



KFW



## ESTUDIO DE PRE FACTIBILIDAD LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL BICA

BENEFICIARIO: FONDO DEL SISTEMA ARRECIFAL  
MESOAMERICANO  
(SAM)

ELABORADO POR: DIXY JAVIER ÁVILA

DICIEMBRE DE 2015

INDICE	Página No.
I. Resumen -----	1
II. Introducción -----	1
III. Justificación -----	2
IV. Objetivos -----	2
V. Estudio Técnico -----	3
Localización del Proyecto -----	3
Tecnología a Utilizar -----	3
Ingeniería del proyecto -----	3
Costos de Inversión -----	4
Costo aproximado de Infraestructura requerida -----	4
Aspectos Administrativos y organizativos -----	4
Marco Legal y su presupuesto para la Apertura del Laboratorio -----	4
Autorizaciones/Permisos -----	4
Evaluación Financiera -----	6
Presupuesto para Equipamiento -----	6
Monto de Inversión total inicial, del proyecto -----	6
Personal Técnico a contratar -----	7
Monto de Inversión Fijo Mensual -----	7
Estudio de Mercado -----	8
Características del Cliente -----	9
Mercado Actual -----	9
Análisis de Demanda E Ingresos de Sostenibilidad del Proyecto -----	9
Estrategias de comercialización del servicio -----	10
Medidas Medio ambientales -----	10
Conclusiones -----	10
Bibliografía Consultada -----	12
Anexo 1 (aspectos económicos, analíticos, legales y de inversión de los parámetros a analizar -----	12
Anexo 2 (Listado de equipos, materiales y reactivos) -----	13

Anexo 3 (Proveedores Internacionales de Equipo de Laboratorio) -----	16
Anexo 4 (Costos de Operación: Determinación de Costos de análisis a Realizar) -----	17
Anexo 5 (Descripción de Métodos Analíticos) -----	31
Anexo 6 (Plano del área disponible para laboratorio) -----	71

## **I. Resumen:**

Con el interés de establecer y generar capacidad analítica a través del establecimiento de un laboratorio de análisis físico químicos y bacteriológico, en la matriz agua potable, aguas residuales y aguas superficiales naturales. Ubicándolo específicamente en la isla de Roatán. El siguiente estudio de pre-factibilidad describe los componentes de inversión inicial, potenciales clientes, equipo, materiales, insumos, métodos analíticos, costos por análisis, personal a contratar y la infraestructura; necesarios para iniciar el proceso de prestación de servicios analíticos a la población en general; que lo soliciten en la zona insular.

La visión general de este proyecto laboratorial es generar una herramienta analítica de vigilancia y de monitoreo ambiental, fortaleciendo de esta manera la mejora continua de las condiciones de vida de los ciudadanos y la protección de los recursos medio ambientales.

Todas las capacidades antes mencionadas se fundamentarán inicialmente en el análisis de los siguientes parámetros: Nitratos, Nitritos, amonía, Fosfato, Enterococos Fecales, Coliformes Totales y Coliformes Fecales o Termotolerantes. De los cuales se describe el método analítico, materiales, insumos, equipo, espacio físico y personal a contratar.

## **II. Introducción:**

El presente estudio de pre-factibilidad para la instalación de un laboratorio analítico medio ambiental, muestra y describe el análisis de costos basado en los requerimientos de reactivos analíticos, equipo, materiales, etc.; esto basado en los métodos analíticos de USEPA (Agencia Ambiental de los Estados Unidos de Norte América), por sus siglas en ingles. Para los parámetros antes mencionados, los cuales también están descritos metodológicamente según el Estándar Métodos, la guía analítica Internacional.

Para la determinación del precio unitario por análisis se empleó una hoja de cálculo, la cual contempla gastos fijos, gastos variables, consumibles, depreciación de equipos, mano de obra, otros; determinando de forma bastante precisa el valor justo y el margen de ganancia adecuado por análisis ofertado. Así mismo se explica la mano de obra a contratar con sus salarios promedios correspondientes; el número de personal a contratar se consideró de acuerdo al número de parámetros a analizar y número de unidades laboratoriales.

Respecto a los permisos y/o autorizaciones citados, se cuantificó un valor económico de acuerdo a los requisitos necesarios para obtener cada uno de ellos, solicitados por las diferentes autoridades nacionales y locales que regulan este tipo de actividades analíticas. Finalmente se contabiliza el monto total en lempiras y en dólares de inversión total para la instalación del laboratorio analítico pretendido, consideran valor de insumos, equipo, infraestructura, permisos/autorizaciones, capacitaciones de personal, etc. Se anexan los listados de equipo e insumos además de los nombres y direcciones electrónicas de los proveedores nacionales e internacionales.

### **III. Justificación:**

Actualmente en la Isla de Roatán un gran volumen de agua residual es descargado en diversos puntos que sirven como cuerpos receptores. En la mayoría de casos esta agua residual no cuenta con un tratamiento adecuado, en otros casos incompletos, hasta llegar a tratamiento inexistente. Todo esto convierte a estas descargas en puntos de origen de contaminación físico, químicos y biológicos para los diversos ecosistemas terrestres y acuáticos existentes en esta zona.

Dentro de las fuentes de contaminación se registran urbanizaciones, domicilios, Hoteles, Industria Pesquera, entre otros. Los cuales deben medir o cuantificar sus aportes desde el punto de vista orgánico, nutrientes y factores biológicos patogénicos; los cuales degradan el recurso hídrico y los medios biofísicos anexos a ésta matriz. La medición o cuantificación es requerido para dar cumplimiento a la normativa nacional que regula este tipo de vertidos a sus cuerpos receptores. Así mismo ocurre en el monitoreo de la calidad del agua potable consumida por la población servida por este recurso; la cual se debe analizar para demostrar su calidad; asegurando una dotación de agua potable con las condiciones apropiadas, a los pobladores de la isla.

En el departamento Insular no existe actualmente capacidad analítica instalada desde el punto de vista de parámetros ambientales. (Nitrógeno, fosforo, Coliformes Fecales, Enterococos, etc.). Lo cual dificulta la vigilancia y monitoreo ambiental desde el punto de vista de descarga de aguas residuales y además la determinación del estado de degradación ambiental de cuerpos de agua con importancia ecológica-ambiental o ecosistemas con protección especial.

### **IV. Objetivos:**

#### **Objetivo General:**

Describir los componentes básicos de un estudio de pre factibilidad para el proyecto Laboratorio de análisis en parámetros ambientales; considerando aspectos técnicos, insumos, equipo, personal a contratar, infraestructuras, permisos y/o autorizaciones, estudio de mercado y lineamientos financieros.

#### **Objetivos Específicos:**

- Mostrar de forma cuantitativa aproximada, los potenciales clientes que contratarían el servicio analítico.
- Explicar aspectos económicos de inversión inicial (equipo, materiales, insumos, personal a contratar, costos por análisis, espacio físico, Infraestructura, otros); determinando el costo beneficio y la auto sostenibilidad económica del proyecto. Detallando cada uno de los métodos analíticos correspondientes a cada parámetro, según Estándar métodos, la guía analítica acreditada.

- Describir los métodos analíticos con su correspondiente equipo necesario a adquirir, para los parámetros de Nitratos, Nitritos, amonia, Fosfato, Enterococos, Coliformes Totales y Coliformes Fecales.
- Identificar los permisos y/o autorizaciones a solicitar con sus costos aproximados, previo al inicio de operaciones del proyecto (Licencia ambiental, permiso de operaciones, etc.).

## **Acrónimos**

**DECA:** Departamento de Evaluación y Control Ambiental; adscrito a SERNA.

**SERNA/MI AMBIENTE:** Secretaria de Energía, Recursos Naturales, Ambiente y Minas.

**PSA:** Prestador de Servicios Ambientales, registrado en DECA/SERNA/MI AMBIENTE

**BICA:** Bay Island Conservation Asociation

## **V. Estudio Técnico:**

- 1. Localización del Proyecto:** El proyecto Laboratorio de análisis en muestras ambientales, pretende instalarse como un anexo al edificio existente del proyecto "Sandy Bay Environmental and Community Center" de Bay Island Conservation Asociation (BICA); ubicado en la comunidad de Sandy Bay en el Municipio de Roatán departamento de Islas de la Bahía, Honduras C.A.
- 2. Tecnología a Utilizar:** En el anexo 4 se describe a detalle los métodos analíticos con su correspondiente procedimiento, insumos, reactivos y su correcta preparación; Todos los métodos analíticos fueron descritos en base a la referencia del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22nd Edition, la guía analítica aceptada por la Legislación Nacional de Honduras; además en el **anexo 2** se visualizan los listados de equipo tecnológico, reactivos e insumos a utilizar.

### **3. Ingeniería del Proyecto:**

#### **▪ Infraestructura Requerida**

Área de Laboratorio microbiológico (16 m<sup>2</sup>)

Área de Laboratorio de Aguas (16 m<sup>2</sup>)

Área de almacén (6 m<sup>2</sup>)

Cuarto de balanzas (4 m<sup>2</sup>)

**Una edificación Total de 42 metros cuadrados.**

#### 4. Costos de Inversión

##### Costo aproximado de infraestructura Requerida:

Utilizando un precio promedio base de setecientos (700.00) Dólares Americanos por cada metro cuadrado de construcción en madera; considerando que con ese valor unitario por metro cuadrado incluye acabados, pintura y techo.

**Tabla 1. Precio unitario y Total, del área a construir.**

Total m <sup>2</sup> de construcción	Costo unitario por m <sup>2</sup> de construcción en madera, Dólares Americanos.	Total Dólares
<b>42 m<sup>2</sup></b>	<b>USD 700.00</b>	<b>29,400.00</b>

Actualmente se cuenta con un área de terreno de 160 metros cuadrados, de los cuales se deberán destinar o ampliar, 42 metros cuadrados para el espacio físico del laboratorio.

#### 5. Aspectos Administrativos y Organizativos:

Será necesario un Jefe o gerente de laboratorio, quien asumirá la responsabilidad del control de calidad, confidencialidad de sus clientes y la veracidad de los resultados de análisis; a través de su firma y sello de la institución avaladora de dicho servicio (Empresa, Colegio Profesional, otro). El gerente deberá tener conocimiento básico en análisis de laboratorio, específicamente en los parámetros descritos en el presente estudio o en todo caso deberá ser capacitado en los temas correspondientes. El gerente de laboratorio puede ser el Representante Legal del proyecto, o la persona que él designe; esta situación legal la determinaran con la ayuda del abogado o apoderado legal del proyecto.

#### 6. Marco Legal y su presupuesto para la Apertura del Laboratorio:

##### Autorizaciones/Permisos

- Permiso de Operaciones (Alcaldía municipal de Roatán), costo del permiso L. 5,000.00
- Licencia Ambiental (DECA/SERNA): según tabla de categorización ambiental de DECA/SERNA, los laboratorios de análisis ambiental se encuentran en categoría 3, pero al ubicarse en áreas protegidas automáticamente suben una categoría, por lo tanto este proyecto será categoría 4; debido a que el departamento insular posee declaratoria de Parque Nacional. Pero se recomienda que BICA envíe una solicitud al ministro de la SERNA para bajar la categoría a 3 debido a las siguientes consideraciones:

1. Que el laboratorio será manejado por BICA co-manejador del Parque Nacional Marino Islas de la Bahía y el mismo se utilizará para dar continuidad al monitoreo de calidad de agua que ya se lleva a cabo dentro del programa de monitoreo del co-manejador.
2. Que el programa cumple una función importante y contribuye en la toma de decisiones en temas de manejo para los ecosistemas marinos.
3. Además de que contribuirá en la documentación técnica de casos de contaminación en la isla.

#### **Requisitos para proyectos de Categoría 4:**

1. Apoderado legal del proyecto autorizado con carta poder autenticada para su representación legal durante todo el proceso de licenciamiento. (L 30,000.00)
2. Estudio de Evaluación de Impacto Ambiental (EIA). (L. 150,000.00) Estudio realizado por un prestador de servicios ambientales.
3. constancia de la Unidad Municipal Ambiental, en la cual mencione que el proyecto no ha iniciado operaciones.
4. recibo de pago por solicitud de licencia ambiental (350.00 \$ US)
5. Pago por emisión de Licencia Ambiental (6 salarios mínimos)

**Total en lempiras por obtención de licencia ambiental bajo la categoría 4: considerando L. 10,000.00 por imprevistos suma un total de doscientos cuarenta mil lempiras exactos (L. 250,000.00).**

La categoría 4 es debido a la ubicación del proyecto en una área protegida, como lo es el Departamento insular; para bajar el proyecto a categoría 3, se debe hacer una solicitud dirigida el Ministro de SERNA/Mi Ambiente, él tiene la potestad de hacerlo, para realizar la solicitud de licencia ambiental bajo esa categoría.

Al iniciar con el proceso de licenciamiento ambiental, se deberá contratar los servicios de un Prestador de Servicios Ambientales (PSA), registrado en DECA/SERNA, él dará todos los lineamientos y redactara todos los documentos y/o estudios ambientales, para realizar la solicitud y seguidamente la obtención de la correspondiente Licencia Ambiental.

#### **Requisitos para proyectos de categoría 3**

- Solicitud presentada por el Apoderado Legal en papel blanco tamaño oficio. (Redactada por Apoderado Legal del proyecto).
- Formulario SINEIA F02 completado por el prestador de servicio debidamente registrado ante la SERNA. (Realizado por el Prestador de Servicios Ambientales).



- Plan de Gestión ambiental, acompañado de una copia digital. (Realizado por el Prestador de Servicios Ambientales).
- Carta Poder debidamente autenticada o Instrumento Público contentivo de poder general o especial.
- Documento de constitución de sociedad de comerciante individual o personaría jurídica
- Título de propiedad, debidamente timbrado y registrado/ Contrato de arrendamiento del lugar donde se va desarrollar el proyecto.
- Monto de inversión del proyecto en detalle.
- Recibo por expedición de Licencia Ambiental. Formato de SEFIN TGR1.
- Recibo de pago de inspección (Fondo Rotatorio de DECA, BANADESA, Cuenta No 02-001-000131-0). Valor 350.00 USD.
- Cuenta No 02-001-000131-0). Valor 350.00 USD.
- Publicación del aviso de presentación de la solicitud en un octavo de página en el diario de mayor circulación. La publicación tiene una validez de 5 días hábiles.
- Toda fotocopia debe presentarse debidamente autenticada.

**Total en lempiras por obtención de licencia ambiental bajo la categoría 3: considerando L. 10,000.00 por imprevistos suma un total de ciento ochenta mil lempiras exactos (L. 180,000.00).**

#### **7. Evaluación Financiera:**

- **Presupuesto para Equipamiento:**

En el **anexo 2** se visualiza el listado de equipos, materiales y reactivos, con sus cantidades necesarias y los valores unitarios en lempiras y en Dólares, para lograr la capacidad analítica propuesta en los objetivos. Las empresas nacionales proveedoras, cotizantes se denominan:

- Empresa SYMMAG [www.symmag.co](http://www.symmag.co) Telefax: (504) 2516-1241
- Empresa LABTECH <http://1331.hn.all.biz/> Tel: (504) 2550-2374

**Tabla 2. Monto de Inversión total inicial, del proyecto.**

<b>Inversión Inicial</b>	<b>Monto en Lempiras</b>	<b>Monto en Dólares</b>
Equipo	1,521,328.40	68,435.83
Materiales/Instrumentos	94,249.91	4,239.76
Reactivos	133,462.29	6,003.7
Infraestructura	653,562.00	29,400.00

Autorizaciones/permisos	270,000.00	12,145.75
Capacitación del personal técnico	60,000.00	2,699.05
<b>Total de Inversión inicial.</b>	<b>2,732,602.6</b>	<b>122,924.09</b>

Todos los montos de inversión calculados, tienen incluido el 15% de ISV; en caso de poseer exención fiscal, se deberá restar este valor del 15%, a cada monto calculado. Además en caso de lograr categorizar el proyecto en categoría 3, se tendrá una reducción de 70,000 lempiras en el presupuesto de Autorizaciones/Permisos; reduciendo automáticamente ese valor al total de inversión inicial.

▪ **Personal técnico a contratar:**

- a. Un analista Laboratorial con nivel académico universitario (Biólogo, Microbiólogo, Químico farmacéutico, ingeniero químico, carreras afines). Salario promedio L. 30,000.00
- b. Un técnico de laboratorio con nivel académico intermedio como mínimo (Bachiller en ciencias y letras, otra carrera técnica afín). Salario promedio 15,000.00
- c. Un auxiliar de laboratorio, con nivel académico escuela primaria como mínimo. Salario promedio mensual, salario mínimo. En promedio 8,000.00 lempiras.

Es posible iniciar el laboratorio con dos personas contratadas, un analista laboratorial y el técnico de Laboratorio, lo cual reduciría el costo fijo mensual. A medida aumente la demanda en análisis se procederá a contratar un auxiliar de laboratorio.

Capacitaciones al personal contratado: el personal deberá ser capacitado referente a la aplicación de los métodos analíticos a implementar en el laboratorio, referente a cada método. La capacitación referente a los métodos analíticos deberá ser impartida por personal con experiencia en el tema. Aproximadamente se requieren L. 60,000.00 para capacitar el personal contratado.

Capacitaciones al personal:

- a). Metodologías analíticas en los Parámetros descritos
- b). Control de Calidad en el laboratorio
- c) Curso básico de Metrología

**Tabla 3. Monto de Inversión Fijo Mensual**

<b>Monto Inversión Mensual</b>	<b>Monto en Lempiras</b>	<b>Monto en Dólares</b>
<b>Monto de Inversión Mensual fijo (salarios). Con 3 empleados</b>	<b>53,000.00</b>	<b>2,384.16</b>

<b>Monto de Inversión Mensual fijo (salarios). Con 2 empleados</b>	<b>45,000.00</b>	<b>2,024.29</b>
--	------------------	-----------------

## **8. Estudio de Mercado:**

### **Características del Cliente:**

Según análisis de las características de los potenciales clientes, en base a la aplicación de encuestas aplicadas en su mayoría al sector hotelero y turístico, áreas comerciales y en minoría a personas en general que se ubicaron al azar, las cuales arrojaron los siguientes datos porcentuales:

- Del total de encuestados (19 encuestas), el 32% ha realizado por lo menos alguna vez, respecto al 68% que nunca ha realizado un solo análisis de agua.
- Del 100% de los que sí han realizado análisis de agua (6 encuestados), el 67% lo ha realizado en muestras de agua potable, un 33% en agua de pozo, 50% en agua residual y un 17% en agua marina.
- Referente a los lugares donde se han enviado las muestras analizadas por los encuestados; el 17% envía muestras a la ciudad de Tegucigalpa, un 67% a San Pedro Sula y un 33% han analizado en la isla de Roatán, aclarando que los parámetros analizados en Roatán corresponden específicamente a coliformes.
- Respecto a la frecuencia de realización de análisis el 50% lo realizan anualmente, un 17% trimestral, otro 17% semestralmente y de igual manera otro 17% lo realiza mensualmente.
- Del total de los encuestados que realizan análisis en agua el 100% de ellos realiza análisis de tipo bacteriológicos y un 67% de ellos realiza análisis físico-químicos.
- Con referencia a la oferta analítica instalada en la Isla, el 74% de los encuestados afirmaron que aumentarían su frecuencia de análisis, respecto al 26% que no aumentarían su frecuencia de análisis; quedando evidenciado que se ahorrarían tiempo y dinero analizando sus muestras en la Isla.
- Sobre el conocimiento de las Normativas Hondureñas para la obligatoriedad de realizar análisis en agua, solamente el 37% conoce la Norma y el resto que corresponde al 63% desconocen las Normas Técnicas para la calidad del agua. Dejando evidenciado que se debe fortalecer el tema de legislación ambiental en el tema agua, en la zona Insular; logrando de esta manera aumentar el número de clientes que contrataran el servicio analítico.
- El 100% de encuestados (19) consideran la necesidad de instalar un laboratorio de análisis en parámetros ambientales, en la isla de Roatán, en la matriz agua.

## 9. Mercado Actual:

- Actualmente en la isla de Roatán se registran aproximadamente 50 proyectos bajo licenciamiento ambiental, los cuales analizan en promedio dos tipos de muestras de agua, una muestra de agua residual y otra muestra de agua potable. Generalmente la autoridad ambiental solicita los análisis de agua residual y potable cada 4 meses, lo que representa un total de 25 muestras mensualmente. Además hay que considerar que de estos proyectos se encuentran algunas embotelladoras de agua purificada, con quienes se podría pactar análisis diarios, semanales o mensuales con alta frecuencia, como parte del control de calidad de estos procesos industriales, sumando un valor de 16 muestras mensuales adicionales.
- Hay que considerar la cantidad de pozos perforados en la isla, para la extracción de agua dulce, ya sea de tipo privado o comunitario, los cuales se convierten en clientes potenciales. Los cuales podrían sumar aproximadamente 7 muestras mensualmente.
- Las embarcaciones pesqueras, turísticas, de carga, etc., que poseen plantas de tipo paquete potabilizadoras de agua, podrían aportar muestras para análisis, esto con el objetivo de determinar su eficiencia en la potabilización.
- Desde el punto de vista de monitoreo ambiental, es posible pactar un plan de monitoreo de la calidad de agua de playas con elevada afluencia de turistas, con las empresas hoteleras y la autoridad municipal. Lo cual aportaría una cantidad de muestras mensualmente.
- Desde la perspectiva de conservación ecológica, se poseerá la capacidad de realizar vigilancia en las condiciones físico químicas del agua en línea de costa y en el medio costero arrecifal, lo cual ayudará a la toma de decisiones para regular las actividades que causen mayor degradación a los recursos marino costeros. Identificando las fuentes de contaminación terrestres que aporten nutrientes, organismo patógenos; que afectan el medio marino. Cuyos costos económicos del monitoreo serán subsidiados por la capacidad analítica instalada. Dando cumplimiento a una de las actividades primordiales de la organización BICA, la cual tiene un valor económico incalculable en este momento.

## 10. Análisis de Demanda E Ingresos de Sostenibilidad del Proyecto:

Con todo lo antes mencionado se tiene asegurado en promedio 40 muestras mensuales, según análisis de costos se obtiene una ganancia promedio de 900 lempiras por muestra, realizando todos los análisis descritos anteriormente en cada muestra, asegurando un ingreso mensualmente de lempiras **36,000.00**. Lo cual no cubriría el gasto mensual fijo correspondiente a los salarios que es de **53,000.00** lempiras correspondientes a 3 empleados; y **45,000.00** correspondiente a 2 empleados. Esta situación podría verse superada aproximadamente en un 20% del valor monetario generado mensualmente (L. 36,000.00); en caso de viabilizar las actividades descritas en los numerales 3,4 y 5 antes descritos.

Además se deberá considerar la capacidad analítica disponible para labores de monitoreo medio ambiental y ecológico de los ecosistemas con importancia de conservación, en la zona, que es difícil darle un valor económico pero si el valor agregado del apoyo a la vigilancia y conservación ambiental, por parte de esta capacidad analítica.

#### **11. Estrategia de Comercialización del Servicio:**

- Es importante asegurar esas alianzas estratégicas de monitoreo ambiental, para asegurar el número de muestras a analizar mensualmente, previo al inicio de la inversión inicial del laboratorio analítico, para asegurar dicha inversión. Esto es posible lograrlo a través de reuniones con las gerencias de los diferentes proyectos y/o empresas que tienen la necesidad o el requerimiento de realizar análisis ambientales.
- Con la inversión económica, el equipamiento, infraestructura, etc., antes descrita es posible realizar otros parámetros medio ambientales (potencial de hidrogeno, E. coli, solidos sedimentables, fosforo total, fluoruros), con una mínima inversión; ampliando de esta manera el margen de servicios analíticos y así mismo el margen de ganancias.

#### **12. Medidas medio-ambientales:**

- **Medidas de Control Ambiental:**  
Es importante explicar que en la estructura del Estudio de Impacto Ambiental (EIA) en proyectos categoría 4; o en los estudios FO3 correspondientes a proyectos categorías 3, que es el documento central para la obtención de la correspondiente Licencia Ambiental del proyecto en cualquiera de ambos casos, se encuentran las herramientas y/o formatos de identificación de impactos ambientales, significancia, frecuencia, nivel de impacto, medidas de mitigación, etc.; para cada uno de estos impactos identificados. Así mismo existe la estructura para la redacción de un plan de Gestión Ambiental íntegro y completo correspondiente al proyecto; así mismo se debe incluir todos los planos constructivos a detalle de la infraestructura de necesaria para el proyecto.

#### **13. Conclusiones:**

- Referente a la factibilidad de la inversión en el laboratorio de análisis, se debe considerar que inicialmente no se recuperarán los gastos fijos mensuales o salarios del personal; pero a medida se vayan desarrollando las acciones antes mencionadas, gradualmente se irá alcanzando mayor prestación de los servicios analíticos y a la vez mayor ingreso económico hasta alcanzar los valores deseados.
- La inversión inicial en el laboratorio de análisis ambiental es factible, en primer lugar porque no existe una prestación de servicios de este tipo, en la isla ni en las ciudades más cercanas. Además la población de todo el departamento insular requiere cada vez más este tipo de servicios, porque la nueva legislación ambiental Hondureña, lo requiere.

- Referente al monto de inversión inicial del proyecto, en base a la demanda de servicios analíticos calculada, el retorno o recuperación del total de inversión inicial; en promedio sería recuperada en un tiempo de 4 años.
- El terreno donde se ubicará el laboratorio, será adquirido en condición de donación o concesión, para BICA y Fundación Sol; dicho terreno y su infraestructura serán destinados solo para actividades afines que desarrollan las dos ONGs. El terreno no podrá ser vendido, donado o concesionado a terceros.
- El prestador de servicios ambientales contratado, dará toda la asesoría técnica necesaria para obtener las autorizaciones correspondientes, licencia ambiental, permiso de operaciones, así como los estudios técnicos solicitados por ley para obtener los permisos mencionados.
- El Gerente de laboratorio será la persona que asumirá la responsabilidad, a través de su firma, junto a la firma del analista de laboratorio, estampadas en el informe de resultados de análisis de laboratorio; emitidos por cada muestra analizada.
- La gerencia o gerente de laboratorio, no debe ser un especialista en análisis de laboratorio, pero debe garantizar la capacitación y especialización continua de sus analistas y técnicos de laboratorio, además de supervisar y garantizar que se cumplan los controles de calidad, en los procedimientos analíticos.
- Las capacitaciones del personal en el tema de procedimientos analíticos, es posible realizarla a través de pasantías en un laboratorio reconocido, de análisis en muestras ambientales; o contratar personal con un determinado nivel de experiencia en el tema.

#### 14. Bibliografía Consultada

- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th.edition, 1998.
- Esparza, María Luisa C. de. Procedimientos simplificados de análisis químicos de aguas residuales. CEPIS, Lima, 1995.
- CEPIS. Manual de control de calidad analítica. Lima; CEPIS; 1999.
- EPA. Methods for chemical analysis of water and wastes. EPA/600/4-79/020, March 1983.
- MERKC. Reactivo de productos químicos Darmstadt, Alemania 1999/2000.
- Hach Company. Manual del espectrofotómetro de laboratorio modelo DR/3, 1982.
- UVIKON spectrophotometer 922 user manual, April 1994.

### Anexo 1

**Tabla 4. Métodos analíticos considerados por la Norma Técnica Nacional para el Agua Potable y de la Descarga de aguas Residuales a cuerpos receptores y Alcantarillado Sanitario.**

<b>Parámetro</b>	<b>Métodos</b>	<b>Normativa</b>
Nitratos	Ultravioleta (4500-NO3-B) Cromatografía de Iones (4500-NO3-C) Electrodo específico (4500-NO3-D) Reducción Cadmio (4500-NO3-E) Reducción Cadmio automático (4500-NO3-F) Reducción cloruro titano (4500-NO3-G) Reducción Hidrazina-automático (4500-NO3-H)	Norma agua potable
Nitritos	Colorimétrico (4500-NO2-B) Cromatografía de Iones (4500-NO2-C)	Norma agua potable
Amonio	Destilación preliminar (4500-NH3-B) Nesslerización (4500-NH3-C) Fenato (4500-NH3-D) Titulación (4500-NH3-E) Electrodo específico (4500-NH3-F) Elec. Esp. Adición patrón (4500-NH3-G) Fenato Automático (4500-NH3-H)	Norma aguas residuales
Fosfato	Colorimétrico de azul de molibdeno	Norma agua potable

	Cloruro estañoso Digestión con persulfato	
Coliforme Fecal	Tubos Múltiples de fermentación (9221) Filtro membrana (9222)	Norma agua Residual
Coliforme Total	Tubos múltiples de fermentación (9221) Filtro Membrana (9222)	Norma agua potable
Enterococos Fecales	Tubos múltiples Membrana de filtración	No contemplados por Norma Técnica

**Tabla 5. Tabla comparativa de los métodos Microbiológicos, aspectos económicos, analíticos, legales y de inversión.**

Parámetro/Método	Inversión Inicial en Lempiras.	Costo de operación de análisis por análisis en lempiras	Tiempo de análisis	Situación Legal del método
Coliformes Totales y Termotolerantes/Tubos Múltiples.	120,000.00	716.30	48 horas	Citado por la Norma Técnica Nacional.
Coliformes Totales y Termotolerantes/Membrana de filtración.	120,000.00	955.13	48 horas	Citado por la Norma Técnica Nacional.
Coliformes Totales y Termotolerantes/método Coliler.	175,000.00	450.00	6 horas	No considerado por la Normativa Nacional
Enterococos Fecales/ Método Membrana de Filtración.	120,000.00	988.00	48 horas	Citado por la Norma Técnica Nacional
Enterococos fecales/ Método Enteroler.	175,000.00	800.00	6 horas	No considerado por la Normativa Nacional.

## Anexo 2

**Tabla 6. Listado de equipos, materiales y reactivos, con sus cantidades necesarias y los valores unitarios en lempiras y en Dólares.**

Equipo	Cantidad	Precio Lempiras	Valor Total
Incubadora Bacteriológica	1	5,500.00	
Campana UV	1	201,500.00	
Bomba de vacío	1	2,000.00	
Medidor de pH	1	37,800.00	



Termómetro	1	800.00	
Estereoscopio	1	85,000.00	
Horno de calor seco	1	11,500.00	
Autoclave	1	237,000.00	
Plato agitador/calentador	1	12,600.00	
Refrigerador	1	10,300.00	
Destilador de agua	1	10,000.00	
Desionizador	1	123,000.00	
Kitasatos	1	774.00	
Lámpara luz azul	1	3,296.00	
Unidades de filtración	1	4,665.00	
Balanza analítica	1	11,750.00	
Espectrofotómetro de 220 a 274 nm	1	350,000.00	
Estufa	1	740.00	
Campana de gases	1	325,000.00	
Destilador Rapidstill	1	88,000.00	
Mechero bunsen	1	103.40	
<b>Sub total Lempiras</b>		<b>1,521,328.40</b>	
<b>Materiales/Instrumentos</b>			
Tubos de ensayo	100	1,220.00	
Asas de 2 ml	2	150.00	
Capsulas de Petri desechables (50x9 mm)	500	1,800.00	
Membranas de filtración	100	6,000.00	
Agitador magnético	3	360.00	
Frascos para tomas de muestra	10	460.00	
Frascos de dilución (160 ml)	10	1,600.00	
Campanas de Durham	144	1,220.00	1,220.00
Pinzas sin dientes borde plano	2	1,740.00	1,740.00
Pipetas de acero inoxidable	1	1,265.00	1,265.00
Perilla de hule (3 salidas)	2	660.00	660.00
Pipeta volumétrica de 2 ml	6	2,867.00	2,867.00
Pipeta volumétrica calibrada de 2 ml	6	3,100.00	3,100.00
Pipeta volumétrica calibrada de 3 ml	6	3,600.00	3,600.00
Pipeta volumétrica calibrada de 4 ml.	6	3,800.00	3,800.00
Pipeta aforada de 5 ml	6	1,296.00	1,296.00
Pipeta aforada de 10 ml	6	4,483.00	4,483.00
Pipeta aforada de 15 ml	6	4,100.00	4,100.00
Pipeta aforada de 20 ml	6	6,600.00	6,600.00
Pipeta aforada de 25 ml	3	4,420.00	4,420.00

Matraces aforados de 50 ml	6	240.00	240.00
Matraces aforados de 100 ml	6	1,300.00	1,300.00
Matraces aforados de 1,000 ml	1	1,200.00	1,200.00
Celdas para espectrofotómetro	2	2,272.00	2,272.00
Beakers de 100 ml	12	1,360.00	1,360.00
Beakers de 250 ml	12	1,350.00	1,350.00
Beakers de 500 ml	1	720.00	720.00
Erlenmeyer de 250 ml	12	972.00	972.00
Bureta de 25 ml	1	6,700.00	6,700.00
Bureta de 10 ml	1	4,686.00	4,686.00
Bureta de 50 ml	1	8,300.00	8,300.00
Probeta de 50 ml	6	1,632.76	1,632.76
Matraz de 250 ml	6	832.00	832.00
Erlenmeyer de 125 ml	12	821.00	821.00
Pipeta volumétrica de 10 ml	12	1,390.00	1,390.00
Pipeta volumétrica de 20 ml	12	1,860.00	1,860.00
Embudo de cola de 100 mm	4	3,820.00	3,820.00
Espátulas de madera	100	42	42
Espátulas de acero	1	325.00	325.00
Frascos plásticos de 1000 ml	6	1,145.00	1,145.00
Pipetas Pasteur 9"	250	560.00	560.00
Perilla de 2 ml	24	575.00	575.00
Tubos múltiples	1	1,406.15	1,406.15
<b>Sub total Lempiras</b>		<b>94,249.91</b>	94,249.91
<b>Reactivos</b>			
Peptona	500 gr	985.00	985.00
Cloruro de Sodio	1000 gr	650.00	650.00
Extracto de levadura	460 gr	1,022.00	1,022.00
Esculina	25 gr	2,800.00	2,800.00
Ciclohexamida	100 gr	3,700.00	3,700.00
Asida de sodio	500 gr	2,725.00	2,725.00
Agar	100 gr	1,365.00	1,365.00
Citrato Férrico	500 gr	1,800.00	1,800.00
Glucosa	500 gr	1,300.00	1,300.00
Difosfato de potasio	500 gr	2,100.00	2,100.00
2,3,5 Cloruro trifenil tetrasódico	100 gr	3,200.00	3,200.00
Extracto de carne de res	500 gr	2,800.00	2,800.00
Bilis de buey Bacteriológica	500 gr	3,200.00	3,200.00
Triptosa	500 gr	1,635.20	1,635.20
Lactosa	1000 gr	1,108.00	1,108.00
Fosfato de potasio hidrogenado	500 gr	1,240.22	1,240.22

Lauryl sulfato de sodio	500 gr	1,500.00	1,500.00
Verde brillante 2%	500 gr	1,900.00	1,900.00
Solución Nitrógeno-Nitrato	500 ml	2,500.00	2,500.00
Ácido clorhídrico 1N	2500 ml	1,100.00	1,100.00
Ácido fosfórico 85%	2500 ml	1,200.00	1,200.00
Sulfanilamida	100 gr	800.00	800.00
N (Naftil)-etilendiamina dihidrocloride	25 gr	3,587.10	3,587.10
Oxalato de sodio 0.05N	100 gr	1,951.00	1,951.00
Solución madre de Nitritos (NaNO <sub>2</sub> )	500 ml	2,500.00	2,500.00
Permanganato de potasio 0.05N	500 gr	1,425.00	1,425.00
Cloroformo	1000 ml	1,275.00	1,275.00
Agar Mc-cankey	500 gr	1,400.00	1,400.00
Sal bilis	500 gr	2,300.00	2,300.00
Rojo neutral	100 gr	2,600.00	2,600.00
Cristal violeta	500 gr	2,000.00	2,000.00
Solución control Nitrógeno-Nitrato	500 ml	2,500.00	2,500.00
Fenolftaleína	100 gr	2,755.00	2,755.00
Ácido sulfúrico grado reactivo	2500 ml	2,320.00	2,320.00
Persulfato de amonio	500 gr	850.00	850.00
Persulfato de potasio	500 gr	750.00	750.00
Hidróxido de sodio 1N	1000 gr	650.00	650.00
Molibdato de amonio	250 gr	1,350.00	1,350.00
Cloruro de estaño	250 gr	3,220.00	3,220.00
Solución madre de 50 mg/l P-PO <sub>4</sub>	500 ml	2,500.00	2,500.00
Solución patrón de 5 mg/L P-PO <sub>4</sub>	500 ml	2,500.00	2,500.00
Solución control de fosfatos (PO <sub>4</sub> )	500 ml	2,500.00	2,500.00
Ácido sulfúrico	2500 ml	1,099.00	1,099.00
Ácido bórico	500 gr	850.00	850.00
Desecante	1 libra	260.00	260.00
Rojo de metilo	25 gr	1,215.00	1,215.00
Alcohol etílico ó isopropílico	1 galón	200.00	200.00
Azul de metileno	50 gr	830.00	830.00
Tetraborato de sodio decahidratado	100 gramos	1,800.00	1,800.00
Hidróxido de sodio 0,1N	1000 gr	650.00	650.00
Tiosulfato de sodio pentahidratado	500 gr	1,700.00	1,700.00
Carbonato de sodio 0,05N	250 gr	632.00	632.00

Solución Nitrógeno amoniacal	500 ml	2,500.00	2,500.00
Sulfato de potasio	500 gr	922.77	922.77
Sulfato de cobre II anhidro	250 gr	1,200.00	1,200.00
Sulfato de cobre pentahidratado	250 gr	1,600.00	1,600.00
Agar m-Endo	500 gr	4,790.00	4,790.00
Agar MFc	500 gr	3,650.00	3,650.00
Caldo mEI	100 gr	21,000.00	21,000.00
Sustrato EIA	500 gr	2,700.00	2,700.00
Agar mEnterococos	500 gr	4,300.00	4,300.00
<b>Sub Total Lempiras</b>		<b>133,462.29</b>	<b>133,462.29</b>

### Anexo 3

#### Lista de Proveedores Internacionales de Equipo de Laboratorio

Realizar compra directa con los fabricantes y/o proveedores internacionales de equipo de laboratorio, podría reducir aproximadamente hasta un 20%, el valor del equipo.

1	Cole Parmer	<a href="http://www.coleparmer.com">www.coleparmer.com</a>
2	Varian	<a href="http://www.varian.com">www.varian.com</a>
3	Thermo Scientific	<a href="http://www.thermoscientific.es">www.thermoscientific.es</a>
4	Thermo Orion	<a href="http://www.thermoscientific.es">www.thermoscientific.es</a>

### Anexo 4

- **Costos de Operación:**

#### Determinación de Costos de análisis a realizar

#### Hoja de cálculo de Costo de análisis Ambientales

##### Información General

<b>Nombre del Parámetro:</b>	Enterococos Fecales
<b>Método de Análisis:</b>	Tubos Múltiples
<b>Laboratorio:</b>	Microbiológico
<b>Matriz de análisis</b>	Agua Superficial

Determinar el Costo Variable Total del análisis ambiental

## I. COSTO VARIABLE

**COSTO VARIABLES:** Este tipo de costo que depende del nivel de producción, es decir son todos aquellos que cambian cuando el nivel de producción varía, si aumenta el nivel de producción su costo también aumentara o viceversa

**Mano de Obra Técnica:** Es la mano de obra utilizada para realizar análisis ambientales, es el personal técnico que procesa las muestras para hacer análisis ambientales son:

- Analistas Ambientales
- Técnicos de laboratorio
- Auxiliares de laboratorio

### Consideraciones:

- **Días laborales mensuales:** Para calcular la mano de obra técnica, se realiza en función de la cantidad de tiempo utilizado en el análisis, y se debe de considerar el tiempo muerto como parte de los análisis ( fines de semana pagados a los empleados) , en base a esto se determina los días hábiles promedio al mes de la siguiente manera:

#### Formula Días Laborales Mensuales (DLM)

$$DLM = \left( \frac{30 \text{ días}}{7 \text{ Días}} \right) * 6 \text{ días} = 25.71 \text{ días mensuales}$$

- **Salario por hora:** Para calcular el costo de la mano de obra, se necesita que las unidades del tiempo en el análisis ambientales, estén en horas, para determinar el salario por hora se utilizara la siguiente formula

#### Formula Salario Promedio por Hora (S<sub>H</sub>)

$$S_H = \frac{\text{Salario Mensual} \div 25.73 \text{ dias}}{8 \text{ hrs}}$$

**Salario Mensual:** Se debe de seleccionar el salario mensual más alto del:

- Analista ambiental
- Técnico de laboratorio
- auxiliar de laboratorio

- **Tiempo para el análisis:** Solo se debe de cronometrar el tiempo que se utiliza para el análisis de cada uno de las personas involucradas en el análisis, en el siguiente cuadro:

Nº	Actividades	Tiempo
	Analista Ambiental	

1	2 hrs
2	1.5 hrs
3	2.5 hrs
<b>Total</b>	<b>2</b>
Técnico de laboratorio	
1	3.5 hrs
2	3 hrs
3	3.5 hrs
<b>Total</b>	<b>3.33 hrs</b>
Auxiliar de laboratorio	
1	1.5 hrs
2	1 hrs
3	1 hrs
<b>Total</b>	<b>1.16 hrs</b>

Nota importante: este debe de incluir el tiempo de los controles por lote (blanco y muestra fortificada)

- Una vez obtenido la información anterior, se llenará el siguiente cuadro:

#### MANO DE OBRA TECNICA

Tipo de Personal	Tiempo (N° de horas hombre)	Salario por hora (Lps)	SUB TOTAL
1. Analista (Químico farmacéutico/microbiólogo/biólogo)	2	97.16	<b>194.32</b>
2. Técnico de laboratorio	3.3	58.29	<b>192.38</b>
3. Auxiliar de Laboratorio	1.16	38.87	<b>45.00</b>
<b>TOTAL</b>		<b>L 431.70</b>	

$$Total = \sum (N^{\circ} \text{ de Horas hombre})(Salario \text{ por hora})$$

**Reactivos analíticos:** Son sustancias químicas con un bajo contenido de impurezas, las cuales son determinadas y cuantificadas con el objetivo de ser empleadas en análisis químicos, microbiológicos y biológicos. Los reactivos analíticos para el análisis se obtienen de los procedimientos de análisis ambiental de los laboratorios.

- Una vez obtenido la información anterior, se llenará el siguiente cuadro:

#### REACTIVOS ANALITICOS

Nombre del reactivo	Cantidad	Precio unitari
---------------------	----------	----------------

	por unida d	o (L)
1. Extracto de res	4.5 gr	5.20
2. Triptosa	32.00 gr	21.30
3. Cloruro de sodio	7.5 gr	1.00
4. Glucosa	7.5 gr	3.9
5. Asida de sodio	0.2 gr	0.30
6. Levadura	5 gr	2.22
7. Peptona	3 gr	1.20
9. Bilis de buey bacteriológica	10 gr	12.80
10. Esculina	1 gr	22.40
11. Citrato de amonio férrico	0.5 gr	0.40
12. Asida de sodio	0.15 gr	0.20
13. Agar	15 gr	41.00

14. Agua destilada	5 L	10.00
15. Agua Desionizada	3 L	9.00
16. Infusión Cerebro Corazón	1 ml	5.60
<b>TOTAL</b>		<b>L136.5 2</b>

**Nota Importante:** Es necesario que el área de administración mantenga una base de datos actualizada de precios de los reactivos, materiales y equipo con su respectiva variación de los precios anual, con el objetivo de determinar el costo de los análisis ambientales de manera oportuna.

### Formulas

$$\text{Sub Total} = (\text{Cantidad})(\text{Precio Unitario})$$

$$\text{Total} = \sum (\text{Cantidad})(\text{Precio Unitario})$$

- 1. Consumo de Energía Eléctrica:** Es el consumo real de energía eléctrica empleado por los equipos eléctricos utilizados en el análisis ambiental de muestra. Como primer paso se debe de determinar el equipo eléctrico utilizado en el análisis, estos se encuentra en el procedimiento del análisis ambiental de los laboratorios, seguidamente se debe de cronometrar el tiempo que se utiliza el equipo en el análisis ambiental a determinar el precio.

- Una vez obtenido la información anterior, se llenará el siguiente cuadro:
- 

### CONSUMO DE ENERGIA ELECTRICA

DESCRIPCION	Cantidad (KWH)	Precio unitario (L)	SUB TOTAL
1. Incubadora	0.025	10.00	<b>12.00</b>
2. Campana UV	0.45	10.00	<b>13.50</b>
3. Autoclave	2.5	10.00	<b>25.00</b>
4. Estufa Calentadora	2.0	10.00	<b>20.00</b>
5. Agitador magnético	0.04	10.00	<b>0.40</b>
6. Bomba de vacío	0.04	10.00	<b>0.20</b>
<b>TOTAL</b>		<b>L</b>	<b>71.10</b>



### Formulas

$$\text{Sub Total} = (\text{Cantidad})(\text{Precio por kilowatt})$$

$$\text{Total} = \sum (\text{Cantidad})(\text{Precio por kilowatt})$$

2. **Otros Insumos:** Estos comprende todos los demás insumos que no estén contemplados en las categorías anteriores, y son todos aquellos que varían si cambia el número de análisis ambientales. algunos ejemplos son los siguientes:

- ✓ Papel Toalla
- ✓ Parafina
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Extran
- ✓ Jabón
- ✓ Y otros que se considere según sea el caso

- Una vez obtenido la información anterior, se llenará el siguiente cuadro:

#### OTROS INSUMOS

DESCRIPCION	Cantidad por Unidad	Precio Unitario (L)	SUB TOTAL
1. Papel Toalla	0.10	11.50	<b>1.15</b>
2. Parafina	0.05	250.00	<b>12.50</b>
3. Papel aluminio	0.20	25.00	<b>5.00</b>
4. Jabón	0.10	4.00	<b>0.40</b>
<b>TOTAL</b>		<b>L</b>	<b>19.05</b>

### Formulas

$$\text{Sub Total} = (\text{Cantidad})(\text{Precio unitario})$$

$$\text{Total} = \sum (\text{Cantidad})(\text{Precio unitario})$$

**COSTO VARIABLE TOTAL:** Es la suma de todos los costos que varían con el nivel de producción, para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman los Incisos del A al D

<b>COSTO TOTAL VARIABLE (A + B + C + D)</b>	<b>L.</b>	<b>658.37</b>
---	-----------	---------------

## II. COSTO FIJO

**COSTO FIJO:** Este es el tipo de costo que no depende del nivel de producción, es decir son todos aquellos que no cambian cuando el nivel de producción varían, si aumenta o disminuye el nivel de producción su costo se mantendrá constantes, generalmente están en función del tiempo (meses, trimestre, semestre o anuales).

**Depreciación del material de Vidrio:** El material de laboratorio en un insumo que se utiliza para procesar y en la producción de reactivos para análisis ambientales. Este se usa varias veces para realizar análisis de laboratorio, es considerado un bien durable, su vida útil en promedio, según los analistas ambientales es de un año.

En base a lo anterior para determinar el costo fijo de depreciación de material de vidrio, primero hay que determinar el precio de la depreciación diaria, utilizando la siguiente formula:

#### Depreciación diaria de material de Vidrio (DDMV)

$$DDMV = \frac{\text{Costo del material de vidrio en Lps.}}{308.52 \text{ días}}$$

El material de vidrio que se utiliza para realizar el análisis de laboratorio, se obtiene de los procedimientos de análisis ambientales de los laboratorios, y el tiempo que se utiliza se debe de cronometrar (analistas ambientales o técnico de laboratorio), se debe incluir el tiempo de lavada del material de vidrio como parte del tiempo de uso, y las unidades deben de estar en días (números enteros)

- Una vez obtenido la información anterior, se llenará el siguiente cuadro:

#### DEPRECIACIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO

DESCRIPCION	CANTIDAD (Día)	Depreciación diaria de material de Vidrio (L)	SUBTOTAL
1. Erlenmeyer de 250 ml	1	0.26	4.79
2. Probetas de 100 ml.	1	1.80	1.80
3. Matraz volumétrico de 50 ml.	2	0.13	0.26
4. Matraz volumétrico de 100 ml.	2	0.70	1.40
5. Matraz volumétrico de 1000 ml.	2	3.89	7.78
6. Beaker de 500 ml.	1		
7. Frascos plásticos con tapón.	4	1.23	
8. Pipetas volumétricos de 1 ml clase "A".	1	3.29	
9. Pipetas volumétricos de 5 ml clase "A".	1	3.29	3.29
10. Pipetas volumétricos de 10 ml clase "A".	1	3.29	3.29

11. Pipetas volumétricos de 15 ml clase "A".	1	4.11	<b>4.11</b>
12. Pipetas volumétricos de 25 ml clase "A".	1	4.11	<b>4.11</b>
13. Pipetas volumétricos de 50 ml clase "A".	1	4.11	<b>4.11</b>
14. Frascos plásticos de polietileno	3	1.37	<b>4.11</b>
<b>TOTAL</b>		<b>L</b>	<b>80.1</b>
			<b>4</b>

### Formulas

$$\text{Sub Total} = (\text{DDMV})(\text{cantidad})$$

$$\text{Total} = \sum (\text{Precio unitario})(\text{cantidad})$$

**Depreciación de equipo e instrumento de laboratorio:** El equipo de laboratorio se utiliza para el procesamiento o lectura de análisis ambientales, este es un insumo, que tiene una vida útil mayor a un año, aproximadamente de 3 a 5 años, es considerado un bien durable. El valor residual es del 1% del valor del equipo.

En base a lo anterior, para determinar el costo fijo de depreciación de equipo e instrumento de laboratorio. Primero hay que determinar el precio de la depreciación anual del equipo para después determinar la depreciación de equipo e instrumento diaria, utilizando las siguientes formulas:

### Precio de depreciación diaria de equipo e instrumento de laboratorio (DDEI)

Para calcular la depreciación debemos conocer:

- **El Costo del Activo:** este se refiere al precio original de compra o de adquisición.
- **La Vida Útil del Activo:** o sea la duración esperada del funcionamiento del equipo, planta o propiedad.
- **El Valor Residual Final:** a este también se le conoce como el valor de salvamento y es aquella parte del costo original del activo que se espera recuperar mediante venta o permuta del bien al final de su vida útil.

$$\text{DDEI} = \frac{\text{Costo del activo} - \text{valor residual Final (1\%)}}{\text{Vida util del activo (año)}}$$

$$\text{Depreciacion diaria DDEI} = \frac{\text{Depreciacion anual}}{308.52 \text{ dias}}$$

El uso del equipo e instrumentos que se utiliza para realizar el análisis de laboratorio se obtiene de los procedimientos del análisis, y el tiempo de uso en el análisis lo deben de cronometrar los analistas ambientales o técnico de laboratorio, se debe incluir el tiempo de preparación del equipo e instrumentó para el análisis.

- Una vez obtenido la información anterior, se llenara el siguiente cuadro:

## II.B DEPRECIACIÓN DE EQUIPO E INSTRUMENTO

DESCRIPCION	Cant idad (Día )	PRECIO DE DEPRECI ACION DIARIA (L)	SU B TO TA L
1. Incubadora	2	3.50	7.50
2. Campana UV	0.12	129.31	16.16
3. Autoclave	0.04	152.1	6.20
4. Agitador/calentador	0.02	8.00	0.15
5. Bomba de vacío	0.04	1.30	0.05
6. Estufa calentadora.	0.04	0.47	0.02
<b>TOTAL</b>		<b>L</b>	<b>35.90</b>

### Formulas

$$Sub\ Total = (Cantidad)(DDEI)$$

$$Total = \sum (Cantidad)(DDEI)$$

**Otros gastos de laboratorio:** Esta clasificación incluye todos los insumos que son descartable y que se pueden utilizar más de una vez y que no están incluidas en las categorías de material de vidrio y equipos e instrumento de laboratorio. Debido a que este insumo para análisis ambientales se utiliza varias veces, es necesario determinar un factor de uso, el cual se calcula de la siguiente manera:

$$Factor\ de\ uso = \frac{1}{Veces\ de\ uso}$$

Algunos ejemplos de otros gastos de laboratorio son los siguientes

- Gabachas
- Lentes de protección
- Mascarilla
- Dispensadores de solvente
- Guante resistente a productos químicos
- Cepillos para lavar
- Guantes
- Perillas

**OTROS GASTOS DE  
LABORATORIO**

DESCRIPCION	Factor de uso	Precio Unitario (L)	SUB TOTAL
1. Gabachas	0.0050	494.00	2.47
2. Anteojos de protección	0.0069	200.00	1.37
3. Mascarilla	0.0500	16.40	0.82
4. Dispensadores	0.0040	170.00	0.68
5. Guantes para lavado	0.0500	10.00	0.50
6. Cepillos para lavar	0.0200	61.50	1.23
7. Guantes resistente a productos químicos	0.1000	33.30	3.33
8. Perillas	0.2000	15.00	3.00
<b>TOTAL</b>		<b>L</b>	<b>13.41</b>

**Formulas**

$$\text{Sub Total} = (\text{Factor de uso})(\text{precio unitario})$$

$$\text{Total} = \sum (\text{Factor de uso})(\text{precio unitario})$$

**Otros gastos administrativos:** Esta clasificación incluye los gastos administrativos, que no están incluidos en las clasificaciones anteriores, es decir gastos reconocidos sobre las actividades administrativas globales de una empresa, en el caso de CESCOO están comprendidos las siguientes:

- Sueldos y salarios de personal administrativo ( Se excluyen las de las unidades operativas)
- Energía eléctrica
- Servicio de Agua
- Telefonía Fija
- Mantenimiento de equipo y transporte
- Servicios médicos, sanitarios y sociales
- Otros servicios técnicos profesionales
- Servicio de imprenta y publicaciones
- Primas y gastos de seguros
- Pasajes nacionales
- Viáticos nacionales
- Viáticos al exterior
- Alimentos y bebidas para personas
- Papel de escritorio
- Productos de artes graficas
- Productos de papel y cartón
- Libros, revistas y periódicos

- Artículos de caucho
- Gasolina
- Diésel
- Materiales de plástico ( No incluidos, en las categorías anteriores)
- Productos no ferrosos ( No incluidos, en las categorías anteriores)
- Elementos de limpieza y aseo personal
- Útiles de escritorio y oficina
- Utensilios de cocina y comedor
- Materiales médicos, quirúrgico menor ( No incluidos, en las categorías anteriores)
- Instrumento Médico - Quirúrgico menor ( No incluidos, en las categorías anteriores)
- Otros respuesta y accesorio menor ( No incluidos, en las categorías anteriores)
- Muebles varios de oficina
- Equipo médico y de laboratorio ( No incluidos en las categorías anteriores)
- Equipo de comunicación y señalamiento
- Equipo para computación
- Otros no incluidos en esta lista pero diferente a las categorías anteriores
- Se considera un 5% en gastos administrativos

**CONTROL DE CALIDAD/GASTOS  
ADMINISTRATIVOS**

DESCRIPCION	SUB TOTAL
Material de Referencia	7.5
Control de interoperación	5.3
<b>Total</b>	<b>L. 12.80</b>

**Análisis de Precios:**

**COSTO TOTAL VARIABLE** **L. 658.37**

**COSTO TOTAL FIJO:** Es la suma de todos los costos que no varían con el nivel de producción, Para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman del Inciso A al E

**COSTO TOTAL FIJO** **L. 149.36**

**COSTO TOTAL:** Se determina suman el Costo Fijo Total y el Costo Variable Total

**COSTO TOTAL** **L. 807.73**

**GANANCIA:** Es un porcentaje del costo total, como parte de la estrategia de precios se aconseja que la ganancia por análisis sea de por lo menos del 30% del costo total.

**GANANCIA** **L. 242.30**

Precio de Análisis: se determinan sumando el costo total + la ganancia + 15% ISV

**PRECIO DEL ANÁLISIS** L. **1,207.50**

<b>Nombre del Parámetro:</b>	<b>Enterococos Fecales</b>
<b>Método de Análisis:</b>	<b>Membrana de Filtración</b>
<b>Laboratorio:</b>	Microbiológico
<b>Matriz de análisis</b>	Agua Superficial

**COSTO TOTAL VARIABLE** L. **845.80**

**COSTO TOTAL FIJO:** Es la suma de todos los costos que no varían con el nivel de producción, Para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman del Inciso A al E

**COSTO TOTAL FIJO** L. **142.25**

**COSTO TOTAL:** Se determina suman el Costo Fijo Total y el Costo Variable Total

**COSTO TOTAL** L. **988.00**

**GANANCIA:** Es un porcentaje del costo total, como parte de la estrategia de precios se aconseja que la ganancia por análisis sea de por lo menos del 30% del costo total.

**GANANCIA** L. **296.40**

Precio de Análisis: se determinan sumando el costo total + la ganancia + 15% ISV

**PRECIO DEL ANÁLISIS** L. **1,717.00**

<b>Nombre del Parámetro:</b>	<b>Coliformes Totales y Termotolerantes</b>
<b>Método de Análisis:</b>	<b>Tubos Múltiples</b>
<b>Laboratorio:</b>	Microbiológico
<b>Matriz de análisis</b>	Agua Superficial

**COSTO TOTAL VARIABLE** L. **574.05**

**COSTO TOTAL FIJO:** Es la suma de todos los costos que no varían con el nivel de producción, Para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman del Inciso A al E

**COSTO TOTAL FIJO** L. **142.25**

**COSTO TOTAL:** Se determina suman el Costo Fijo Total y el Costo Variable Total

**COSTO TOTAL** L. **716.30**

**GANANCIA:** Es un porcentaje del costo total, como parte de la estrategia de precios se aconseja que la ganancia por análisis sea de por lo menos del 30% del costo total.

**GANANCIA** L. **215.00**

Precio de Análisis: se determinan sumando el costo total + la ganancia + 15% ISV

**PRECIO DEL ANÁLISIS** L. **1,071.00**

<b>Nombre del Parámetro:</b>	<b>Coliformes Totales y Termotolerantes</b>
<b>Método de Análisis:</b>	<b>Membrana de Filtración</b>
<b>Laboratorio:</b>	Microbiológico
<b>Matriz de análisis</b>	Agua Superficial

**COSTO TOTAL VARIABLE** L. **812.88**

**COSTO TOTAL FIJO:** Es la suma de todos los costos que no varían con el nivel de producción, Para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman del Inciso A al E

**COSTO TOTAL FIJO** L. **142.25**

**COSTO TOTAL:** Se determina suman el Costo Fijo Total y el Costo Variable Total

**COSTO TOTAL** L. **955.13**

**GANANCIA:** Es un porcentaje del costo total, como parte de la estrategia de precios se aconseja que la ganancia por análisis sea de por lo menos del 30% del costo total.

**GANANCIA** L. **286.50**

Precio de Análisis: se determinan sumando el costo total + la ganancia + 15% ISV



<b>PRECIO DEL ANÁLISIS</b>	<b>L.</b>	<b>1,428.00</b>
----------------------------	-----------	-----------------

<b>Nombre del Parámetro:</b>	<b>Nitratos y Nitritos</b>
<b>Método de Análisis:</b>	<b>Espectrofotometría</b>
<b>Laboratorio:</b>	Calidad de Aguas
<b>Matriz de análisis</b>	Agua

<b>COSTO TOTAL VARIABLE</b>	<b>L.</b>	<b>133.88</b>
-----------------------------	-----------	---------------

**COSTO TOTAL FIJO:** Es la suma de todos los costos que no varían con el nivel de producción, Para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman del Inciso A al E

<b>COSTO TOTAL FIJO</b>	<b>L.</b>	<b>110.21</b>
-------------------------	-----------	---------------

**COSTO TOTAL:** Se determina sumando el Costo Fijo Total y el Costo Variable Total

<b>COSTO TOTAL</b>	<b>L.</b>	<b>244.00</b>
--------------------	-----------	---------------

**GANANCIA:** Es un porcentaje del costo total, como parte de la estrategia de precios se aconseja que la ganancia por análisis sea de por lo menos del 30% del costo total.

<b>GANANCIA</b>	<b>L.</b>	<b>73.00</b>
-----------------	-----------	--------------

Precio de Análisis: se determinan sumando el costo total + la ganancia + 15% ISV

<b>PRECIO DEL ANÁLISIS</b>	<b>L.</b>	<b>364.50</b>
----------------------------	-----------	---------------

<b>Nombre del Parámetro:</b>	<b>Amonio</b>
<b>Método de Análisis:</b>	<b>Espectrofotometría</b>
<b>Laboratorio:</b>	Calidad de Aguas
<b>Matriz de análisis</b>	Agua

<b>COSTO TOTAL VARIABLE</b>	<b>L.</b>	<b>292.16</b>
-----------------------------	-----------	---------------

**COSTO TOTAL FIJO:** Es la suma de todos los costos que no varían con el nivel de producción, Para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman del Inciso A al E

**COSTO TOTAL FIJO** **L.**  
**128.15**

**COSTO TOTAL:** Se determina suman el Costo Fijo Total y el Costo Variable Total

**COSTO TOTAL** **L.** **420.31**

**GANANCIA:** Es un porcentaje del costo total, como parte de la estrategia de precios se aconseja que la ganancia por análisis sea de por lo menos del 30% del costo total.

**GANANCIA** **L.** **126.09**

Precio de Análisis: se determinan sumando el costo total + la ganancia + 15% ISV

**PRECIO DEL ANÁLISIS** **L.** **628.40**

<b>Nombre del Parámetro:</b>	<b>Fosfatos/Fosforo Total</b>
<b>Método de Análisis:</b>	<b>Espectrofotometría</b>
<b>Laboratorio:</b>	Calidad de Aguas
<b>Matriz de análisis</b>	Agua

**COSTO TOTAL VARIABLE** **L.** **377.35**

**COSTO TOTAL FIJO:** Es la suma de todos los costos que no varían con el nivel de producción, Para determinar el Costo Total Variable de análisis ambientales, se suman del Inciso A al E

**COSTO TOTAL FIJO** **L.** **201.15**

**COSTO TOTAL:** Se determina suman el Costo Fijo Total y el Costo Variable Total

**COSTO TOTAL** **L.** **578.5**

**GANANCIA:** Es un porcentaje del costo total, como parte de la estrategia de precios se aconseja que la ganancia por análisis sea de por lo menos del 30% del costo total.

**GANANCIA** **L.** **173.55**

Precio de Análisis: se determinan sumando el costo total + la ganancia + 15% ISV

**PRECIO DEL ANÁLISIS** **L.** **864.85**

## **Anexo 5**

## Descripción de los Métodos Analíticos Bacteriológicos y Fisicoquímicos

Los métodos analíticos físico químicos y bacteriológicos, se pueden obtener adquiriendo el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22nd Edition, o la edición actualizada, en el cual se describen cada uno de estos métodos.

### METODOS ANALITICOS BACTERIOLOGICOS

#### ▪ Enterococos Fecales

**Método: 9230 B.**

#### **Técnica de Tubos Múltiples**

Este método es recomendado para analizar agua potable de consumo, fuentes de agua; y tanto agua dulce como agua marina para uso recreacional.

#### **Materiales y Medios de Cultivo:**

Preferiblemente se debe usar un medio de cultivo viable comercialmente; siguiendo las instrucciones de almacenamiento y descarga, del fabricante; después de su preparación. El medio deberá ser preparado con los siguientes ingredientes básicos, siguiendo las indicaciones siguientes:

#### **a). Medio de Asida Destroza**

Extracto de Carne .....	4.5 g
Tryptona o Polipeptona.....	15.0 g
Cloruro de Sodio (NaCl) .....	7.5 g
Asida de Sodio (NaN <sub>3</sub> ) .....	0.2 g
Agua Destilada .....	1 L

Precauciones: Asida de sodio es un químico peligroso, requiere de especial atención y cuidado. Es toxico y mutagénico. Tomar precauciones antes de manipular este compuesto; la asida de sodio puede también formar compuestos explosivos al entrar en contacto con tuberías metálicas.

Se debe ajustar el pH del medio hasta 7.2 +/- 0.2 a 25 °C después esterilizar. Si el pH esta fuera de rango, se debe ajustar en caso de permanecer fuera de rango el pH, se debe descartar el medio. El medio descrito en esta sección es accesible comercialmente. Se debe seguir las instrucciones del fabricante para el almacenamiento y disposición final, después de la preparación del medio de cultivo.

#### **B). Agar de Asida Bilis Esculina**

Extracto de Levadura .....	5.0 g
Proteasa Peptona N0. 3.....	3.0 g

Triptona.....	17.0 g
Bilis de Buey Bacteriológica.....	10.0 g
Esculina.....	1.0 g
Citrato de Amonio Férrico.....	0.5 g
Cloruro de Sodio .....	5.0 g
Asida de Sodio .....	0.15 g
Agar.....	15.0 g
Agua Destilada .....	1 L

#### **Procedimiento de Prueba Presuntiva:**

Incubar una serie de tubos con agar Asida Destroza, con las cantidades de muestra gradualmente cuantificadas. Use volúmenes de 10 mililitros o valores menores a este. Usar doble concentración de agar asida destroza en el tubo que contiene 10 ml de inóculo. Las porciones de muestra usadas deben ser variadas en tamaño y número, de acuerdo a las características de la muestra. Usar diluciones solamente con números decimales múltiplos de 1 ml.

Incubar los tubos inoculados a 35 +/- 0.5 °C; revisar la turbidez de cada tubo al final de las 24 +/- 2 horas de incubación. Si no hay turbidez definida, re incubar y leer nuevamente al final de los 48 +/- 4 horas de incubación.

#### **Procedimiento de Confirmación de la Prueba:**

Después de las 24 o 48 horas de incubación, todos los tubos inoculados en agar asida destrosa, que muestran turbidez, se ha confirmado positivamente la prueba de enterococos fecales, en cada uno de ellos.

Bandear una porción de cultivo de cada uno de los tubos positivos cultivados con agar asida destroza; en discos con medio de cultivo Bilis Asida Esculina (BEA). Invertir e incubar los discos de cultivo a 35 +/- 0.5 °C por 24 +/- 2 horas. Colonias café oscuro con una aureola color café confirman la presencia de estreptococos fecales. Luego transferir las colonias café oscuro con aureola café a dos tubos con infusión de extracto Cerebro-corazón. Adicionar a uno de los tubos 6.5% de cloruro de sodio (NaCl) y el otro tubo sin cloruro de sodio.

Si se observa crecimiento cuando los tubos son incubados a 35 +/- 0.5 °C después de 48 +/- 4 horas en la infusión de extracto cerebro corazón (BHI) con 6.5% de NaCl; o 24 +/- 2 horas en el tubo con BHI sin NaCl; la colonia es confirmada como un miembro del genero Enterococos.

#### **Calcular el Número Más Probable:**

Calcular la densidad de enterococos/Estreptococos totales, del número de cultivos confirmados positivamente en el medio de cultivo con agar asida bilis esculina y correspondiente a los tubos positivos a la infusión de extracto cerebro-corazón con 6.5% de NaCl a 35 +/- 0.5 °C después de 48 +/- 4 horas de incubación. Calcule la combinación de tubos positivos y negativos y determine el número más probable (NMP).

▪ **Enterococos Fecales**

**Método: 9230 C.**

**Técnica de Membrana de Filtración**

La Técnica de membrana de filtración para la determinación de enterococos en muestras ambientales, es recomendable para analizar agua de consumo humano, fuentes de agua, agua residual y tanto agua dulce como agua marina para uso recreacional.

**Materiales y Medios de Cultivo:**

Preferiblemente se debe usar un medio de cultivo viable comercialmente; siguiendo las instrucciones de almacenamiento y descarga, del fabricante; después de su preparación y su uso. El medio deberá ser preparado con los siguientes ingredientes básicos, siguiendo las indicaciones siguientes:

**A) mE agar**

Peptona.....	10.0 g
Cloruro de Sodio NaCl .....	15.0 g
Extracto de Levadura.....	30.0 g
Esculina.....	1.0 g
Ciclohexamida.....	0.05 g
Asida de Sodio .....	0.15 g
Agar.....	15.0 g
Agua Destilada .....	1 L

**Precauciones:** Asida de sodio es un químico peligroso, requiere de especial atención y cuidado. Es toxico y mutagénico. Tomar precauciones antes de manipular este compuesto; la asida de sodio puede también formar compuestos explosivos al entrar en contacto con tuberías metálicas.

**B). EIA Substrato**

Esculina.....	1.0 g
Citrato Férrico.....	0.5 g
Agar.....	15.0 g
Agua Destilada.....	1.0 L

Disolver los ingredientes con calor,

Calentar para disolver los ingredientes, colocar en la autoclave a 121 ° C por 15 minutos para esterilizar, luego enfriar en un baño con agua con temperatura de 44 a 46 °C. El pH debe estar a 7.1 +/- 0.2 después del autoclave. Si el pH esta fuera de rango, ajustarlo y medirlo nuevamente. Desechar el medio si el pH permanece fuera de rango. Colocar medio en discos de Petri de 50 mm, rellenándolos a una altura de 4 a 5 mm (aproximadamente de 4 a 6 mililitros) y dejar solidificar. Almacenar los discos rellenos en la oscuridad de 2 a 10 °C, desecharlos después de 14 días.

### C. mEI agar:

Los ingredientes básicos de este medio son los mismos del mE agar; solamente agregar 0.75 g de glucosa -β-D indoxyl al medio basal. Calentar para disolver los ingredientes, esterilizar y enfriar en un baño de agua de 44 a 46 °C. Mezclar 0.24 g de ácido nalidixico en 5 mililitros de agua destilada esterilizada, adicionar unas gotas de hidróxido de sodio 0.1 N y disolver. Filtrar la solución en un filtro estéril y agregar al medio mEI. Agregar 0.02 g de TTC, de forma separada al medio mEI y mezclar.

### D). mEnterococos agar:

Triptosa.....	20.0 g
Extracto de levadura.....	5.0 g
Glucosa.....	2.0 g
Difosfato de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	4.0 g
Asida de Sodio.....	0.4 g
2, 3,5 cloruro de trifetil tetrasodio.....	0.1 g
Agar.....	10 g
Agua destilada.....	1 L

**Precauciones:** Asida de sodio es un químico peligroso, requiere de especial atención y cuidado. Es toxico y mutagénico. Tomar precauciones antes de manipular este compuesto; la asida de sodio puede también formar compuestos explosivos al entrar en contacto con tuberías metálicas.

Calentar para disolver los ingredientes. Esta solución no debe ser esterilizada en autoclave, porque se degradan los químicos seleccionados. Colocar la solución en capsulas Petri de 9 x 50 mm, un

volumen de 4 a 6 mililitros por cada uno (aproximadamente de 4 a 5 mm de altura), luego dejar solidificar. Finalmente el pH debe estar a 7.2 +/- 0.2. Si el pH esta fuera de rango, ajustarlo y medirlo nuevamente. Desechar el medio si el pH permanece fuera de rango. Preparar medios frescos para cada lote de muestras. (Nota: este medio es recomendado para enterococos/estreptococos fecales en muestras de agua dulce y agua marina.

**E). Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI):**

Infusión de cerebro de ternero.....	200 g
Infusión de corazón de res.....	250 g
Peptona Proteasa.....	10.0 g
Glucosa.....	2.0 g
Cloruro de Sodio.....	5.0 g
Difosfato de sodio hidrogenada (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	2.5 g
Agua destilada.....	1 L

Este medio es usado para la verificación de la prueba presuntiva de las colonias de enterococos. Calentar para disolver los ingredientes. Dispensar 10 ml en tubos y colocarlos en la autoclave a 121 °C por 15 minutos. Al final el pH debe de estar en 7.4 +/- 0.2 después de la esterilización. Si el pH esta fuera de rango, ajustarlo y medirlo nuevamente. Desechar el medio si el pH permanece fuera de rango.

Preparar caldo BHI con 6.5% de NaCl, agregar otros 60 g de NaCl al caldo Infusión cerebro corazón (BHI), formulada anteriormente.

**F). Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI agar):** agregar 15.0 g de agar a los ingredientes del caldo infusión cerebro corazón (BHI caldo), antes descrito. Calentar para disolver el agar, llevar a la autoclave a 121 ° C por 15 minutos. Al final el pH debe de estar en 7.4 +/- 0.2 después de la esterilización. Si el pH esta fuera de rango, ajustarlo y medirlo nuevamente. Desechar el medio si el pH permanece fuera de rango.

Extracto de carne de Res.....	3.0 g
Peptona.....	5.0 g
Bilis de Buey.....	40.0 g
Esculina.....	1.0 g
Citrato Férrico.....	0.5 g

Agar.....15.0 g

Agua Destilada.....1 L

Este medio es usado para pruebas de verificación presuntivas en colonias de enterococos. Calentar y disolver los ingredientes. Agregar de 8 a 10 mililitros en los tubos adecuados por los sesgos o agregar un volumen apropiado en un frasco para luego ser vertido en las capsulas. Llevar a la autoclave a 121 ° c por 15 minutos. No recalentar porque esto puede oscurecer el medio. Enfriar a 44 o 46 °C e inclinar los tubos o dispensar 15 mililitros dentro de capsulas de Petri de 15 x 100 milímetros. El PH final deberá estar en 6.6 +/- 0.2 después dela esterilización. Si el pH esta fuera de rango ser ajustado y medirlo nuevamente; descartar el medio si el pH se mantiene fuera de rango. Almacenar de 2 a 10 °C.

#### PROCEDIMIENTO:

##### a. Método mE:

1. Selección de volumen de muestra y filtración: el filtro apropiado para el volumen de muestra seleccionado, debe realizarse mediante membrana estéril, con cuadrícula de 0.45 micras, que pueda dar de 20 a 60 colonias en la superficie de la misma. Transferir el filtro al mE agar enriquecido (9230C.2a) en discos Petri evitando burbujas de aire bajo la membrana.
2. Incubación: invertir los discos de cultivo e incubar a 41 +/- 0.5 °C por 48 +/- 4 horas.
3. Prueba de sustrato: después de 48 +/- 4 horas de incubación, transfiera el filtro cuidadosamente al medio EIA (9230C.2b). incubar a 41 +/- 0.5 °C por 20 minutos.
4. Conteo: contar las colonias de enterococos de color rosado a rojo que desarrollaron a negro o círculos rojo marrón precipitados al envés del filtro.

Cuando realice el conteo de las colonias, usar un binocular de bajo poder (10 a 16 de magnificación) o un microscopio de disección de campo amplio u otro dispositivo óptico; aplicar luz blanca fluorescente para obtener visión óptima.

##### b. Método mEI

1. Seleccione el tamaño de la muestra y filtración: ver procedimiento anterior a.1).
2. Transferencia e incubación: transferir el filtro al medio agar endurecido (9230C.2c) en capsulas de Petri, evitar burbujas de aire debajo de la membrana. Invertir los discos de cultivo e incubar a 41 +/- 0.5 °C por 24 +/- 2 horas.
3. Conteo: contar como ninguna colonia de enterococos, (independientemente del color) con luz halógena azul. Además tales colonias deben ser mayor o igual a 0.5 mm de diámetro. Usar este criterio a su discreción. Cuando realice el conteo de las colonias, usar un binocular de bajo poder (10 a 16 de magnificación) o un microscopio de disección de campo amplio u otro dispositivo óptico; aplicar luz blanca fluorescente para obtener visión óptima.



**c. método m enterococos:**

1. Seleccione el tamaño de la muestra y filtración: ver procedimiento anterior a.1).
2. Transferencia e incubación: transferir el filtro al m enterococos agar endurecido (9230C.2d) en capsulas de Petri, evitar burbujas de aire debajo de la membrana. Invertir los discos de cultivo e incubar a  $41 \pm 0.5$  °C por  $24 \pm 2$  horas.
3. Conteo: contar todas las colonias brillantes y rojo oscuro. Cuando realice el conteo de las colonias, usar un binocular de bajo poder (10 a 16 de magnificación) o un microscopio de disección de campo amplio u otro dispositivo óptico; aplicar luz blanca fluorescente para obtener visión óptima.
4. Calcular Densidad de Enterococos: Calcular densidad de las cantidades de muestras producidas por los conteos de las membranas de filtración, dentro del rango deseado de 20 a 60 colonias. Si las colonias están más densas que esto, intentar proveer un número estimado o considerar como “Demasiado numerosos para contar” (TNTC) como en la sección 9222B.4e. Registro de la densidad como enterococos presuntivos por cada 100 mililitros.
5. Pruebas de Verificación: Porque todos estos métodos sufren periódicamente de falsos positivos. Las pruebas de verificación son un paso importante de control de calidad. Incluir una rutina de verificación de procedimiento con cada uno de los métodos de enterococos. Especialmente si los resultados serán usados como evidencia en una corte. Para verificar colonias de enterococos, recoger selectivamente colonias típicas de una membrana y bandear aisladamente y cuidadosamente la superficie de un disco de agar BIH (9230C.2f). Incubar a  $35 \pm 0.5$  °C entre  $24 \pm 2$  y  $48 \pm 4$  horas.

Transferir una porción parecida de solo una, además aislar colonias del disco agar BHI hacia el tubo de caldo BHI (9230C.2e) y cada uno de dos portaobjetos limpios de vidrio usando un círculo de inoculación estéril. Incubar el caldo BHI a  $35 \pm 0.5$  °C por  $24 \pm 2$  horas. Frotar en un porta objetos, agregar unas pocas gotas de peróxido de hidrogeno recién preparado al 3%. La aparición de burbujas constituye prueba positiva de la catalasa e indica que la colonia no es miembro del genero enterococos. Si la prueba de catalasa es negativa (i.e., no se producen burbujas) realizar una coloración de Gram de la segunda placa o portaobjetos. Estreptococos y Enterococos fecales son Gram positivo, células ovoides, de 0.5 a 1.0 micrómetros de diámetro. Principalmente en pares o cadenas cortas.

Transferir, usando una asa de inoculación estéril, una asa completa del caldo BHI a cada de los siguientes medios: agar bilis esculina (incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por  $48 \pm 4$  horas; agar BHI (incubar a  $10 \pm 0.5$  °C por  $48 \pm 4$  horas); y caldo BHI con 6.5% de NaCl (incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por  $48 \pm 4$  horas).

Crecimiento negativo de catalasa, cocos gram positivo en agar bilis esculina (9230C.2g) y en caldo con 6.5% NaCl a  $35 \pm 0.5$  °C y ya sea en agar BHI a  $10 \pm$

0.5 °C o caldo BHI a 45 +/- 0.5 °C confirma que la colonia pertenece a el género Enterococos.

Cuando use el medio mEI, la incidencia de no especies de enterococos puede ser tan alto como 26% en ambientes marinos. Así. Pruebas adicionales, tales como cultivo en caldo BHI a 45 +/- 1 °C y ensayos de pyrrolidonylarylamidase (PYR) y leucina aminopeptidase (LAP) actividades usando kit de prueba, puede requerirse la confirmación del genero Enterococos con exactitud aceptable (> ó = 90%).

- **Coliformes Totales y Termotolerantes**

**Método 9221 B.**

**Estándar para Coliformes Totales Técnica de Fermentación**

**(Tubos Múltiples)**

**Muestras**

Colectar las muestras como lo indica la sección 9060A y B, usando recipientes para muestras especificados en la sección 9030B.19.

**Fase Presuntiva**

Usar caldo de Lauryl Triptosa en la parte de prueba de tubos múltiples. Si el medio ha sido refrigerado después de la esterilización. Incubar durante la noche a temperatura ambiente (20 °C) antes de usar. Descartar los tubos que muestran crecimiento y/o burbujas.

**a). Regentes y Medio de Cultivo: Si es posible, usar medios disponibles comercialmente.**

Caldo Lauryl Triptosa

Tryptosa.....	20.0 g
Lactosa.....	5.0 g
Fosfato de potasio hidrogenado k2Hp04.....	2.75 g
Fosfato de potasio dihidrogenado kH2PO4.....	2.75 g
Cloruro de Sodio NaCl.....	5.0 g
Lauryl sulfato de sodio.....	0.1 g
Agua destilada.....	1 L

Agregar los ingredientes deshidratados al agua, agitar a fondo y calentar para disolver. Antes de esterilizar, Dispensar en tubos de fermentación con un vial invertido (Durham tube), suficiente medio para cubrir el vial invertido al menos una mitad o dos tercios después esterilización. Alternativamente, omitir los viales invertidos y agregar 0.01 g/L purpura de bromocresol al caldo de Lauryl Triptosa para determinar la producción de ácido, un indicador de un resultado positivo en esta etapa de la prueba de coliformes. Cerrar los tubos con tapones de metal o plásticos resistentes al calor.

Hacer caldo Lauryl Triptosa de tal fuerza que agregando 100 ml, 20 ml, o 10 ml porciones de muestra al medio no reducirá las concentraciones del medio por debajo del estándar del medio. Prepare en concordancia con la tabla 9221cI. Llevar a la autoclave el medio a 121 °C de 12 a 15 minutos. Asegurar que los viales invertidos, están usados, están libres de burbujas de aire. El pH del medio debe estar en 6.8 +/- 0.2 después de la esterilización.

**b) Procedimiento:**

- 1) Arreglar los tubos de fermentación en filas de 5 o 10 tubos cada una, en un estante para tubos de prueba. El número de filas y los volúmenes de muestra seleccionados depende de la calidad y las características del agua a examinar. Para agua potable usar cinco porciones de 20 ml, diez porciones de 10 ml o una única porción en una botella de 100 ml. Para agua no potable use cinco tubos por dilución (de 10, 1, 0.1 ml, etc.).

Cuando haga diluciones y medidas de volúmenes de muestras diluidas, tomar las precauciones dadas en la sección 9215B.2 use la figura 9215:1 como guía para preparar diluciones. Mezclar la muestra y las diluciones vigorosamente alrededor de 25 veces. Inocular cada tubo en conjuntos de cinco con réplicas de volúmenes de muestra, incrementadas en diluciones decimales. Si las cantidades decimales de la muestra son usadas. Mezclar las porciones de prueba en el medio por agitación suave.

- 2) Incubar los tubos o botellas inoculadas a 35 +/- 0.5 °C. después de 24 +/- 2 horas agitar cada tubo o botella suavemente y examinar el crecimiento, gas y/o reacción ácida (sombras de color amarillo), si no es evidente el gas o la reacción ácida, re incubar y examinar al final de 48 +/- 3 horas. Registrar la presencia o ausencia de crecimiento, gas y/o producción de ácido. Si el interior del vial ha mostrado crecimiento con acidez (color amarillo) significa una reacción presuntivamente positiva.

**c) Interpretación:** Producción de la reacción de un ácido y/o gas en los tubos o botellas dentro de las 48 +/- 3 horas constituye una reacción presuntivamente positiva. Enviar los tubos o botellas con una reacción presuntivamente positiva a la fase confirmatoria (9221 B.3).

La ausencia de la formación de reacción ácida y/o gas al final de las 48 +/- 3 horas de incubación constituye una prueba negativa. Enviar las muestras de agua potable que

mostraron crecimiento sin una reacción positiva de ácido y/o gas, a la fase confirmatoria (9221 B.3). Una arbitraria 48 horas límite para una doble observación, excluye ocasionalmente miembros del grupo coliformes que crecen muy despacio.

**Fase Confirmatoria:**

**a). Medio de Cultivo:** Usar caldo de bilis lactosa verde brillante en tubos de fermentación para la fase confirmatoria, de ser posible usar medios disponibles comercialmente.

Peptona.....	10.0 g
Lactosa.....	10.0 g
Bilis de buey bacteriológica.....	20.0 g
Verde brillante.....	0.0133 g
Agua destilada.....	1 L

Agregar los ingredientes deshidratados al agua, agitar a fondo y calentar para disolver. Antes de esterilizar, Dispensar en tubos de fermentación con un vial invertido (Durham tube), suficiente medio para cubrir el vial invertido al menos una mitad o dos tercios después esterilización. Cerrar los tubos con tapones de metal o plásticos resistentes al calor. Llevar el medio a la autoclave a 121 °C de 12 a 15 minutos. Asegurar que los viales invertidos estén libres de burbujas de aire. El pH del medio debe estar en 7.2 +/- 0.2, después de la esterilización.

**b). Procedimiento:** Enviar todos los tubos o botellas que mostraron crecimiento y cualquier cantidad de gas o reacción ácida dentro de las 24 +\_ 2 horas de incubación, a la fase confirmatoria. Si los tubos o botellas presuntivos adicionales, muestran fermentación activa o reacción ácida al final de las 48 +/- 3 horas de periodo de fermentación, enviar estos a la fase confirmatoria. Simultáneamente inocular en caldo bilis lactosa verde brillante para coliformes totales y en caldo EC para coliformes (fecales) termotolerantes, (ver 9221 E) o puede ser usado EC MUG caldo para Escherichia Coli (ver 9221 F). Para confirmar la presuntiva presencia de colonias de coliformes que crecieron en el medio sólido, utilizando medio de fermentación, ver sección 9222BB, 4f.

Agite suavemente por rotación los tubos presuntivos o botellas que mostraron gas y reacción ácida que emitieron los organismos. Con una asa estéril de 3 a 3.5 mm de diámetro, transferir una o más asas llenas del cultivo a los tubos de fermentación caldo bilis lactosa verde brillante. Alternativamente insertar un aplicador estéril de madera a menos de 2.5 cm en el cultivo. Puntualmente, remover y zambullir el aplicador en el

fondo de los tubos de fermentación que contienen caldo de bilis lactosa verde brillante. Remover y descartar el aplicador. Repetir para todos los otros tubos presuntamente positivos.

Incubar los tubos inoculados en caldo de bilis lactosa verde brillante a  $35 \pm 0.5$  °C. Formación de gas en alguna cantidad de viales invertidos, en los tubos de fermentación con caldo bilis lactosa verde brillante, en cualquier momento dentro de las  $48 \pm 3$  horas constituye una fase confirmada positivamente. Estimar la densidad de coliformes, calcular el valor de número más probable (NMP) de cada uno de los tubos positivos de bilis lactosa verde brillante, descritos en 9221C.

**C. Procedimiento Alternativo:** usar esta alternativa solo para agua contaminada o agua residual, conociendo los resultados positivos consecuentemente.

Si todos los tubos son positivos en dos o más diluciones consecutivas dentro de las 24 horas. Enviar a la fase confirmatoria solamente los tubos de la dilución más alta (inóculo de muestra más pequeño) en los cuales todos los tubos son positivos y algunos otros tubos positivos aun en la dilución más alta. Enviar a la fase confirmatoria todos los tubos en los cuales hubo crecimiento de gas o ácido, producido en 24 a 48 horas.

- **Recuento de Coliformes Totales**

**Método: Membrana de Filtración**

**A. Sección de procedimiento**

**Alcance y Aplicación**

La determinación de la cantidad de coliformes totales por la técnica de membrana de filtración, se utiliza principalmente en el control de calidad de aguas tratadas, y a diferencia del método de tubos múltiples brinda un recuento directo de coliformes totales presentes en una muestra de agua.

Esta técnica también puede ser usada en el estudio de diferentes aguas naturales y aguas residuales.

**Resumen del Método.**

La técnica de filtración se basa en hacer pasar un volumen de agua conocido de muestra a través de una membrana de filtración la cual se coloca en un medio de cultivo adecuado y luego incubada a una temperatura y tiempo determinado, realizando después el recuento de colonias en forma directa.

**Definiciones**

Grupo Coliforme: incluye todos los bacilos Gram negativos aerobios o anaerobio facultativos, no formadores de esporas que fermentan la lactosa y producen gas cuando son incubados por 24 horas a 35.5 °C. A este grupo pertenecen los géneros Escherichia Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella.

MF: membrana de filtración

U.V: Ultravioleta

UFC: Unidad formadora de colonia

### **Materiales y Equipo**

- Horno de calor seco: modelo STM 135 (de convección mecánica) solid state Digital Control, con capacidad de mantener una temperatura de 170 °C por dos horas.
- Autoclave modelo STM-EI serie No 177960 con capacidad para esterilizar material a una temperatura de 121 °C por un tiempo de 15 minutos y 15 libras de presión. Debe ser equipada con una válvula de seguridad, un manómetro y un termómetro, para medir presión y temperatura durante el proceso.
- Incubadora bacteriológica: (gravity convection incubator) con capacidad de mantener una temperatura de 35 °C +/- 0.5, lo mismo se debe verificar colocando un termómetro en su interior.
- Refrigeradora la cual debe ser para uso exclusivo del laboratorio, debe mantener una temperatura de 1 a 5 °C, se debe medir temperatura diariamente.
- Unidades de filtración: deben ser de vidrio, acero inoxidable o plástico autoclavable, no deben tener fugas.
- Equipo de vacío: bomba de vacío u otro dispositivo, capaz de producir una presión diferencial a la porta filtro.
- Frasco de filtración: el cual debe ser un kitasato de vidrio o en manifold. En donde se pueda colocar la unidad de filtración.
- Balanza analítica la cual debe tener una sensibilidad de 0.1 gramos.
- Destilador de agua: debe producir agua no toxica que pueda impedir el crecimiento de bacterias. Se debe de monitorear periódicamente, tanto la calidad física química como microbiológica adecuada que debe tener.
- Medidor de pH con un rango de medición de 0 a 14.
- Mechero Bunsen
- Agitador magnético
- Los frascos para toma de muestras: deben ser de vidrio o plástico (no corrosivos) capaces de resistir esterilización o bolsas plásticas estériles, con capacidad de al menos 130 mililitros. En el caso de los frascos los tapones deben estar cubiertos con papel resistente a la esterilización.
- Frascos de dilución deben ser de vidrio o plástico autoclavables con tapón de rosca y con capacidad de al menos 150 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml deben de ser exactas dentro de una tolerancia de +/- 2.5% con una graduación bien marcada y una punta intacta.
- Tubos de ensayo de 16x150 mm y campanas de Durham resistentes al autoclave.

- Placas de Petri estériles de vidrio autoclavables de 60x10 mm o placas estériles de plástico descartables de 50x12 mm.
- Membranas de filtración estériles de éster de celulosa blancas, cuadrículadas con un diámetro de 47 mm y una porosidad de 0.45 micras.
- Pinzas sin dientes con borde plano (esterilizadas con alcohol etílico al 95 %)
- Material necesario para la preparación de medios de cultivo (probetas, matraces, espátulas, magnetos).
- Asas de inoculación metálicas y con agujas de níquel-cromo o platino.
- Pipetas de acero inoxidable o aluminio cilíndricos o rectangulares de 5 a 7.5 cm de ancho y una longitud aproximada de 40 cm. En el caso de no disponer se sustituirá por envolturas de papel individuales.
- Materiales diversos como algodón, papel aluminio, tijeras, marcador indeleble, guantes, mascarillas, etc.

### **Preparación de medios de cultivo y Reactivos**

- **Agar m-Endo:** disolver 51 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada estéril conteniendo 20 ml de alcohol etílico al 95%, luego calentar evitando la ebullición y el sobrecalentamiento. Seguidamente atemperar el medio en baño maría y regular el pH final que debe ser 7.2 +/- 0.2 el medio NO debe ser autoclavado, y se debe de colocar 4 ml en placas de Petri estériles. Tomar en cuenta los cuidados de seguridad en la preparación del m-Endo, utilizando mascarilla y guantes de protección personal y evitando derrames en la piel y ropa ya que la sobre exposición puede causar cáncer de piel.
- **Caldo Brilla al 2%:** Disolver 40 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada y luego distribuir 10 ml en tubos de ensayo de 16x150 mm previamente colocar en el interior del tubo una campana de Durham invertida. Tapar y autoclavar durante 15 minutos a 121 °C.
- **Agua de dilución:** es necesario la preparación de dos soluciones stock A y B.

Solución Stock A: disolver 34 gramos de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 +/- 0.5 con hidróxido de sodio (NAOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en un litro de agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de Dilución: agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 5 ml de la solución stock B de cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a un litro de agua destilada, esterilizar en el autoclave.

- **Solución de Tiosulfato de sodio:** Disolver 3 g de Tiosulfato de Sodio en 100 ml de agua destilada y se obtendrá una solución al 3%. En los frascos para toma de muestras de agua clorada colocar 0.1 ml por cada 100 ml de muestra luego esterilizar.

- **Solución de Alcohol Etilico al 70%:** Disolver 740 ml de alcohol etílico al 95% en 260 ml de agua destilada y luego mezclar hasta su completa dilución.

### **Análisis de la Muestra**

- Antes de iniciar el análisis desinfectar el mesón de trabajo y disponer todos los materiales a usar.
- Preparar las placas de Petri de 48x8.5 mm conteniendo los medios de M-Endo caldo o agar identificadas con el número o código de muestra asignada en el libro de registro de resultados de análisis, volumen filtrado, dilución utilizada y fecha.
- Realizar un control de calidad previo al análisis, filtrando 100 ml de agua destilada estéril y procediendo como si fuera una muestra más.
- Homogenizar la muestra 25 veces inclinando el frasco formando un ángulo de 45 grados aproximadamente entre el brazo y el antebrazo.
- Proceder a hacer diluciones en caso de ser necesario cuando se sospecha que la muestra está muy contaminada, para ello se transfiere con una pipeta estéril 10 ml de muestra original, a un frasco de dilución con 90 ml de agua de dilución, obteniendo la primera dilución  $10^{-1}$  y así continuar hasta la dilución que se considere necesaria. Si la muestra no necesita ser diluida se procede a filtrar 100 ml o menos volumen de muestra.
- Filtrar la muestra para el análisis de coliformes totales de la siguiente manera.
- Colocar la membrana filtrante con la ayuda de una pinza estéril en el porta filtro, con el lado cuadrículado hacia arriba.
- Humedecer la membrana con un pequeño volumen de agua destilada estéril antes de realizar la filtración.
- Verter cuidadosamente en el portafiltro el volumen de muestra a ser examinado, evitando que el agua salpique los bordes superiores.
- Encender la bomba de vacío y proceder a la filtración.
- Apagar la bomba de vacío y finalizar la operación. Evitar secar excesivamente la membrana filtrante.
- Retirar la membrana del portafiltro con la ayuda de una pinza esterilizada con un mechero de alcohol, teniendo cuidado de no calentar demasiado y dejar enfriar al aire.
- Obedeciendo los cuidados de asepsia. Colocar cuidadosamente la membrana con la parte cuadrículada para arriba, en la superficie del medio de cultivo. Verificar que no hubo formación de burbujas de aire entre la membrana y el medio de cultivo.
- En caso de tener varias diluciones en una muestra, se debe iniciar la filtración de las diluciones mayores.
- Incubar las placas de Petri conteniendo el medio de m-Endo en posición invertida a 35 °C +/- 0.5 °C durante 22-24 horas.
- Después de cumplido el periodo de incubación, seleccionar para lectura los volúmenes filtrados de muestra que presenten recuentos entre 20-80 colonias típicas de coliformes totales color verde brillante.
- Auxiliarse de ser necesario, de la cuadrícula de la membrana filtrante para el recuento.



- Confirmar por lo menos cinco colonias con brillo metálico y transferirlo a tubos con caldo brilla incubando a 35 +/- 0.5 °C durante 24 a 48 horas. La formación de gas en los tubos Durham, así como la presencia de fermentación y turbiedad en los tubos a las 24 ó 48 horas confirma la presencia de coliformes totales.
- Anotar los resultados y calcular el resultado como en el caso de coliformes totales por el método de membrana de filtración.

### **Análisis de Datos**

#### **Resultados**

- Calcular la densidad de coliformes totales a partir del recuento de colonias típicas.
- Utilizar la siguiente fórmula:

Coliformes Totales= No de colonias típicas x 100

---

Volumen filtrado de muestra

- Calcular la densidad de coliformes totales a partir de la verificación usando la siguiente fórmula

Coliformes Totales/100 ml= AxB

---

C

A= Total de colonias típicas en la placa de m-Endo

B= Total de colonias positivas confirmadas en caldo brilla

C= 5

En el caso que el total de colonias en la placa de m-Endo sea menor de 5 se deben de confirmar todas las colonias.

#### **Registro de Datos**

- Los datos se deben de registrar en los libros de laboratorio (bitácoras) debidamente especificadas.

## ▪ Recuento de Coliformes Termotolerantes

### Método: Membrana de Filtración para agua potable y agua residual

#### A. Sección de procedimiento

##### Alcance y Aplicación

Esta técnica es utilizada para evaluar la calidad de las aguas de abastecimiento doméstico, aguas de uso recreacionales, agua usadas para la irrigación y aguas residuales.

##### Resumen del Método.

La determinación de coliformes termotolerantes en agua, se realizara a partir de las colonias positivas de coliformes totales en placas con medio m-Endo, los cuales son transferidos en tubos conteniendo medio EC, e incubadas durante 24 horas. La formación de gas en los tubos Durham, así como la presencia de fermentación y turbiedad en los tubos, se considera reacción positiva de coliformes termotolerantes.

##### Definiciones

- Coliformes Termotolerantes: son bacterias que forman parte del total del grupo coliforme y son definidos como bacilos gram-negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a  $44.5 \pm 0.2$  °C dentro de las  $24 \pm 2$  horas. La mayor especie del grupo coliformes termotolerantes es la *Escherichia Coli*. En la actualidad en la Norma Nacional se siguen llamando Coliformes Fecales.
- MF: membrana de filtración
- U.V: Ultravioleta
- UFC: Unidad formadora de colonia

##### Materiales y Equipo

- Horno de calor seco: modelo STM 135 (de convección mecánica) solid state Digital Control, con capacidad de mantener una temperatura de 170 °C por dos horas.
- Autoclave modelo STM-EI serie No 177960 con capacidad para esterilizar material a una temperatura de 121 °C por un tiempo de 15 minutos y 15 libras de presión. Debe ser equipada con una válvula de seguridad, un manómetro y un termómetro, para medir presión y temperatura durante el proceso.
- Incubadora bacteriológica: (gravity convection incubator) con capacidad de mantener una temperatura de  $35 \pm 0.5$  °C, lo mismo se debe verificar colocando un termómetro en su interior.
- Refrigeradora la cual debe ser para uso exclusivo del laboratorio, debe mantener una temperatura de 1 a 5 °C, se debe medir temperatura diariamente.
- Unidades de filtración: deben ser de vidrio, acero inoxidable o plástico autoclavable, no deben tener fugas.

- Equipo de vacío: bomba de vacío u otro dispositivo, capaz de producir una presión diferencial a la porta filtro.
- Frasco de filtración: el cual debe ser un kitasato de vidrio o en manifold. En donde se pueda colocar la unidad de filtración.
- Balanza analítica la cual debe tener una sensibilidad de 0.1 gramos.
- Destilador de agua: debe producir agua no toxica que pueda impedir el crecimiento de bacterias. Se debe de monitorear periódicamente, tanto la calidad física química como microbiológica adecuada que debe tener.
- Medidor de pH con un rango de medición de 0 a 14.
- Mechero Bunsen
- Agitador magnético
- Los frascos para toma de muestras: deben ser de vidrio o plástico (no corrosivos) capaces de resistir esterilización o bolsas plásticas estériles, con capacidad de al menos 130 mililitros. En el caso de los frascos los tapones deben estar cubiertos con papel resistente a la esterilización.
- Frascos de dilución deben ser de vidrio o plástico autoclavables con tapón de rosca y con capacidad de al menos 150 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml deben de ser exactas dentro de una tolerancia de +/- 2.5% con una graduación bien marcada y una punta intacta.
- Tubos de ensayo de 16x150 mm y campanas de Durham resistentes al autoclave.
- Placas de Petri estériles de vidrio autoclavables de 60x10 mm o placas estériles de plástico descartables de 50x12 mm.
- Membranas de filtración estériles de éster de celulosa blancas, cuadrículadas con un diámetro de 47 mm y una porosidad de 0.45 micras.
- Pinzas sin dientes con borde plano (esterilizadas con alcohol etílico al 95 %)
- Material necesario para la preparación de medios de cultivo (probetas, matraces, espátulas, magnetos).
- Asas de inoculación metálicas y con agujas de níquel-cromo o platino.
- Pipetas de acero inoxidable o aluminio cilíndricos o rectangulares de 5 a 7.5 cm de ancho y una longitud aproximada de 40 cm. En el caso de no disponer se sustituirá por envolturas de papel individuales.
- Materiales diversos como algodón, papel aluminio, tijeras, marcador indeleble, guantes, mascarillas, etc.
- Baño María con capacidad de mantener una temperatura de 44.5 +/- 0.2 °C.

### **Preparación de medios de cultivo y Reactivos**

- **Caldo EC:** Disolver 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y luego colocar 10 ml en tubos de ensayo de 16x150 mm, previamente colocar en el interior del tubo una campana de Durham invertida, ajustar el pH el cual debe ser 6.9 +/- 0.2. Tapar y autoclavar durante 15 minutos a 121 °C.

- **Agar MFC:** Disolver 52 gramos de medio deshidratado agar MFC en 1000 ml de agua destilada, calentar esta mezcla hasta ebullición. Luego adicionar 10 ml de una solución al 10% de ácido rosólico disuelto en hidróxido de sodio (NaOH 0.2N) mezclar y dejar ebullición nuevamente pH 7.4 +/- 0.2 °C.
- **Agua de dilución:** es necesario la preparación de dos soluciones stock A y B.

Solución Stock A: disolver 34 gramos de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 +/- 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en un litro de agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de Dilución: agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 5 ml de la solución stock B de cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a un litro de agua destilada, esterilizar en el autoclave.

- **Solución de Tiosulfato de sodio:** Disolver 3 g de Tiosulfato de Sodio en 100 ml de agua destilada y se obtendrá una solución al 3%. En los frascos para toma de muestras de agua clorada colocar 0.1 ml por cada 100 ml de muestra luego esterilizar.
- **Solución de Alcohol Etilico al 70%:** Disolver 740 ml de alcohol etílico al 95% en 260 ml de agua destilada y luego mezclar hasta su completa dilución.

### **Análisis de la Muestra**

- Antes de iniciar el análisis desinfectar el mesón de trabajo y disponer todos los materiales a usar.
- Preparar las placas de Petri de 48x8.5 mm conteniendo los medios de MFC agar identificadas con el número o código de muestra correspondiente.
- Realizar un control de calidad previo al análisis, filtrando 100 ml de agua destilada estéril y procediendo como si fuera una muestra más.
- Homogenizar la muestra 25 veces inclinando el frasco formando un ángulo de 45 grados aproximadamente entre el brazo y el antebrazo.
- Proceder a hacer diluciones en caso de ser necesario cuando se sospecha que la muestra está muy contaminada, para ello se transfiere con una pipeta estéril 10 ml de muestra original, a un frasco de dilución con 90 ml de agua de dilución, obteniendo la primera dilución  $10^{-1}$  y así continuar hasta la dilución que se considere necesaria. Si la muestra no necesita ser diluida se procede a filtrar 100 ml o menos volumen de muestra.
- Filtrar la muestra para el análisis de coliformes termotolerantes de la siguiente manera.
- Colocar la membrana filtrante con la ayuda de una pinza estéril en el porta filtro, con el lado cuadrado hacia arriba.
- Verter cuidadosamente en el portafiltro el volumen de muestra a ser examinado, evitando que el agua salpique los bordes superiores.
- Encender la bomba de vacío y proceder a la filtración.

- Apagar la bomba de vacío y finalizar la operación. Evitar secar excesivamente la membrana filtrante.
- Retirar la membrana del portafiltro con la ayuda de una pinza esterilizada con un mechero de alcohol, teniendo cuidado de no calentar demasiado y dejar enfriar al aire.
- Obedeciendo los cuidados de asepsia. Colocar cuidadosamente la membrana con la parte cuadrículada para arriba, en la superficie del medio de cultivo. Verificar que no hubo formación de burbujas de aire entre la membrana y el medio de cultivo.
- En caso de tener varias diluciones en una muestra, se debe iniciar la filtración de las diluciones mayores.
- Incubar las placas de Petri conteniendo el medio agar MFC en posición invertida a 44.5 °C +/- 0.2 °C durante 24 +/- 2 horas.
- El análisis de coliformes termotolerantes, se pueden realizar también a partir de las colonias positivas de coliformes totales en placas de m-Endo confirmando cada colonia positiva de coliformes totales en caldo EC, de igual manera se confirman las colonias típicas y atípicas de coliformes termotolerantes, colonias atípicas son de color gris a color crema.
- Rotular cada uno de los tubos conteniendo caldo EC, anotando el número de muestra y la fecha correspondiente a cada colonia característica tomada del medio MFC o en su caso m-Endo.
- Con un asa de inoculación estéril, transferir la colonia del medio a un tubo con caldo EC.
- Evitar que el tiempo entre la inoculación y la incubación exceda de 30 minutos.
- Incubar los tubos inoculados en un baño María a temperatura de 44.5 +/- 0.2 °C por 24 +/- 2 horas.
- Retirar los tubos del baño después del periodo de inoculación, se deben de agitar suavemente para observar la producción de gas. Seguidamente se procede a realizar la lectura considerando positiva toda formación de gas en los tubos de Durham, así como la fermentación y turbidez de los tubos con caldo EC
- Anotar los resultados y calcular el resultado según el número de colonias confirmadas a partir de agar MFC por el método de membrana de filtración.

### **Análisis de Datos**

#### **Resultados**

- Calcular la densidad de coliformes termotolerantes a partir del recuento de colonias típicas.
- Utilizar la siguiente fórmula:

Coliformes Termotolerantes/100 ml= No de colonias típicas x 100

---

### Volumen filtrado de muestra

- Tomar en cuenta el factor de dilución en caso de que se hayan hecho diluciones.
- Reportar el resultado como UFC/100 ml y anotar en el libro de registro de resultados de análisis.

### 2.3.8 Registro de Datos

- Los datos se deben de registrar en los libros de laboratorio (bitácoras) debidamente especificadas.
- en el registro de datos se debe de considerar anotar los siguientes aspectos, número de muestras, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, responsable del muestreo y fecha y hora del análisis, indicando los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

## METODOS ANALISIS FISICO-QUIMICOS

### ▪ **Análisis: Nitratos en Agua**

#### **Método: Espectrofotométrico Ultravioleta**

##### **Resumen del Método.**

El método Espectrofotométrico ultravioleta para análisis de nitratos se basa en medir la absorbancia del nitrato presente en la muestra previamente acidificada y filtrada a una longitud de onda de 220 nm. Ya que la materia orgánica disuelta puede absorber a una longitud de onda de 220 nm, se mide la absorbancia de la muestra a 275 nm para poder corregir el valor de nitrato corregido. La absorbancia de nitrato corregida se compara con una curva de calibración de patrones de nitrato de la cual se lee directamente la concentración de nitrógeno nitrato presente en la muestra.

Este método solo se aplica para determinar nitratos en muestras de agua con bajo contenido de materia orgánica como ser aguas superficiales no contaminadas y agua potable.

Mediante este procedimiento se puede determinar nitrógeno nitratos en un rango de concentración de 0.1 a 7 mg/l de nitrógeno nitrato a una longitud de onda de 220 nm en celdas de cuarzo de 1 centímetro.

El límite de detección de este método es de 0.02 mg/l de nitrógeno nitrato.

#### **Instrumentos y Materiales.**

- Espectrofotómetro UV/VIS UVIKON 922 para usarse a 220 y 275 nm. Con un paso de luz de 1 cm.
- Pipetas volumétrica de 0.5, 1, 2, 3, 5, 15, 25 ml.
- Matraces aforados de 50, 100, y 1000 ml.
- Celdas de cuarzo con un paso de luz de 1 centímetro.
- Beakers de 100 y 250 mL.

## Reactivos.

- Solución estándar de 1,000 mg/L de nitrógeno nitrato (marca comercial lote # K067-10 de Thomas Scientific).
- Solución estándar de 100 mg/l de nitrógeno nitrato.
- Se diluye 10 ml de la solución estándar de 1,000 mg/l de nitrato en un matraz volumétrico de 100 ml hasta la marca de aforo con agua desionizada. Preparar mensualmente.
- Solución estándar de 10 mg/l de nitrógeno nitrato.
- Se diluye 10 ml de la solución estándar de 100 mg/l de nitrógeno nitrato en un matraz volumétrico de 100 ml hasta la marca de aforo con agua desionizada. Preparar diariamente.
- Solución control de 227.272 mg/l de nitrógeno nitrato (marca comercial lote # 102509 de MERCK) y que es equivalente a una concentración de 1,000 mg/l de nitrato.
- Solución control de 200 mg/l de nitrógeno nitrato.
- Se diluye 88 ml de la solución control de 227.272 mg/l de nitrógeno nitrato en un matraz volumétrico de 100 ml hasta la marca de aforo con agua desionizada. Preparar mensualmente.
- Solución control de 10 mg/l de nitrógeno nitrato.  
Se diluye 5 ml de la solución control de 200 mg/l de nitrógeno nitrato en un matraz volumétrico de 100 ml hasta la marca de aforo con agua desionizada.  
Preparar diariamente.
- Solución control de 0.6 mg/l de nitrógeno nitrato.  
Se diluye 3 ml de la solución control de 10 mg/l de nitrógeno nitrato en un matraz volumétrico de 50 ml hasta la marca de aforo con agua desionizada.  
Preparar diariamente.
- Solución control de 100 mg/l de nitrógeno nitrato.  
Se diluye 44 ml de la solución control de 227.272 mg/l de nitrógeno nitrato en un matraz volumétrico de 100 ml hasta la marca de aforo con agua desionizada.  
Preparar mensualmente.
- Solución control de 6 mg/l de nitrógeno nitrato.  
Se diluye 3 ml de la solución control de 100 mg/l de nitrógeno nitrato en un matraz volumétrico de 50 ml hasta la marca de aforo con agua desionizada.  
Preparar diariamente.
- Solución de ácido clorhídrico 1 N.  
Se diluye aproximadamente 83 ml de ácido clorhídrico concentrado grado reactivo en unos 500 ml de agua desionizada, homogenizar y diluir a un litro en un matraz volumétrico.

## Procedimiento de Análisis.

- Pre tratamiento de la muestra:

Se ajusta la temperatura de la muestra a las mismas condiciones en que se elaboró la curva de calibración.

Si la muestra contiene sólidos en suspensión ésta se filtra utilizando una membrana con un poro de 0.45 micras de diámetro.

- **Análisis de la muestra:**  
Se prepara un blanco de reactivo el cual consiste en añadir agua desionizada a un matraz volumétrico de 50 ml y se continua con el mismo procedimiento de las muestras.
- Se tratan 50 ml o una porción diluida a 50 ml de la muestra así como las soluciones estándar utilizando agua desionizada y se agrega 1 ml de solución de ácido clorhídrico 1N y se mezcla el contenido.
- Después de 10 minutos en que se haya completado la reacción se mide la concentración de las muestras a 220 nm, interpolando en la curva de calibración seguidamente se lee la absorbancia de las muestras a 275 nm.
- Si la absorbancia de las muestras se encuentra fuera de la curva de calibración repita el análisis diluyendo la muestra apropiadamente.

### **Análisis de Datos.**

La concentración de nitrógeno nitrato en la muestra es directa obtenida de la interpolación en la curva de calibración expresada en unidades de mg/l de nitrógeno nitrato. En caso de que la muestra se haya diluido, la concentración directa de nitrógeno nitrato se multiplica por el factor de dilución correspondiente.

Debido a que el método es sensible a interferencia producida por la presencia de materia orgánica es preciso corregir las absorbancia tanto de las muestras como de los estándares de la siguiente manera:

$$A = A_{220} - 2 * A_{275}$$

Donde:

A = absorbancia de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> corregida por materia orgánica disuelta.

A<sub>220</sub> = absorbancia total de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y materia orgánica disuelta a 220 nm.

A<sub>275</sub> = absorbancia de materia orgánica disuelta a 275 nm.

Nota: Si el valor de corrección (= 2\* A<sub>275</sub> ) supera el 10 % el valor de absorbancia a 220 nm (= A<sub>220</sub> ) no se debe utilizar este método para determinación de nitrato.



Para calcular la concentración de nitrato a partir de la concentración obtenida de nitrógeno nitrato, se multiplica el resultado obtenido por el valor de 4.4 correspondiente para obtener la concentración de nitratos.

### **Sección de control y aseguramiento de la calidad**

- **Control de la Exactitud.**  
Con el fin de verificar la exactitud del análisis se puede utilizar una muestra control preparada por un laboratorio certificado. El contenido de la muestra se trata según las instrucciones y se analiza cómo se describe en la sección de procedimiento. El resultado obtenido se compara con su valor de referencia y límite de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del límite permisible se debe de revisar el procedimiento y repetir el análisis.
- **Control de la Precisión.**  
En caso de analizar un lote de 6 muestras se debe realizar un duplicado de una muestra cualquiera y la diferencia entre la muestra sencilla y su respectivo duplicado no debe ser mayor de 15 %.
- **Adición de estándar.**  
En cada lote de 6 muestras se analiza una muestra por duplicado el cual se le agrega 2 ml de la solución estándar 100 mg/l de nitrógeno nitrato. El porcentaje de recuperación del estándar debe estar entre 80 y 120 %.
- **Estándar de Control**  
La curva de calibración se verifica preparando por duplicado dos estándares de control de 0.6 y 6 mg/l de nitrógeno nitrato por cada lote de 6 muestras analizadas.

- **Análisis: Nitritos en Agua**

#### **Método: Colorimétrico Diazotización**

##### **Espectrofotometría**

#### **Resumen del Método**

La concentración de nitritos se basa en la formación de un colorante azoico rojizo-púrpura, que se produce a pH 2.0-2.5 por el acoplamiento del ácido sulfanílico diazotado, con el clorhidrato de N-(1-Naftil) etiléndiamina. Esta técnica se aplica para la determinación de Nitritos en agua potable, marina, natural (superficial y Profunda) y residuales (domestica e industrial).

Este método es adecuado para medir concentraciones de nitrito en un rango de 5 a 50 ug N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L. El límite de detección del método es de 0.01 mg/L.

### **Materiales/ Instrumentos/Equipo**

- Espectrofotómetro UVIKON 922 para uso a 543 nm, con paso de luz 1 cm.
- matraces volumétricos de 50 mL.
- Pipetas volumétricas de 2 mL.
- matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón esmerilado.
- Beakers de 500 mL.
- Bureta de 25 mL
- Probeta de 50 MI

### **Reactivos**

Nota: Se deben utilizar reactivos de grado analítico o superior que cumplan las normas internacionales de calidad (ACS, ISO).

- Agua libre de Nitritos

Nota: usar agua desionizada en todas las preparaciones de reactivos.

- Reactivo de Color: Para 800mL de agua desionizada añadir 100mL de ácido fosfórico al 85% y 10g. De sulfanilamida. Después de disolver completamente la sulfanilamida, añadir 1g. N- (naftil)-etilendiamina dihidrocloride. Mezclar para disolver y diluir a 1 litro con agua desionizada.

Esta solución es estable aproximadamente un mes cuando se almacena en un frasco oscuro y en refrigeración.

- Oxalato de Sodio Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0.05N: Disolver 3. 35g. de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> grado estándar primario en agua desionizada y llevar a un litro.
- Solución Madre de Nitritos NaNO<sub>2</sub>: Reactivo grado comercial, utilizar una botella nueva de reactivo para preparar la solución madre y almacenar en botellas bien cerradas para evitar la entrada de aire (ya que los nitritos se oxidan en presencia de humedad). Para determinar el contenido de NaNO<sub>2</sub> añadir un exceso conocido de solución estándar de KMnO<sub>4</sub> 0.05N, eliminar el color con una cantidad conocida de un compuesto patrón como oxalato de sodio 0.05N, titular por retroceso con solución estándar de permanganato de potasio.
- Preparación de la solución madre: Disolver en agua desionizada 1.232g. de NaNO<sub>2</sub> y diluir a 1000mL; 1.00mL = 250ugN. Preservar con 1.0 mL de cloroformo CHCl<sub>3</sub>.

- Estandarización de la solución madre de nitritos: Pipetear en el orden mencionado, 50 mL de  $\text{KMnO}_4$  0.05N (preparada y valorada como se indica más adelante), 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 50 mL de solución madre de nitritos en un matraz erlenmeyer esmerilado con tapón de 250 mL. Sumergir bien la punta de la pipeta bajo la superficie de la solución de permanganato con ácido durante la adición de la solución de nitritos.

Agitar suavemente y calentar en una parrilla a 70-80 °C. Eliminar el color del permanganato por adición añadiendo suficiente oxalato de sodio 0.05 N en porciones de 10 mL. Determinar el exceso de oxalato de sodio con  $\text{KMnO}_4$  0.05 N hasta el punto final, color rosa muy pálido. Determinar un blanco de agua exenta de nitritos a través del procedimiento y hacer las correcciones necesarias en los cálculos finales.

- Solución intermedia de Nitritos: Calcular el volumen G de la solución madre de nitritos requerido para la solución intermedia, con la siguiente ecuación:  $G = 12.5/A$ . Diluir a 250 mL este volumen G (aproximadamente 50 mL) con agua exenta de nitritos; 1.00mL = 50.0 ug N. Preparar diariamente.
- Solución Patrón de Nitritos: Diluir 10 mL de la solución intermedia de nitritos y llevar a 1000mL con agua desionizada; 1 mL = 0.500 ug N. Preparar diariamente.
- Solución Valorada de Permanganato de Potasio  $\text{KMnO}_4$  0.05N: Disolver 1.6 g. de  $\text{KMnO}_4$  en 1000mL de agua desionizada. Guardar en botella de vidrio ámbar con tapón esmerilado y dejar reposar durante una semana, decantar cuidadosamente el sobrenadante. Valorar frecuentemente esta solución por el siguiente procedimiento:

Pesar por triplicado muestras de oxalato de sodio anhidro  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  aproximadamente 0.1 mg en beakers de 500mL. Las muestras deben pesar entre 100 y 200 mg; a cada vaso añadir, por turno, 100mL de agua desionizada y agitar hasta disolución. Añadir 10 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1:1 y calentar rápidamente a 90-95°C. Titular rápidamente con la solución de permanganato, agitando continuamente, hasta un color rosa pálido que perdure por lo menos un minuto. No permitir que la temperatura baje de 85°C. Si es necesario, calentar el vaso durante la Determinación; 100 mg de oxalato de sodio consumirán aproximadamente 6 mL de permanganato. Correr un blanco con el agua desionizada y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

### **Calibración del Método**

- La serie de estándares de nitritos se prepara añadiendo con pipeta a un matraz volumétrico de 50 mL los siguientes volúmenes de la solución patrón de nitritos y diluir a 50 ml con agua exenta de nitritos. (Ver anexo 1. Cuadro de volumen de la solución patrón de nitritos versus concentración).
- Desarrollo de Color: añadir 2 mL del reactivo de color y mezclar.
- Medición fotométrica: Entre 10 minutos y 2 horas de reposo después de añadir el reactivo de color a los estándares, medir la absorbancia a 543 nm.

Nota: Para el manejo del espectrofotómetro consúltese el manual de operación.

## Análisis de la Muestra

- Remoción de sólidos suspendidos:

Si la muestra contiene sólidos suspendidos, filtrar a través de un filtro de membrana de 0.45 micras (u). En ausencia proceder directamente al paso siguiente.

- Desarrollo de Color:

Si el pH de la muestra no está entre 5 y 9, ajustar con HCl 1N o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como sea requerido.

Para 50.0 mL de muestra o una porción diluida a 50mL, añadir 2 mL del reactivo de color y mezclar.

- Medición fotométrica:

Entre 10 minutos y 2 horas de reposo después de añadir el reactivo de color a las muestras y estándares, medir la absorbancia a 543 nm. Usar como guía las siguientes trayectorias de luz para las concentraciones de  $\text{NO}_2^- \text{N}$  indicadas.

Trayectoria de luz cm	$\text{NO}_2^- \text{N}$ ug/L
1	2 – 25
5	2 - 6
10	< 2

## Análisis de Datos

- Se calcula el contenido de nitrógeno nitritos de la solución madre con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{(B \times C) - (D \times E) \times 7}{F}$$

Dónde:

A = mg/ml de nitrógeno nitritos en la solución madre.

B = mL totales de  $\text{KmnO}_4$  utilizados.

C = normalidad del  $\text{KmnO}_4$ .

D = mL totales de reductor añadido ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ )

E = normalidad del reductor.

F = mL de la solución madre de  $\text{NaNO}_2$  tomados para la valoración.

Cada mL de  $\text{KMnO}_4$  0.05 N consumidos por los nitritos corresponde a 1750  $\mu\text{g N-NO}_2$ .

- Se calcula la normalidad de la solución de permanganato de potasio de la siguiente manera:

$$\text{Normalidad del } \text{KMnO}_4 = \frac{\text{mg Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{(\text{A} - \text{B}) \times 67}$$

Dónde:

A = mL de valoración para la muestra

B = mL de valoración para el blanco

**Promediar los resultados de varias determinaciones.**

- Se calcular la concentración de Nitrógeno-nitritos en la muestra directamente de la curva de calibración.
- Para reportar los datos como nitrito se multiplica el resultado de la muestra por 3.3.

### **Control de Calidad**

- **Control de la Exactitud**

Para comprobar la exactitud del análisis se puede usar una muestra de control de un laboratorio certificado. Se manipula el contenido de la ampolla según las instrucciones y se analiza cómo se describe en la “Sección de Procedimiento”. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe de revisar el procedimiento y repetir el análisis.

- **Control de la Precisión**

En el caso de analizar una serie de muestras se debe realizar un duplicado después de cada seis muestras. La diferencia entre la muestra y el duplicado no debe ser mayor de 10%.

- **Adición del estándar**

En cada lote de muestras (aproximadamente 10) se trabaja una muestra por duplicado, al duplicado se le agrega (0.1mgN/L).El porcentaje de recuperación del estándar debe estar entre 95 y 105%.

- **Estándar de Control**

Para verificar la curva de calibración se puede llevar un estándar de nitritos de 0.02 y 0.2 mg N/L con cada lote de muestras.

- **Límite de Detección**

Se debe determinar el límite de detección del método como se indica en el manual de control de calidad analítica.

- **Método Análisis: Fosfatos**

**Método: Digestión con per-sulfato**

**Espectrofotometría**

**Resumen del método**

Debido a que el Fósforo está presente en combinación con materia orgánica se aplica el método de digestión de Per-sulfato para Fósforo Total el cual es capaz de oxidar efectivamente la materia orgánica liberando todo el Fósforo como Ortofosfato.

Seguidamente de la digestión se determina el ortofosfato liberado por el método colorimétrico (Cloruro Estañoso).

Este método es aplicable para la Determinación de Fósforo en aguas potables, superficiales, aguas salinas y aguas residuales domesticas e industriales.

El Fósforo se presenta en aguas naturales y aguas residuales en su mayoría solamente como fosfatos. Las que son clasificadas como Ortofosfatos, fosfatos condensados (pyro-, meta-, y otros polifosfatos), y fosfatos orgánicos. Estas formas de fosfatos pueden presentarse en forma soluble, en partículas de detritus, o en los cuerpos de organismos acuáticos. Este método es apropiado para análisis en un rango de 0.01 a 6 mg P/L.

**Materiales**

- Matraces volumétricos de 50, 100, 200 y 1000mL
- Matraces Erlenmeyer de 125 ó 250 mL.
- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3,4, 5, 10,15 y 20 mL.
- Embudos de cola
- Espátulas
- Balanza Analítica con precisión de 0.1 mg (AND ER-120A)
- Estufas
- Campana de gases
- Espectrofotómetro UVIKON 922 para uso a 690 nm, con paso de luz 1 cm.

## Reactivos

Nota: Se deben utilizar reactivos de grado analítico o superior que cumplan las normas internacionales de calidad (ACS, ISO).

Nota: Por lo general el tiempo de preservación de los reactivos es de un año como máximo, salvo que se indique lo contrario. Todos los reactivos se deben almacenar en recipientes adecuados provistos de etiquetas con el nombre del reactivo, fecha de preparación e iniciales del analista.

- Solución acuosa indicadora de Fenolftaleína: se disuelven 0.5 g de fenolftaleína en 100 ml de agua desionizada.
- Solución de Ácido Sulfúrico: cuidadosamente adicionar 300 mL de Ácido Sulfúrico concentrado a aproximadamente 600 mL de agua desionizada y diluir a 1 L con agua desionizada.
- Persulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , o Persulfato de Potasio  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Sólido.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) 1N: Se pesan 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven en agua desionizada lentamente manteniéndose en un baño de agua fría, diluir hasta un volumen de 1000 mL.
- Reactivo de Molibdato de Amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : Disolver 25 gramos de Molibdato de Amonio tetrahidratado en 175 mL de agua desionizada. Cuidadosamente adicionar 280 mL de Ácido Sulfúrico concentrado a 400 mL agua desionizada. Enfriar, adicionar la solución de Molibdato de Amonio y diluir a 1 L.
- Cloruro de Estaño  $(\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O})$ : Disolver 2.5 g de cloruro de estaño en 100 mL de Glicerina calentar en un baño de María y agitar hasta la completa disolución. Este reactivo es estable y no requiere ningún tipo de preservación o almacenamiento especial.
- Solución madre de 50 mg/L P-PO<sub>4</sub>: Pesar 0.2195 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y llevar a un litro con agua desionizada.
- Solución Patrón de 5 mg/L P-PO<sub>4</sub>: Tomar 10 ml de la solución madre y llevar a 100 ml con agua desionizada.

Nota: Se prepara la solución cada vez, antes de preparar la curva de calibración

- Solución Control de Fosfatos 1000 mg/L PO<sub>4</sub> (Merck)
- Solución Control de 20 mg/L PO<sub>4</sub>: tomar 2 ml de la Solución Control de Fosfatos de 1000 mg/L PO<sub>4</sub> y llevar a 100 mL de agua desionizada.
- Control Alto 0.654 mg/L P-PO<sub>4</sub>: Tomar 10 mL de la Solución Control de 20 mg/L PO<sub>4</sub> en 100 ml de agua desionizada.
- Control Bajo 0.033 mg/L P-PO<sub>4</sub>: Tomar 0.5 mL de la Solución Control de 20 mg/L PO<sub>4</sub> en 100 ml de agua desionizada.

## Calibración del método

- La serie de estándares de fósforo se prepara añadiendo con pipeta a un matraz volumétrico de 50 mL los siguientes volúmenes de la solución patrón de fósforo de 5 mg/L P-PO<sub>4</sub> y llevar a volumen con agua desionizada. (Ver anexo 1. Cuadro de volumen de la solución patrón de fósforo versus concentración).
- Seguir el procedimiento de análisis de la muestra de acuerdo al ítem 5

### **Análisis de la muestra**

- Digestión

Nota: Se prepara un blanco de reactivo tomando 50 ml de agua desionizada como volumen de muestra.

- Medir 100 mL o una dilución de la muestra en base a 100ml en un matraz volumétrico y trasvasar a un Erlenmeyer de 250 mL.
- Si la muestra esta preservada como se indica en el ítem 10.1, adicionar un ml de la solución de ácido Sulfúrico y 0.4 gramos de Persulfato de Amonio (NH<sub>4</sub>) S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ó 0.5 gramos de Persulfato de Potasio K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.
- Si la muestra no está preservada adicionar 1 gota de solución indicadora de Fenolftaleína. Si se desarrolla un color rosa, adicionar gotas de solución de ácido sulfúrico hasta que el color desaparezca. A continuación adicionar 1 mL de la solución de ácido sulfúrico y 0.4 gramos de Persulfato de Amonio (NH<sub>4</sub>) S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ó 0.5 gramos de Persulfato de Potasio K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.
- Dentro de la campana de gases colocar los Erlenmeyer en la estufa y digerir suavemente hasta un volumen final de 10 mL.
- Enfriar y lavar con agua desionizada las paredes del Erlenmeyer hasta un volumen aproximadamente de 30 mL.
- Agregar una gota de Fenolftaleína (incoloro) luego adicionar hidróxido de sodio 1N hasta un color rosa tenue y llevar a volumen en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada.
- Desarrollo de Color
- Adicionar a cada matraz volumétrico 4.0 mL del reactivo de molibdato de amonio y agitar, luego, añadir 0.5 mL (10 gotas) de Cloruro Estañoso y agitar nuevamente. El grado de desarrollo del color y la intensidad del color dependen de la temperatura final de la solución, un incremento en la temperatura de 1°C produce un incremento en color de alrededor de 1%.

Por tanto mantener las muestras, estándares, y reactivos con 2°C uno del otro en un rango de temperatura entre 20°C y 30°C.

- Medición del Color
- Después de 10 pero antes de 12 minutos, medir el color fotométricamente a 690 nm y compare con una curva de calibración.



## **Análisis de datos**

- Se calcula la concentración de Fósforo Total en la muestra a través de la siguiente ecuación:

Dónde:

mg P = Lectura obtenida en el Espectrofotómetro en un volumen final aproximadamente 104.5ml.

V = Volumen en ml de muestra usado en la digestión.

## **Control de calidad**

- Control de la Exactitud

Para comprobar la exactitud del análisis se puede usar una muestra control preparada en el por un laboratorio certificado. Se manipula el contenido de la ampolla según las instrucciones y se analiza cómo se describe en la “Sección de Procedimiento”. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe de revisar el procedimiento y repetir el análisis.

- Control de la Precisión

En el caso de analizar una serie de muestras se debe realizar un duplicado después de cada seis muestras. La diferencia entre la muestra y el duplicado no debe ser mayor de 10%.

- Adición del estándar

En cada lote de muestras (aproximadamente 10) se trabaja una muestra por duplicado, al duplicado se le agrega una concentración conocida de una solución estándar de fósforo total. El porcentaje de recuperación del estándar debe estar entre 95 y 105%.

- Estándar de Control

Para verificar la curva de calibración se puede llevar un estándar control de fósforo Total de 0.033y 0.654 mg/L P-PO<sub>4</sub> /L con cada lote de muestras.

- Límite de Detección

Se debe determinar el límite de detección del método como se indica en el manual de control de calidad analítica.

- Cartas de Control

Se debe de mantener al día las cartas de control de los blancos y el estándar de control como se indica en el manual de control de calidad analítica.

▪ **Análisis: Nitrógeno Amoniacal (Amonio)**

**Método: Kjeldalh**

**Resumen del método.**

**Para nitrógeno total Kjeldahl:**

La implementación de esta metodología de análisis para determinar concentraciones de nitrógeno total en las diferentes matrices dependerá exclusivamente de las cantidades de este analito presente en la muestra, para esto es importante considerar el tamaño de la muestra puesta al tratamiento normal. Esta forma de medición en nitrógeno total es llamada macro Kjeldahl debido a las cantidades grandes de muestra en concentraciones grandes de nitrógeno.

Entonces la muestra es digestada en presencia de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y sulfato de Cobre (CuSO<sub>4</sub>) como catalizador hasta obtener humos blancos de SO<sub>3</sub> o que las muestras desarrollen un color amarillo tenue. En este proceso el nitrógeno de muchos materiales orgánicos, incluyendo el amoniaco, se oxidan prontamente a amonio.

Después de la adición de una base, el amonio es destilado de un medio alcalino y absorbido en solución bórica para poder determinarse por el método volumétrico a través de una retro titulación utilizando un ácido mineral estándar.

Las reacciones son las siguientes:

En la digestión:

$N + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + H_2O + CO_2 + \text{otros productos de la muestra}$

En la destilación:

$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O$

En la recolección:

$NH_3 + H_3BO_3 \rightarrow NH_4^+ :H_2BO_3^- + H_3BO_3(\text{exceso})$

En la titulación:

$2NH_4^+ :H_2BO_3^- + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + 2H_3BO_3$

$$\text{Meq-g N} = \text{meq-g H}_2\text{SO}_4$$

### **Equipo y materiales.**

Toda la cristalería usada deberá de ser clase A

- Para la determinación de nitrógeno amoniacal hacemos uso del destilador, RapidStill II marca LABCONCO modelo 65200 provisto de un sistema de condensación para mantener la temperatura óptima de condensación de la muestra cerca de 50 °C.

Todos los equipos mencionados en este inciso vienen acompañados de su respectivo material.

- pH-metro marca ORION modelo 420 A con un sistema de compensación de temperatura.
- Balanza analítica marca AND modelo ER-120A.
- Pipetas volumétricas de diferente capacidad
- Erlenmeyer de 125 mL
- Bureta de 10 mL para titulación de la muestra.
- Matraces aforados de diferente capacidad.
- Frascos plásticos o de vidrio de diferente capacidad para almacenamiento de las soluciones preparadas.
- Beaker de diferente capacidad.
- Bureta de 50 mL para la estandarización del ácido sulfúrico.
- Rapid digestor 4-place.
- 4-fume removal system.
- Campana de gases.
- Perillas de hule o pipeteador.
- pipetas pasteur y perilla de 2ml para todas las operaciones de aforo.

### **Reactivos.**

Todos los productos químicos utilizados en esta prueba deben ser grado reactivo o grado ACS según sea el Reactivo utilizado. Todos los reactivos deberán ser hechos sobre agua libre de amoníaco.

- Agua libre amoníaco. Preparar por intercambio iónico o por destilación.
- Por intercambio iónico: Pasar el agua destilada a través de una columna de intercambio iones que contenga una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida mezclado con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, seleccionar resinas que remuevan los compuestos orgánicos que interfieran con la determinación de nitrógeno amoniacal. Algunas resinas de intercambio iónico tienden a liberar amoníaco; si esto ocurre preparar agua libre de amoníaco con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida.

Regenerar la columna de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Chequear el agua libre de amoníaco por la posibilidad de un alto valor de blanco. La resistividad óptima para los reactivos debe ser de 18.2ohms, y la mínima 18.1ohms.

- Por destilación: eliminar las trazas de amoníaco en el agua destilada por la adición de 0.1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado al agua destilada y redestilar, también se puede tratar el agua destilada con suficiente agua de bromo o cloro para producir un halógeno residual de 2 a 5 mg/L y redestilar y después dejar en reposo al menos 1h. descartar los primeros 100 mL de destilado. Chequear el agua redestilada por la posibilidad de un alto valor de blanco. Es muy difícil guardar el agua libre de amoníaco en el laboratorio sin contaminación por el amoníaco gaseoso. Sin embargo si es necesario el almacenamiento, guardar en un recipiente de vidrio herméticamente tapado al cual se le ha adicionado cerca de 10 g resina de intercambio iónico (preferiblemente una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida) por cada litro de agua libre de amoníaco para usar dejar decantar la resina, si se produce un valor de blanco alto reemplazar la resina o preparar agua libre de amoníaco fresca.
- Solución indicadora de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) para análisis titrimétrico.

Secar aproximadamente 30 gramos de ácido bórico en un desecador que contenga un agente desecante como ser Drierite® (sulfato de calcio anhidro) recién seco por un periodo de 24 horas. Después pesar aproximadamente 20 gramos de ácido bórico y disolverlo en 500 mL de agua destilada, adicionar 10 mL de una mezcla de indicadores y diluir a 1,000 mL con agua destilada.

La solución se almacena en un frasco plástico o en otro contenedor libre de boro. La solución tiene una vida útil de un mes desde el primer día de preparación.

- Mezcla de indicadores.

Pesar aproximadamente 200 mg de indicador rojo de metilo y aforar a 100 mL en un matraz con alcohol etílico o isopropílico al 95 %. Luego pesar aproximadamente 100 mg de indicador azul de metileno y aforar a 50 ml en un matraz con alcohol etílico o isopropílico al 95 % y mezclar las dos soluciones integras en un frasco de vidrio. La fecha de vencimiento de esta solución es de un mes después del primer día de su preparación.

- Solución de tetraborato de sodio 0,025 M.

Pesar aproximadamente 9,5 gramos de tetraborato de sodio decahidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>•10H<sub>2</sub>O) y disolverlo en una pequeña fracción de agua desionizada y luego aforarlo a 1,000 mL con agua desionizada.

- Solución amortiguadora de borato.

Adicionar a 500 mL de solución de tetraborato de sodio 0,025 M con 88 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N y diluir a 1,000 mL en un matraz volumétrico con agua desionizada.

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N.

Pesar aproximadamente 4 gramos de hidróxido de sodio en lentejas y disolverlo en 500 mL de agua desionizada bajo una campana extractora de gases y cuando este frío se completa el volumen a 1,000 mL con agua destilada hasta la marca de aforo.

- Solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio.

Pesar aproximadamente 500 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y 25 gramos de tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), disolverlo en una porción de agua y aforar a 1,000 mL con agua desionizada.

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 6 N.

Pesar aproximadamente 240 gramos de hidróxido de sodio y disolverlo en agua desionizada y aforar hasta la marca de aforo en un matraz volumétrico de 1,000 mL.

- Solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,02 N.

Se parte de una solución previa de ácido sulfúrico 0,1 N donde se miden 2.8 mL de ácido sulfúrico concentrado y se diluyen hasta 1,000 mL con agua destilada, de esta solución se miden 200 mL y se aforan a 1,000 mL con agua destilada en otro matraz volumétrico.

Valorar la solución de ácido sulfúrico 0,02 N con solución estándar de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,05 N como se describe en la sección de calibración del método.

- Solución patrón de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,05 N.

Pesar aproximadamente 0,25 gramos ( $\pm 0,002$  g) de carbonato de sodio (previamente seco en el horno a una temperatura de 250 °C por un período de 4 horas y puesto seguidamente en un desecador) y disolverlo en una porción agua destilada, unas ves disuelto se afora en un matraz volumétrico de 100 mL con agua destilada. Esta solución es estable por un periodo de una semana desde el momento de su preparación.

- Reactivo declorador. Disolver 3.5 g de tiosulfato de sodio

( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y diluir a un litro, preparar fresco semanalmente.

- Solución de 1,000 mg/l de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

Pesar aproximadamente 3.819 gramos de cloruro de amonio grado reactivo y disolverlo en una pequeña fracción de agua desionizada y después aforar a 1,000 mL con agua desionizada.

1ml = 1 mg de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

- Solución control de nitrógeno amoniacal (solución estándar) de 10mg/l: mL = 0.01 mg NH<sub>3</sub>-N. Diluir 10.0 mL de solución 1000ppm de N-NH<sub>3</sub> y aforar a 1 litro con agua libre de amonio.
- Solución de digestión:

Pesar aproximadamente 134 gramos de sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 7.3 gramos de sulfato de cobre (II) anhidro o 11.4 gramos de sulfato de cobre pentahidratado y disolverlo en 800 mL de agua destilada, seguidamente se adiciona 134 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado bajo la campana de gases usando protección para los ojos y guantes de protección y cuando este temporizado aforar la solución a 1,000 mL con agua desionizada. Para evitar la cristalización de las sales presentes en la solución se debe almacenar a una temperatura de 20 °C.

- Solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio.

Pesar aproximadamente 500 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y 25 gramos de tiosulfato de sodio pentahidratado (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O), disolverlo en una porción de agua y aforar a 1,000 mL con agua desionizada.

### **Calibración del equipo**

- Calibración del Rapidstill II

Suministre el agua de refresco al condensador accionando el switch de la bomba en ON. El caudal será regulado a 1 galón por el (3.8 litros por minuto). Tratar de mantener el agua recirculante en el tambo por encima de la mitad con agua destilada en caso de que este por debajo de la mitad agregar más agua.

Presione ' Switch de la caldera del agua '(Parte # 1, ver manual del rapidstill II). Mirando a través de la ranura de la visión de la caldera, llene caldera aproximadamente 2/3 lleno, o a la línea superior del frasco. Cuando se obtiene el nivel del agua apropiado, libere el switch.

- Antes de iniciar con el análisis de las muestras es importante realizar una limpieza al equipo de destilación RapidStill II, colocar en tubo digestor 100mL de agua desionizada + 4mL de solución amortiguadora de boratos (reactivo 8.5) y ajustar el pH a 9.5 con hidróxido de sodio y ácido sulfúrico y aliste un Erlenmeyer de 125ml de capacidad con 10ml de solución indicadora de ácido bórico.
- Encienda ' Switch de calentamiento de la caldera '(Parte #2) en la posición de ' ON ', deje por aproximadamente 10 minutos, o cuando el agua en la caldera esté en ebullición constante, la unidad estará lista para la operación.
- Coloque el tubo de limpieza preparado en 9.1.3 y poner en un erlenmeyer de 125ml de capacidad 10ml de solución indicadora de ácido bórico(color morado) en el tubo de entrega y poner a destilar por 10-15 minutos, en caso de que la solución se torne de color verde significa que el equipo tenía amoníaco.

- En caso de realizar destilaciones sucesivas apagar el Switch de calentamiento de la caldera ' (boiler heater) en la posición de OFF esperar 3 minutos y llenar de agua la caldera nuevamente Presionando ' Switch de la caldera del agua '(Parte # 1 ,ver manual del rapidstill II), retire con mucho cuidado el tubo digestor del rapidstill II usando guantes para el calor apropiados ,mascarilla y protección para los ojos apropiada ,volver a encender el ' Switch de calentamiento de la caldera ' en la posición de ON, y esperar para que el agua de la caldera vuelva a hervir y el equipo quedará listo para otra destilación.

#### **Calibración del rapid-digestor 4-place:**

- Conectar de forma adecuada como lo indica el manual del rapid-digestor, La unidad de cerámica debe ser colocada dentro de la campana de gases y la unidad de control debe estar afuera de la campana de gases, antes de usarse encenderlo y precalentar el equipo a 190°C por espacio de media hora antes de usarse.
- Calibración del 4-fume removal system
- Una vez colocados los tubos en el rapid-digestor colocar el 4- fume removal una vez colocado los tubos y conectarlo al sistema de inyección y abrir la llave para la absorción de los vapores corrosivos.

#### **Calibración del método titrimétrico.**

- Se valora la solución de ácido sulfúrico aproximadamente 0,02 N por duplicado haciendo uso de un patrón primario de carbonato de sodio de concentración conocida a una normalidad de 0,05 N.
- Mida 15 mL de la solución patrón de carbonato de sodio 0,05 N y se transfieren a un erlenmeyer de 250 mL, adicionar 40 mL de solución indicadora de ácido bórico para acuerpar la solución y titularla con la solución valorante de ácido sulfúrico 0,02 N hasta el cambio en la coloración del indicador que va de verde esmeralda hasta morado este análisis deberá ser hecho por duplicado con un blanco de titulación como referencia, en caso que los valores sean muy distintos realizar un triplicado, el tono de color dependerá de la persona que lo realice por lo que la persona que calibre realiza el análisis . La normalidad se calcula de la siguiente ecuación:

$$N = N_p \times V_p$$

Vac.

Donde:

$N_p$  = es la normalidad de la solución patrón de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

$V_p$  = volumen (mL) de solución patrón  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  utilizados para la titulación.

Vac. = volumen de ácido sulfúrico utilizado en la titulación.

5.2 También lo pueden hacer utilizando el método de estandarización con el pH metro usado en el PNO de alcalinidad.

### Procedimiento de análisis.

- Antes de iniciar con el análisis de las muestras es importante tener claro la sección 9 sobre calibración de equipo.
- Para análisis de nitrógeno total (N-NH<sub>3</sub>).
- Elija un volumen de muestra de acuerdo a la siguiente tabla y diluya a 50ml.

Nitrógeno orgánico en la muestra en mg/l	Tamaño de muestra en ml
4-40	50
8-80	25
20-200	10
40-400	5

- si no sabe en qué rango se encuentra la muestra elija un volumen de 50ml.
- Coloque la muestra en los tubos digestores.
- Agregue de 6-10 gránulos de Hengar o perlas de teflón a cada tubo digestor para prevenir explosiones y adicione con pipeta volumétrica 10ml del reactivo de digestión (solución 8.14). A cada tubo digestor.
- Alistar el digestor como lo dice la sección 9.2.1
- Colocar las muestras en el digestor y bajo la campana de gases y colocar el sistema de remoción de humos 4-fume removal system (este último es opcional no es indispensable), como lo indica la sección 9.3.1., no olvide encender la campana de gases y el extractor de laboratorio aunque use el 4-fume removal system.
- Pre evaporar las muestras a 190°C hasta que humos blancos sean observados (para observarlos colóquese al lado izquierdo de la campana de gases), esto ocurrirá cuando comience a ebullición la muestra (alrededor de 5-10 minutos, dependiendo del tipo de muestra)
- Luego subir la temperatura a 380°C y dejar la muestra por 30 min el volumen será reducido pero tenga cuidado no se seque un tubo pues se podría quebrar y dañar el equipo. Esto depende del tiempo de pre evaporación.



- Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente, esto es muy importante para que no haya pérdidas de nitrógeno.
- Una vez temperizados lo tubos adicionar un poco de agua desionizada con una piceta por las paredes de los tubos, el volumen de los tubos no debe exceder 30ml.
- Colocar la manguera de nalgene de la bomba peristáltica de hidróxido de sodio en un recipiente que contenga la solución de hidróxido -tiosulfato reactivo 8.15.
- Calibre el rapid-still II como lo indica la sección 4.1
- Una vez realizado todo el proceso de calibración del rapidstill II coloque con una leve torcedura en su lugar correspondiente en el rapidstill II colocar un Erlenmeyer de 125ml de capacidad 10ml de solución indicadora de ácido bórico en el tubo de entrega a la salida del condensador (asegúrese de que el orificio de abajo del tubo de entrega este en contacto con el líquido.
- Asegúrese de que la caldera este en ebullición adicione con el botón de adición de NaOH aproximadamente 10ml de solución observara la formación de una capa alcalina y la solución se tornará azul o verde.
- Inmediatamente coloque el tiempo de destilación en 5 minutos aproximadamente, recolecte de 40ml-50ml incluyendo la solución indicadora de ácido bórico, Si la solución cambia de morado a transparente o verde significa.
- Quite el líquido recolectado y coloque un Erlenmeyer u otro recipiente en el tubo de salida del condensador.
- Deje destilar por 2 minutos más para que se limpie el condensador, seguidamente apague el botón de calentamiento de la caldera boiler heater.
- Para seguir destilando vuelva a preparar el equipo como se indica en la sección 9.1.6
- Una vez recolectadas todas las muestras cuantificar titrimetricamente. Sección 12.3.
- Llevar un blanco a través de todos los pasos del proceso usando los mismos reactivos que se usaron en las muestras. Para hacer las correcciones respectivas. (Cabe decir que los blancos son los primeros que se destilan por preferencia).puesto que la cantidad de reactivos es bastante no es de extrañarse que blancos puedan salir positivos

#### **Cuantificación titrimétrica.**

- Cuando la destilación está completa, llene una bureta de clase A de 10mL de capacidad hasta su marca de aforo usando una pipeta con  $H_2SO_4$  0.02N el cual debe ser estandarizado como lo indica la sección de calibración del método (sección 10). Titule y anote el volumen consumido por las muestras, el cambio de color será de verde esmeralda o transparente a morado esto indica el punto final.

#### **Análisis de datos.**

La concentración de nitrógeno en la muestra es directamente obtenida por la titulación por retroceso calibración expresada en unidades de mg/l de nitrógeno total.

$$\text{Mg/l N} = \frac{(\text{mL ácido} - \text{mL en el blanco}) * \text{N H}_2\text{SO}_4 * 14.007 * 1000}{\text{ml de muestra original}}$$

ml de muestra original

Llevar un blanco en todos los pasos (si el blanco no cambia a verde esmeralda significa que no hay contaminación por parte de los reactivos usados en el proceso y su valor será de aproximadamente cero para el cálculo y servirá de referencia de color al momento de titular).

### **Control de calidad.**

- Control de la Exactitud.

Con el fin de verificar la exactitud del análisis se puede utilizar una muestra control preparada por un laboratorio certificado. El contenido de la muestra se trata según las instrucciones y se analiza cómo se describe en la sección de procedimiento. El resultado obtenido se compara con su valor de referencia y límite de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del límite permisible se debe de revisar el procedimiento y repetir el análisis.

- Control de la Precisión.

En caso de analizar una serie de muestras se debe realizar un duplicado por cada lote de 6 muestras y la diferencia entre la muestra y el duplicado no debe ser mayor de 20%.

- Adición de estándar.

En cada lote de 6 muestras se analiza una muestra por duplicado el cual se le agrega 0.5 mL de la solución estándar 1000mg/L con una micropipeta de N-NH<sub>3</sub> y se afora con la muestra a 50ml en un matraz de modo por cuantificación titrimétrica modo que la concentración solo del analito sea de 10mg/l teórico y el porcentaje de recuperación este entre 80 y 120 %.

- Estándar de Control

Se verifica preparando un estándar de control de 10mg/L de N-NH<sub>3</sub> por cada lote de muestras para el método titrimétrico el cual también servirá para verificar el valor práctico de la fortificación pues deberá hacerse con la misma solución.

## **Anexo 6**

Plano del área disponible para la construcción del Laboratorio Analítico

