugar: _____ Fecha: _____

Participantes: _____

No.	COORDENADAS (GTM)		DIRECCIÓN	TIPO DE PUNTO	CLASIFICACIÓN	No. Foto.	Observaciones
	X	Y					
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							

Observaciones:

Control de emisión		
Elaboró: F: Domingo Ujpán Tec. Sistemas de Información	Revisó: F: Flor Mayarí Barreno Encargada de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa María Reyes Jefe DICA
Fecha: 30/09/19	Fecha: 30/09/2019	Fecha: 01 Oct. 2019



MUESTREO PLANTA DE TRATAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES

Lugar: _____ Fecha: _____ Hora In: _____

Municipio: _____ Depto: _____ Hora F: _____

Coordenadas: _____ Elevación: _____

Administrador PTAR: _____

Parámetro	Unidad								
Físicos									
pH	Unidades pH								
Temperatura	°C								
Conductividad	µS/cm								
Sólidos disueltos totales (TDS)	mg/L								
Sólidos Suspendidos totales	mg/L								
Sólidos Volátiles	mg/L								
Sólidos sedimentables	mg/L								
Turbiedad	FAU								
Color aparente	Uds. Pt-Co								
Color verdadero	Uds. Pt-Co								
Olor a temperatura ambiente	Organoléptico								
Apariencia	Organoléptico								
Materia flotante	A/P								
O2 disuelto	mg/L								
O2 disponible	%								
Químicos									
Nitrógeno total (NT)	mg/L								
Amonio	mg/L NH4+								
Nitratos	mg/L NO3								
Fósforo Total (PT)	mg/L								
Fosfatos	mg/L PO4								
Demanda Química de Oxígeno	mg/L DQO								
DBO5	mg/L								
Microbiológicos									
Coliformes fecales	NMP/100ml								
Otros									
Capacidad y Caudal:	L/s								
TIPO DE MUESTREO	Compuesta:		Horas:		Simple:				
Equipo de muestreo utilizado:									
Participantes:									
Observaciones:									
Encargado de tomar la muestra:									
Para Uso del laboratorio:	Iniciales analista a cargo:		Código de muestra en el Laboratorio:						
Control de emisión									
Elaboró:			Revisó:			Aprobó:			
F:			F:			F:			
	Domingo Ujpan			Flor Barreno			Elsa María Reyes		
	Tec. Sistemad de Información			Encarga de Laboratorio			Jefe DICA		
Fecha:	27/09/19		Fecha:	30/09/2019		Fecha:	01. Oct. 2019		



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
UNIDAD DE CALIDAD AMBIENTAL
BOLETA DE CAMPO

Código: B13
Versión: 2
Emisión: 27/Sep/2019
Página: 1 de 1

MUESTREO PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Lugar: _____ Fecha: _____ Hora In: _____

Municipio: _____ Depto: _____ Hora F: _____

Coordenadas: _____ Elevación: _____

Administrador PTAR: _____

Parámetro	Unidad								
-----------	--------	--	--	--	--	--	--	--	--

Físicos									
pH	Unidades pH								
Temperatura	°C								
Conductividad	µS/cm								
Sólidos disueltos totales (TDS)	mg/L								
Sólidos Suspendidos totales	mg/L								
Sólidos Volátiles	mg/L								
Sólidos sedimentables	mg/L								
Turbiedad	FAU								
Color aparente	Uds. Pt-Co								
Color verdadero	Uds. Pt-Co								
Olor a temperatura ambiente	Organoléptico								
Apariencia	Organoléptico								
Materia flotante	A/P								
O2 disuelto	mg/L								
O2 disponible	%								

Químicos									
Nitrógeno total (NT)	mg/L								
Amonio	mg/L NH4+								
Nitratos	mg/L NO3								
Fósforo Total (PT)	mg/L								
Fosfatos	mg/L PO4								
Demanda Química de Oxígeno	mg/L DQO								
DBO5	mg/L								

Microbiológicos									
Coliformes fecales	NMP/100ml								

Otros									
Capacidad y Caudal:	L/s								

TIPO DE MUESTREO Compuesta: _____ Horas: _____ Simple: _____

Equipo de muestreo utilizado: _____

Participantes: _____

Observaciones: _____

Encargado de tomar la muestra: _____

Para Uso del laboratorio: Iniciales analista a cargo: _____ Código de muestra en el Laboratorio: _____

Control de emisión

Elaboró: F: Donnygo Ujpan Tec. Sistemad de Información	Revisó: F: Flor Barreno Encarga de Laboratorio	Aprobó: F: Elsa María Reyes Jefe DICA
Fecha: 27/09/19	Fecha: 30/09/2019	Fecha: 01-Oct-2019


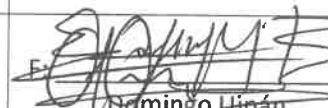





Lugar de Recolección			
Fecha de recolección		Hora de recolección	
Numero de Muestras		Código de Identificación de las muestras	
Descripción de las muestras			
Análisis Solicitados			
Fecha y hora de ingreso al Laboratorio de Calidad de Aguas de la Unidad Analítica de AMSCLAE			
Encargado de recepción y procesamiento y análisis de muestras		Nombre y Firma	
Fecha y hora de entrega y recepción de resultados	Entregado por		Nombre y Firma
	Recibido por		Nombre y Firma
	Recibido por		Nombre y Firma
Resultados			

Se incluye acta: Si No

Control de emisión

Elaboró:	Revisó:	Aprobó:
F:  Flor Mayarí Barreno Encargada de laboratorio	F:  Domingo Ujpan Tec. Sistema de Información	F:  Elsa María Reyes Jefe de DICA
Fecha: 07/10/2019	Fecha: 08/10/19	Fecha: 9 Oct 2019



**FORMULARIOS
REGISTRO DE USO
DE EQUIPO**



AMSCLAE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL

FRE-004

Versión: 1

Fecha: 15/04/2020

Página 1 de 2


FORMULARIO DE REGISTRO

USO Y LLENADO TANQUES DE BUCEO

Equipo	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado
1	Botella de aire Color Amarillo 0038011A										
2	Botella de aire Color Amarillo 00380126										
3	Botella de aire Color Amarillo 00380133										
4	Botella de aire Color Cromado 0038013A										
5	Botella de aire Color Azul OTB-054										
6	Botella de aire Color Azul OTB-053										
7	Vales de llenado										

Observaciones:

Control de emisión

Elaboró: 
F: Flor Mayarí Barreño
Encargada de Laboratorio

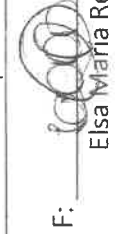


Fecha: 15/04/2020

Revisó: 
F: Flor Mayarí Barreño
Encargada de Laboratorio



Fecha: 15/04/2020

Aprobó: 
F: Elsa María Reyes
Jefe de DICA



Fecha: 15/04/2020



AMSCLAE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL

FRE-004

Versión: 1

Fecha: 15/04/2020

Página 2 de 2

FORMULARIO DE REGISTRO

USO Y LLENADO TANQUES DE BUCEO

Equipo	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado	Actividad / Uso / Llenado
1	Botella de aire Color Amarillo 0038011A									
2	Botella de aire Color Amarillo 00380126									
3	Botella de aire Color Amarillo 00380133									
4	Botella de aire Color Cromado 0038013A									
5	Botella de aire Color Azul OTB-054									
6	Botella de aire Color Azul OTB-053									
7	Vales de llenado									

Observaciones:

Control de emisión

Elaboró: 
 F: Flor Mayari de la Cruz
 Encargada de Labo




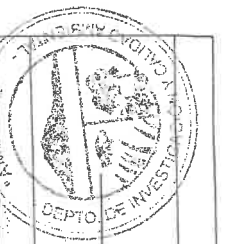
Fecha: 15/04/20

Revisó: 
 F: Flor Mayari de la Cruz
 Encargada de Labo



Fecha: 15/04/20

Aprobó: 
 F: Elsa Maria Reyes
 Jefe de DICA



Fecha: 15/04/20

**FORMULARIOS
REGISTROS
VARIOS**

CUADERNOS DE LABORATORIO

REGISTRO DE INGRESO AL LABORATORIO

RE.1

DEL _____ AL _____

LIMNOLÓGICO

Microbiología, Turbidez, TDS y DBO

L.A.8

DEL _____ AL _____

LIMNOLÓGICO

Nutrientes

L.B.9

DEL _____ AL _____

**PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES**

P.5

DEL _____ AL _____

RÍOS

R.4

DEL _____ AL _____

SALUBRIDAD

S.4

DEL _____ AL _____

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

O.4

DEL _____ AL _____

Biológico

B.1

DEL _____ AL _____

**PLAN
MANTENIMIENTO
DE EQUIPOS**

**FORMULARIO DE
REGISTRO DE
MANTENIMIENTO
DE EQUIPOS**



AMSCLAE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL

LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS

FORMULARIO DE REGISTRO MANTENIMIENTO

EQUIPO DE LABORATORIO

FRM-001

Versión: 1

Fecha: 31/03/2020

Página 1 de 6

Equipo	Inventario	Fecha de mantenimiento	Empresa	Costo	Próximo mantenimiento	Condición del equipo/Observaciones	Repuestos (Si, cuales o no)
1 Agitador Vortex	00229D4C						
2 Agitador Vortex	00382132						
3 Agitador Magnético	0038211C						
4 Autoclave All American	0019817E						
5 Autoclave Raypa	003DA444						
6 Balanza Analítica Ohaus	003B63F7						
7 Balanza Analítica Scientech	001B5174						
8 Balanza Semianalítica Sartorius	0019818B						
9 Baño de agua análogo (baño maría)	00198A73						
10 Baño Ultrasonico Branson	003CE470						
11 Balanza Analítica Ohaus	003B63F7						
12 Balanza Analítica Scientech	001B5174						

Control de emisión

Elaboró:  F: Flor Mayra Encargada de Laboratorio	Revisó:  F: Flor Mayra Encargada de Laboratorio	Aprobó:  F: Elsa María Reyes Jefe de DICA
Fecha: 31/03/2020	Fecha: 31/03/2020	Fecha: 31/03/2020

AMSCLAE - LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS - DICA



AMSCLAE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL

LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS

FORMULARIO DE REGISTRO MANTENIMIENTO

EQUIPO DE LABORATORIO

FRM-001

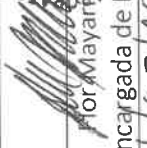
Versión: 1


Fecha: 31/03/2020

Página 2 de 6

Equipo	Inventario	Fecha de mantenimiento	Empresa	Costo	Próximo mantenimiento	Condición del equipo/Observaciones	Repuestos (Si, cuales o no)
13 Bomba de vacío Millipore	0022AFAB						
14 Bomba de vacío Thermo Scientific	LMET-088						
15 Cabezales DBO (Sistema)	003CE4A6						
16 Cabina Termostática DBO	001F5B0B						
17 Cabina Termostática DBO	0037C5CC						
18 Camara Refrigerante GRS-220W	00229D13						
19 Campana de extracción de gases	001D4861						
20 Centrifuga	001DF30A						
21 Control-6 DBO	001F5AD2						
22 Control-6 DBO (Sistema)	001F5ADA						
23 Equipo de prueba de jarras	003BFA4E						
24 Espectrofotometro Genesys	001EA430						

Control de emisión

Elaboró: 
F: Flor Mayra de Barriento
Encargada de Laboratorio

Revisó: 
F: Elsa María Reyes
Jefe de DICA

Fecha: 31/03/2020



Aprobó:

F: 
Elsa María Reyes
Jefe de DICA

Fecha: 31/03/2020



AMSCLAE

DEPARTAMENTO DE INVERSIÓN, CALIDAD AMBIENTAL Y CALIDAD AMBIENTAL
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS
FORMULARIO REGISTRO MANTENIMIENTO
EQUIPO DE CAMPO

FRM-002




Versión: 2

Fecha: 16/01/2024

Página 1 de 3

Equipo	Inventario	Fecha de mantenimiento	Empresa	Costo	Próximo mantenimiento	Condición del equipo/Observaciones	Repuestos (Si, cuales o no)
1	Botella de aire	0038011A					
2	Botella de aire	00380126					
3	Botella de aire	00380133					
4	Botella de aire	0038013A					
5	Equipo de buceo talla S	0030D811					
6	Equipo de buceo talla M	OTB-054					
7	Botella de aire	OTB-054					
8	Equipo de buceo talla L	OTB-053					
9	Botella de aire	OTB-053					
10	Caudalímetro tipo Hélice	003BD8CB					
11	Molinete magnético OTT	002B7FB9					
12	Equipo multiparamétrico Hydrolab DSS	002CABD2					

Control de emisión

Elaboró:	Revisó:	Aprobó:
F:  Elsa María Reyes Encargada de Laboratorio	F:  Mayarí Barreno Encargada de Laboratorio	F:  Elsa María Reyes Jefe de DICA
Fecha: 16/01/2024	Fecha: 16/01/2024	Fecha:





AMSCLAE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL

LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS

FORMULARIO REGISTRO MANTENIMIENTO

EQUIPO DE CAMPO

FRM-002

Versión: 2

Fecha: 16/01/2024

Página 2 de 3

	Equipo	Inventario	Fecha de mantenimiento	Empresa	Costo	Próximo mantenimiento	Condición del equipo/Observaciones	Repuestos (Si, cuales o no)
13	Medidor Multiparamétrico HACH HQ40D	001FC1D0						
14	Sonda de Cond. 5 m	001FC1D0						
15	Sonda de LDO 5 m	OTB-179						
16	Sonda de pH 5 m	OTB-180						
17	Sonda de LDO 30 m	001FC1D0	NO FUNCIONA				No se puede dar de baja por ser accesorio del medidor HACH	
18	Medidor multiparamétrico HACH HQ40D	0037C5CF						
19	Sonda de Cond. 1 m	0037C5CF						
20	Sonda de LDO 1 m	0037C5CF						
21	Sonda de pH 1 m	0037C5CF						
22	Dron	004499C6						
23	Piezómetro	0054803F						
24								

Control de emisión

Elaboró:

F: Flor Mayarí Barreno
Encargada de Laboratorio

Fecha:

Revisó:

F: Flor Mayarí Barreno
Encargada de Laboratorio

Fecha:

Aprobó:

F: Elsa María Reyes
Jefe de DICA

Fecha:





AMSCLAE

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUAS
FORMULARIO DE REGISTRO MANTENIMIENTO
OTROS EQUIPO

FRM-003
Versión: 1
Fecha: 14/04/2020
Página 1 de 1

Equipo	Inventario	Fecha de mantenimiento	Empresa	Costo	Próximo mantenimiento	Condición del equipo/Observaciones	Repuestos (Si, cuales o no)
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							

Control de emisión

Elaboró: F: Flor Mayarí Barreño Encargada de Laboratorio	Revisó: F: Elsa María Reyes Jefe de DICA	Aprobó: F: Elsa María Reyes Jefe de DICA
Fecha: 14/04/2020	Fecha: 14/04/2020	Fecha: 14/04/2020

Handwritten mark resembling a stylized '2' or '3' with a horizontal stroke.

Handwritten mark resembling a hook or a short curve.

Handwritten mark resembling a hook or a short curve.

Handwritten mark resembling a hook or a short curve.

Handwritten mark resembling a hook or a short curve.

Faint handwritten marks, possibly a small '2' and a '1'.

Faint handwritten marks, possibly a small '2' and a '1'.