

**SEGUNDA SECCION**  
**PODER EJECUTIVO**  
**SECRETARIA DE SALUD**

**PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY NOM-250-SSA1-2014, Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua y requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados, su control y vigilancia. Procedimiento sanitario de muestreo.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39, de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4, de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3, fracciones XIII y XV, 13, Apartado A, fracciones I y II, 116, 118, fracciones I, II, V y VII, 119, fracción II, 393, 394, 395, 396 fracción I y 399, de la Ley General de Salud; 40, fracciones III y XI, 41, 43, 45, 47, fracción I y 52, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 214, 224, 227, del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios y 3, fracciones I, literal o) y II, y 10, fracciones IV y VIII, del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios; he tenido a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación, del

**PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY NOM-250-SSA1-2014, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE LA CALIDAD DEL AGUA Y REQUISITOS SANITARIOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS SISTEMAS DE ABASTECIMIENTO DE AGUA PÚBLICOS Y PRIVADOS, SU CONTROL Y VIGILANCIA. PROCEDIMIENTO SANITARIO DE MUESTREO**

El presente Proyecto se publica a efecto de que los interesados, dentro de los siguientes 60 días naturales, posteriores a su publicación, presenten sus comentarios por escrito, en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, sito en Oklahoma número 14, colonia Nápoles, Delegación Benito Juárez, código postal 03810, México, Distrito Federal, teléfono 5080 5200, extensión 1333, fax 5511 1499, correo electrónico rfs@cofepris.gob.mx.

Durante el plazo mencionado, los documentos que sirvieron de base para la elaboración del Proyecto, así como su Manifestación de Impacto Regulatorio, estarán a disposición del público para su consulta en el domicilio del Comité.

**PREFACIO**

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes instituciones y organismos:

**SECRETARÍA DE SALUD.**

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

**SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES.**

Comisión Nacional del Agua.

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Instituto de Servicios de Salud del Estado de Aguascalientes.

Comisión Estatal de Protección Contra Riesgos Sanitarios del Estado de Sonora.

Dirección de Fomento y Regulación Sanitaria del Estado de Querétaro.

**SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO DE ZACATECAS.**

Dirección de Regulación y Fomento Sanitario.

Comisión para la Protección contra Riesgos Sanitarios del Estado de Campeche.

Comisión para la Protección contra Riesgos Sanitarios del Estado de Hidalgo.

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

Instituto de Ecología.

Instituto de Ingeniería.

Facultad de Medicina.

LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.  
PALL CORPORATION.  
MÉTODOS RÁPIDOS, S.A. DE C.V.

## ÍNDICE

0. Introducción.
1. Objetivos.
2. Campo de aplicación.
3. Referencias.
4. Definiciones.
5. Símbolos y abreviaturas.
6. Requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua.
7. Control sanitario del sistema de abastecimiento de agua.
8. Vigilancia del sistema de abastecimiento de agua.
9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas.
10. Procedimiento de evaluación de la conformidad.
11. Bibliografía.
12. Observancia de la Norma.
13. Vigencia.
14. Apéndices.

**Apéndice A Normativo.** Guía para la elaboración del PEMA,

**Apéndice B Normativo.** Guías de procesos para la potabilización del agua.

**Apéndice C Normativo.** Procedimientos para el muestreo.

**Apéndice D Normativo.** Métodos de prueba.

**Apéndice E Informativo.** Guías de calidad del agua para uso y consumo humano.

### 0. Introducción.

La vigilancia de la calidad del agua para uso y consumo humano, tiene como objetivo prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas y parasitarias, así como las derivadas de la continua ingestión de sustancias tóxicas que puede contener el agua abastecida a la población. Ésta debe contemplar programas estructurados por las autoridades competentes, para evaluar el control de calidad que llevan a cabo los organismos operadores responsables de los sistemas de abastecimiento y en función de estos programas, apoyarlos a fin de que se garantice el suministro de agua potable a la población.

Por ello, la Secretaría de Salud, estableció en el año 1991, el Programa de Monitoreo de Cloro Residual en todas las entidades federativas como una medida de control ante la reaparición del cólera en el país. La desinfección del agua destinada al uso y consumo humano asegura la inactivación o destrucción de la mayor parte de los agentes patógenos que se pueden transmitir a través del agua al ser humano.

Como en muchas otras enfermedades diarreicas, el cólera se asocia a la ingesta de agua y alimentos contaminados y a la práctica deficiente de medidas higiénicas y de saneamiento del ambiente.

En México, el cólera reapareció en 1991 en una comunidad rural del Estado de México, después de no haberse registrado ningún caso en el territorio nacional por más de un siglo. En ese año se notificaron 2,690 casos en 17 estados, la mayoría de ellos del centro, sur y sureste del país. La enfermedad tuvo un comportamiento ascendente hasta alcanzar el mayor número de casos en 1995 (16,430). A partir de esa fecha, la notificación se redujo drásticamente, con 71 casos en 1998, nueve en 1999 y cinco en el año 2000.

Atento a lo anterior, en el año 1991, el Ejecutivo Federal puso en marcha el Programa Agua Limpia, en el que se definieron acciones conjuntas entre la Secretaría de Salud y la Comisión Nacional del Agua, con los prestadores de servicio de agua potable y alcantarillado, con la finalidad de conjuntar los esfuerzos y proporcionar agua de calidad adecuada para los diversos usos, fundamentalmente para consumo humano.

En el periodo de 1991 al 2000, todas las entidades federativas, a excepción de Baja California, notificaron casos de cólera.

Para contener primero y después abatir esta situación, es importante que el agente desinfectante mantenga su capacidad de desinfección durante el almacenamiento y distribución del agua potable y el adecuado control sanitario contra la contaminación que se pueda producir por conexiones cruzadas o fugas.

Aunado a lo anterior, se planteó mediante evidencia que asegura que a una concentración entre 0.9 y 1.5 mg/L de cloro libre residual en el agua, la probabilidad de supervivencia de organismos patógenos es menor a 0.01%, lo que sustentó en su momento, el establecimiento del límite permisible en la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización; y la posterior publicación de la Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998, Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por sistemas de abastecimiento público, cuya aplicación fue complementada con la publicación de la Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. Lo anterior propició que el control y vigilancia del agua de suministro a la población, estuviera contemplado en varios ordenamientos, lo que a la postre generó una serie de circunstancias no adecuadas en su correcta aplicación.

Por ello se estima conveniente establecer en un solo Instrumento las especificaciones y requisitos sanitarios que debe observar un sistema de distribución de agua, así mismo regular las acciones conjuntas que realizan los tres niveles de gobierno en coordinación con los organismos operadores responsables de agua de la república mexicana, a efecto de dar cumplimiento a lo establecido en el artículo cuarto, párrafo sexto, de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.

Por lo anterior, la Secretaría de Salud, propone esta Norma, con el propósito de establecer los requisitos sanitarios de las características que deben cumplir los organismos operadores responsables de agua potable públicos o privados, en instalaciones y equipos de las obras hidráulicas de captación, conducción, desinfección, potabilización, almacenamiento, regulación, distribución y vehículos cisterna, así como la instrumentación de su programa interno de evaluación y manejo de los riesgos del agua. A fin de prevenir y disminuir enfermedades infecciosas, parasitarias y las derivadas de la continua exposición a sustancias tóxicas que puede contener el agua abastecida a la población. Así como, normalizar los programas de control y seguimiento por parte de los responsables de operar, mantener y administrar el sistema de abastecimiento y de la vigilancia de estos programas, por parte de la autoridad sanitaria para preservar la calidad del agua desde la obra de captación de la fuente de abastecimiento hasta la entrega al consumidor.

## **1. Objetivos**

### **1.1. Esta norma tiene por objeto:**

**1.1.1.** Establecer los requisitos sanitarios que deben cumplir las instalaciones hidráulicas de los sistemas de abastecimiento de agua.

**1.1.2.** Establecer el procedimiento que deben seguir los responsables de los sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados, para implementar un Programa Interno de Evaluación y Manejo del Agua que asegure el control de los parámetros y puntos del sistema, considerados como factor de riesgo para la población.

**1.1.3.** Establecer los límites máximos permisibles de la calidad del agua para uso y consumo humano.

**1.1.4.** Establecer las guías de procesos para la potabilización del agua.

**1.1.5.** Establecer el procedimiento sanitario de muestreo.

## **2. Campo de aplicación**

**2.1.** Esta Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional para los organismos públicos o privados, responsables de suministrar agua para uso y consumo humano a la población.

## **3. Referencias**

**3.1.** Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida.

**3.2.** Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasado y a granel. Especificaciones sanitarias.

## **4. Definiciones**

Para efectos de esta Norma se entiende por:

**4.1. Ademe:** a la estructura tubular de material pétreo, metálico o polímeros de diámetro y espesor definidos, liso o ranurado, cuya función es evitar el derrumbe o colapso de las paredes del pozo que afecten la estructura integral del mismo; en su área ranurada permite el flujo del agua hacia los elementos mecánicos de impulsión de la bomba.

**4.2. Afloramiento:** al punto o zona por donde fluye el manantial hacia la superficie.

**4.3. Agua de primer uso:** a la proveniente de distintas fuentes naturales y de almacenamientos artificiales que no han sido objeto de uso previo.

**4.4. Agua para uso y consumo humano:** al agua que no contiene contaminantes, ya sean químicos, radiológicos o agentes infecciosos, en concentraciones superiores a los límites máximos permisibles y que no causa efectos nocivos a la salud humana, también se denomina agua potable.

**4.5. Agua subterránea:** a la que se encuentra dentro de la litósfera y se extrae a través de pozos.

**4.6. Agua superficial:** a la que fluye sobre la superficie del suelo a través de arroyos, ríos, o que se almacena en lagos o embalses, ya sean naturales o artificiales.

**4.7. Agua tipo I:** al agua con una conductividad  $\leq 0.010 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

**4.8. Ala o alero:** a la parte de la estructura de la captación que actúa como barrera impermeable, marca el límite lateral de la captación y permite que el agua sea conducida a la cámara húmeda.

**4.9. Área de captación:** a la comprendida entre la cámara húmeda, los aleros y la zona o punto de afloramiento.

**4.10. Área de protección:** al sector circular comprendido entre la captación y un radio de 100 a 150 metros hacia atrás como medida de recarga del acuífero.

**4.11. Autoridad:** a la entidad pública que coadyuva a la vigilancia del cumplimiento de la presente Norma.

**4.12. Autoridad Sanitaria:** a la **Secretaría de Salud y a los gobiernos de las entidades federativas incluyendo el Gobierno del Distrito Federal** responsables de la vigilancia del cumplimiento de la Ley General de Salud y demás disposiciones que se dicten con base en ella.

**4.13. Blanco de método:** a la alícuota de agua destilada a la cual, junto a las muestras de agua a analizar, se le sigue todo el procedimiento del análisis.

**4.14. Brocal:** a la base de concreto perimetral del ademe del pozo, colocada en el extremo superior del mismo.

**4.15. Cámara húmeda:** a las cajas cerradas, impermeables de concreto reforzado o de mampostería de piedra o de tabique.

**4.16. Carbono inorgánico:** a los carbonatos, bicarbonatos y dióxido de carbono.

**4.17. Carbono orgánico:** a todo aquel carbono enlazado covalentemente a moléculas orgánicas.

**4.18. Carbono orgánico disuelto:** a la fracción del carbono orgánico que pasa a través del filtro de fibra de vidrio con poro, de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro.

**4.19. Carbono orgánico purgable:** al grupo de parámetros analíticos que comprende a los compuestos orgánicos volátiles no halogenados.

**4.20. Clase A:** a la clasificación del material volumétrico, en base a su precisión.

**4.21. Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos:** al grupo de parámetros analíticos que, comprende a los halogenados no volátiles como las dioxinas y furanos, herbicidas clorados, bifenilos policlorados, plaguicidas clorados y semivolátiles clorados.

**4.22. Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables:** al grupo de parámetros analíticos que comprende a los halogenados volátiles como los halometanos, hidrocarburos clorados de bajo peso molecular y volátiles clorados.

**4.23. Compuestos orgánicos no halogenados:** al grupo de parámetros analíticos que, comprende a los carbamatos, hidrocarburos poliaromáticos, plaguicidas fosforados, compuestos orgánicos semivolátiles no clorados, endotal, glifosato y plaguicidas derivados de la urea.

**4.24. Contingencia:** a la situación imprevista que puede ocasionar un cambio en las características del agua, que ponga en riesgo la salud humana.

**4.25. Contraademe:** a la tubería utilizada en la ampliación de la parte superior de un pozo, cuya función es evitar derrumbes, entradas de aguas superficiales e infiltraciones que contaminen el acuífero.

**4.26. Contracuneta:** a la extensión de talud de la cuneta revestida de concreto, la cual se construye para proteger a ésta de deslaves.

**4.27. Cuneta:** a la zanja de desagüe de la precipitación pluvial, revestida de concreto.

**4.28. Desinfección:** a la acción de inactivar o destruir microorganismos por medio de la aplicación de productos químicos o procesos físicos.

**4.29. Diagrama de flujo:** a la representación secuencial de las fases u operaciones llevadas a cabo en el sistema de abastecimiento.

**4.30. Estación de bombeo o rebombeo:** al conjunto de estructuras y equipos que sirven para aumentar la presión del agua con el fin de elevarla a niveles más altos o para mantener uniforme la presión en las redes de distribución.

**4.31. Grifo o válvula:** al instrumento o accesorio con manivela que al ser accionado abre, regula y cierra el flujo de agua en su punto de salida.

**4.32. Límite máximo permisible:** a la concentración o contenido máximo o intervalo de valores de un componente que, no causará efectos nocivos a la salud del consumidor.

**4.33. Manantial:** al afloramiento natural de agua subterránea a la superficie, éstos pueden ser de ladera o de fondo.

**4.34. Mantenimiento:** a las acciones de lavado, desinfección y conservación de los sistemas de abastecimiento.

**4.35. Material sanitario:** al que es fácil de lavar, desinfectar, no absorbente, inerte y que no cede sustancias tóxicas.

**4.36. Método de prueba:** al procedimiento analítico aprobado por la autoridad sanitaria y utilizado en el laboratorio para comprobar que el agua satisface las especificaciones de esta Norma.

**4.37. Obra de captación de agua subterránea:** a la obra de ingeniería que permite alumbrar o extraer agua del subsuelo, con fines de abastecimiento de agua para uso y consumo humano. Llámese noria, pozo artesiano, galería, pozo radial, pozo profundo o cualquier otro similar.

**4.38. Obra de captación de cuerpos de agua superficial:** a cualquier estructura o depósito que tiene por objeto la captación, derivación o desvío del agua superficial.

**4.39. Organismo operador responsable:** a la instancia encargada de operar, mantener o administrar el sistema de abastecimiento de agua.

**4.40. Parámetros de control:** a las características del agua que dan un aviso anticipado de una deficiencia e indican un riesgo inmediato para la salud.

**4.41. Peligros sanitarios:** a los agentes físicos, biológicos, microbiológicos, químicos o radiológicos que representen un riesgo a la salud.

**4.42. Programa de evaluación y manejo del agua (PEMA):** al programa interno instituido para la detección, análisis, priorización y control de los peligros sanitarios en el sistema de abastecimiento de agua, que permita un adecuado manejo de los riesgos a los que está expuesta la población por el uso y consumo de agua del abastecimiento público, también conocido internacionalmente como Plan de Seguridad del Agua.

**4.43. Plantilla:** al brocal para la protección superficial del pozo.

**4.44. Potabilización:** al conjunto de operaciones y procesos, físicos o químicos que se aplican al agua en los sistemas de abastecimiento, a fin de hacerla apta para uso y consumo humano.

**4.45. Punto de control:** a la etapa en el sistema de abastecimiento de agua, donde se puede aplicar una medida para prevenir o eliminar un peligro para la seguridad del agua potable.

**4.46. Red de distribución:** al conjunto de tuberías que sirven para llevar el agua hasta el consumidor final.

**4.47. Registro:** a la abertura con tapa que permite la entrada de personal para acciones de limpieza y mantenimiento de la infraestructura.

**4.48. Rompeolas:** a las mamparas fijas en el interior de la cisterna, colocadas transversal y verticalmente para evitar movimientos violentos de agua.

**4.49. Sardinel:** a la estructura en el borde superior del registro donde descansa la tapa.

**4.50. Sistema de abastecimiento de agua:** al conjunto de elementos integrados por las obras hidráulicas de captación, almacenamiento, conducción, potabilización, desinfección, regulación y distribución de agua para uso y consumo humano, incluyendo vehículo cisterna.

**4.51. Tanque de almacenamiento o regulación:** al depósito para almacenar el agua o regular su distribución.

**4.52. Toma domiciliaria:** a la válvula o grifo de la red de distribución del sistema de abastecimiento de agua en donde el usuario final la obtiene.

**4.53. Vehículo Cisterna:** al vehículo provisto de depósito para transportar y distribuir agua para uso y consumo humano.

## 5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas, se entiende por:

5.1 %	Por ciento.
5.2 <	Menor que.
5.3 >	Mayor que.
5.4 ±	Más menos.
5.5 °C	grados Celsius.
5.6 µg	microgramo.
5.7 µm	micrómetro.
5.8 µS/cm	µSiemens/cm.
5.9 a	Factor de prueba.
5.10 AOX	Compuestos Orgánicos Halogenados Adsorbibles.
5.11 APPC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos.
5.12 As	Arsénico.
5.13 cm	Centímetro.
5.14 CME	Conjugado microcistina-enzima
5.15 CONAGUA	Comisión Nacional del Agua.
5.16 DPD	Dietil-p-difenildiamina
5.17 DGN	Dirección General de Normas.
5.18 <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
5.19 Fe	Fierro.
5.20 g	gramos.
5.21 h	hora.
5.22 HCl	Ácido Clorhídrico concentrado
5.23 HCN	Ácido Cianhídrico
5.24 Hg	Mercurio.
5.25 K	Potasio.

5.26 kg	Kilogramo.
5.27 KI	Yoduro de Potasio.
5.28 L	Litro.
5.29 LR	Levo-rotativo.
5.30 m	metro.
5.31 M	Molaridad.
5.32 MCC	Muestra de control de calidad.
5.33 MCI	Muestra de control interno.
5.34 mg	miligramos.
5.35 min	minuto.
5.36 mL	mililitro.
5.37 mm	milímetro.
5.38 N	Normalidad.
5.39 nm	nanómetro.
5.40 NMP	Número Más Probable.
5.41 OD	Densidad Óptica
5.42 p	Peso
5.43 Pb	Plomo.
5.44 PC	Parámetro de Control.
5.45 PCC	Puntos Críticos de Control.
5.46 PEMA	Programa de Evaluación y Manejo del Agua.
5.47 pg	Pico gramo.
5.48 ppb	Partes por billón.
5.49 ppm	Partes por millón.
5.50 PTFE	Politetrafluoroetileno.
5.51 r	Coeficiente de correlación de la curva.
5.52 RA	Reactivo analítico.
5.53 RMV	Milivolts relativos.
5.54 rpm	Revoluciones por minuto.
5.55 s	Segundo.
5.56 Se	Selenio.
5.57 THM	Trihalometanos.
5.58 UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
5.59 UTN	Unidades de Turbiedad Nefelométricas.
5.60 UV	Ultra Violeta

#### **6. Requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua**

Las características mínimas que deben tener las construcciones, instalaciones y equipos que integran el sistema de abastecimiento de agua, desde la obra de captación en la fuente de abastecimiento hasta la entrega al consumidor son las siguientes:

**6.1.** Las obras de captación, instalaciones hidráulicas y equipos que conforman los sistemas de abastecimiento de agua deben contar con la tapa y protección sanitaria que impida la introducción de vectores, desechos sólidos, líquidos o excretas, infiltraciones de agua, paso de animales y permita la entrada únicamente a personal autorizado, mediante:

**6.1.1.** Cercas de malla de alambre, muros o bardas y puertas con cerraduras, candados o sistemas de seguridad;

**6.1.2.** Losa de concreto, cunetas, contracunetas o canales de desviación, ubicadas en el perímetro de la instalación;

**6.1.3.** Sellos impermeables en juntas y uniones de tuberías, entre ademe y columna, equipos y sus accesorios;

**6.1.4.** Resane e impermeabilización de fisuras o fracturas en estructuras que contengan agua;

**6.1.5.** Tela tipo mosquitero o similar, en dispositivos de ventilación, rejillas, tubos u otros ductos;

**6.1.6.** Tapas envolventes al sardinel, con candado en los registros y pozos;

**6.2.** Las obras de captación de manantiales deben contar además con:

**6.2.1.** Sello sanitario de protección de la fuente, consistente en muros, en ala o losas de concreto que sirvan de pantalla a las filtraciones subsuperficiales para los manantiales de ladera o losa perforada para los manantiales de fondo. En cualquier caso debe contar con material pétreo filtrante entre los muros de protección y el afloramiento, consistente en material clasificado en dos capas; una capa inferior constituida por piedra de diámetro mínimo de 5 cm, colocadas hasta una altura de 5 cm por encima del orificio superior de entrada a la cámara recolectora y una capa superior de material granular de espesor de 2 a 2.5 cm, hasta cubrir completamente el nivel de las filtraciones y la excavación realizada;

**6.2.2.** En manantiales de ladera se deberá contar en su área de captación e impermeabilización del fondo del terreno excavado, con una pendiente mínima de 2% comprendido entre la cámara húmeda y las filtraciones, a fin de que éstas discurran sobre aquél y puedan ingresar a ella a través de orificios perforados en el muro respectivo;

**6.2.3.** Cámara húmeda o colectora, que cuente con registro con tapa envolvente al sardinel y candado. Tubo vertedor de demasías o cono de rebose con protección en la parte terminal consistente en tela de malla de alambre, y

**6.2.4.** Canal de escurrimiento o contracunetas, 10 m pendiente arriba del manantial con las dimensiones adecuadas considerando el área de protección.

**6.3.** Las obras de captación de aguas subterráneas deben contar además con:

**6.3.1.** Ademe que debe sobresalir cuando menos 0.50 m por encima del nivel del terreno natural o sobre-elevado;

**6.3.2.** Contraademe que debe sobresalir 0.20 m como mínimo del nivel del terreno natural o sobre-elevado. El espacio anular entre el contraademe y la formación adyacente será rellenado por completo con una lechada de cemento normal;

**6.3.3.** Brocal o tapa que impida el paso de material extraño al interior, y

**6.3.4.** Plantilla alrededor que debe construirse con una pendiente del 2%, de tal modo que el agua no escurra hacia el ademe.

**6.4.** Los tanques de almacenamiento o regulación y estaciones de bombeo para abastecer agua, directamente a la red de distribución, deben contar además con los siguientes dispositivos:

**6.4.1.** Ductos de ventilación en forma de "u" o de codo invertido, de tal manera que la entrada-salida del aire este dirigida hacia el suelo;

**6.4.2.** Caja colectora de sedimentos.

**6.4.3.** Tubos para desfogue, y

**6.4.4.** Las paredes interiores deben ser o estar recubiertas de material sanitario.

**6.5.** Para las redes de distribución, se debe considerar lo siguiente:

**6.5.1.** Las redes construidas posteriormente a la entrada en vigor de esta norma, deberán ubicarse a un nivel de por lo menos 1 m por arriba del alcantarillado y a la máxima distancia posible de éste.

**6.5.2.** Cuando se presenten interrupciones en el suministro de agua, debido a fallas mecánicas, eléctricas, por mantenimiento o de cualquier otra causa, al restablecimiento del servicio, se debe reforzar la desinfección del agua.

**6.5.3.** Se debe preservar la calidad microbiológica del agua en cualquier parte del sistema hasta en los puntos más alejados de la red de distribución, mediante la desinfección continua y permanente del agua.

**6.6.** Los vehículos cisterna deben cumplir con los siguientes requisitos sanitarios:

**6.6.1.** Recibir su carga de obras de captación o líneas de distribución de sistemas de abastecimiento de agua público o privado. La toma se hará después del sistema de potabilización, de tal forma que se garantice dicha calidad en el agua cargada.

**6.6.2.** Las paredes internas y rompeolas deben ser o revestirse con material resistente a la oxidación y corrosión.

**6.6.3.** Contar con registro, que permita el acceso de una persona al interior del depósito, para efectuar el mantenimiento; en el caso que los rompeolas formen compartimientos separados, cada uno de ellos debe tener registro de acceso.

**6.6.4.** El dispositivo del registro para la ventilación, no debe permitir derrames de agua o introducción de material extraño.

**6.6.5.** Para la distribución del agua, se debe contar con válvula de salida de cierre hermético y manguera de distribución flexible y de material inerte al agua.

**6.6.6.** La manguera y los dispositivos de distribución debe encontrarse en buenas condiciones, sin presentar fugas, evitándose en todo momento el contacto de sus extremos con el piso.

**6.6.7.** Al terminar la operación de llenado, se debe mantener cerrado el tanque hasta realizar nuevamente la operación de llenado.

**6.6.8.** Para el vaciado completo del depósito, se debe contar con válvula o dispositivo de salida de cierre hermético en el fondo.

**6.6.9.** Las conexiones entre el depósito, la válvula y la manguera de distribución no deben presentar fugas de agua.

**6.6.10.** Si cuenta con bomba para la distribución de agua, la misma no debe presentar fugas de combustible o lubricantes.

**6.6.11.** Debe utilizarse exclusivamente para el transporte de agua para uso y consumo humano y se debe mantener limpia y en buenas condiciones.

**6.6.12.** Debe ostentar en el exterior y en ambos lados, con letras y números grandes, visibles y en color contrastante lo siguiente:

**6.6.12.1.** La leyenda "Agua Potable".

**6.6.12.2.** Clave de identificación asignada por el organismo operador responsable.

**6.6.12.3.** Identificación del responsable de la distribución (nombre, dirección y teléfono).

## **7. Control sanitario del sistema de abastecimiento de agua**

El organismo operador responsable, debe establecer y desarrollar un Programa de Evaluación y Manejo del agua (PEMA), que permita evaluar continua y sistemáticamente la calidad del agua en todas las etapas del

sistema de abastecimiento, para lo conducente los organismos operadores responsables podrán solicitar apoyo y asistencia técnica de las autoridades competentes, observando como mínimo lo siguiente:

**7.1. Elaboración del PEMA que incluya:**

**7.1.1.** Identificación, valoración y jerarquización de los peligros y de las condiciones que puedan dar lugar a éstos, basándose en la frecuencia o probabilidad de ocurrencia, así como en la gravedad de las consecuencias en la salud, si se llegará a presentar alguna de las condiciones de riesgo, para lo cual se considerará además de los establecidos en el capítulo 6, los criterios del Apéndice A Normativo.

**7.1.2.** Establecimiento de los PC y sitios de monitoreo o PCC para los parámetros fisicoquímicos adicionales a los establecidos en esta Norma, que resulten de la evaluación del riesgo de los peligros detectados. Los cuales se sujetarán a los límites permisibles listados en la guía del Apéndice B Normativo.

**7.1.3.** Establecer la frecuencia de monitoreo de los parámetros de control fisicoquímicos, que permita contar con un seguimiento permanente de su concentración en el agua y las acciones desarrolladas para su control.

**7.1.4.** Establecer los procedimientos o la infraestructura que se implementará en tanto un parámetro se encuentre fuera de los límites máximos permisibles y al no contar en el corto plazo con un sistema de potabilización adecuado, que permita a la población en riesgo ser dotada de agua para consumo de calidad.

**7.2. Subprograma de control analítico que incluya:**

**7.2.1.** Caracterización del agua de suministro, la cual comprenderá un análisis de los parámetros señalados en esta Norma, más los que resulten del PEMA, incluyendo como mínimo dos muestreos distribuidos a lo largo del año y actualizarse como mínimo cada cinco años. Los parámetros que podrán quedar exentos de esta actualización, serán aquellos que no representen un riesgo derivado del PEMA y que no se hayan detectado en la caracterización inicial;

**7.2.2.** Incluir los estudios de tratabilidad, cuando se cuente con planta de potabilización;

**7.2.3.** Si como resultado del promedio aritmético de la caracterización, la concentración de algún parámetro se encuentra dentro del 5% debajo del límite máximo permisible, la frecuencia mínima de monitoreo para ese parámetro, deberá ser mensual;

**7.2.4.** Si para el cumplimiento del límite máximo permisible de algún parámetro, se requiere de un proceso de potabilización, la frecuencia mínima de muestreo para ese parámetro debe ser mensual;

**7.2.5.** La Guía de procesos para la potabilización del agua, se establece en el Apéndice B Normativo, y

**7.2.6.** El seguimiento y control de los parámetros físicos y residuales de la desinfección, de acuerdo a lo siguiente:

**Tabla 7.1. Límites máximos permisibles de parámetros físicos en toma domiciliaria.**

Parámetros	Unidades	Límite máximo permisible
pH	Unidades de pH	6,5-8,5
Turbiedad	UTN	3,0

**Tabla 7.2. Límites máximos permisibles de residuales de la desinfección en toma domiciliaria.**

Parámetros	Unidades	Límite máximo permisible
Cloro residual libre	mg/L	0,5-1,5
Yodo residual libre	mg/L	0,5-1,5

**7.2.6.1.** El límite máximo de los parámetros físicos y residuales de la desinfección se estima a partir de la media aritmética de al menos tres determinaciones, por cada obra de captación y distribuidas de la siguiente manera:

**7.2.6.1.1.** Toma domiciliaria, inmediatamente posterior al equipo de desinfección o posterior al tanque de almacenamiento.

**7.2.6.1.2.** Toma domiciliaria, en la zona intermedia de la red.

**7.2.6.1.3.** Toma domiciliaria en la zona terminal de la red.

**7.2.6.2.** El seguimiento y control de los parámetros físicos y residuales de la desinfección, debe realizarse en el sitio de muestreo y establecerse con una frecuencia de acuerdo a la Tabla 7.3, de esta Norma.

**Tabla 7.3.- Frecuencia de monitoreo de parámetros físicos y residuales de la desinfección en toma domiciliaria.**

Población abastecida	Muestras por número de habitantes	Frecuencia
<2 500	1	Quincenal
2 501-50 000	1/2 500	Semanal
> 50 000	1/50 000	Diaria

**7.2.6.3.** Cuando en una localidad se establezca como método de desinfección tecnologías a base de plata, el seguimiento y control de los parámetros físicos se establecerá en base a las Tablas 7.1. y 7.3., de esta Norma. El control microbiológico se fortalecerá para coliformes fecales o *E. coli*, estableciendo una frecuencia quincenal.

**7.2.7.** Seguimiento y control de los parámetros microbiológicos de acuerdo a lo siguiente:

Para el cumplimiento de los indicadores de contaminación fecal, se podrá determinar indistintamente coliformes fecales o *E. coli*, para lo cual se deberá muestrear en toma domiciliaria. Realizando la determinación de acuerdo a los métodos descritos en el Apéndice D Normativo.

**7.2.7.1.** Cuando el suministro de agua total o parcial, provenga de una obra de captación de: río, lago o embalse, deberá muestrearse en toma domiciliaria y cumplir una calidad de acuerdo a la Tabla 7.4., de esta Norma.

**Tabla 7.4.- Límites máximos permisibles de indicadores microbiológicos.**

Parámetros	Unidades	Límite máximo permisible
<i>Giardia lamblia</i>	Quistes/L	0/20 L
Coliformes fecales o <i>E. coli</i>	NMP/100 ml o UFC/100 ml	Ausente
Microcistina-LR <sup>1</sup>	µg/L	1,0

<sup>1</sup> Determinar sólo en el caso que la turbiedad esté por arriba de 0.5 UTN.

**7.2.7.2.** Cuando el suministro de agua provenga de una obra de captación de manantiales u obras de captación de aguas subterráneas, deberá determinarse en toma domiciliaria y cumplir una calidad de acuerdo a la Tabla 7.5., de esta Norma.

**Tabla 7.5.- Límites máximos permisibles de indicadores microbiológicos.**

Parámetros	Unidades	Límite máximo permisible
Coliformes fecales o <i>E. coli</i>	NMP/100 ml o UFC/100 ml	Ausente

**7.2.7.3.** Los parámetros microbiológicos en ambos casos deben establecerse con una frecuencia mínima, de acuerdo a la Tabla 7.6.

**Tabla 7.6.- Frecuencia de monitoreo.**

<b><i>Giardia lamblia</i> y Microcistina-LR</b>
---

Población abastecida	Muestras por número de habitantes	Frecuencia
< 2 500	1	Semestral
2 501- 50 000	1/2 500	Trimestral
> 50 000	1/50 000	Mensual
<b>Coliformes fecales o <i>E. coli</i> en toma domiciliaria</b>		
Población abastecida	Muestras por número de habitantes	Frecuencia
< 2 500	1	Mensual
2 501- 50 000	1/2 500	Mensual
> 50 000	1/5 000	Semanal

**7.2.8.** Si el agua se desinfecta con alguna forma de cloro, se deben medir THM y ácidos haloacéticos especificados en la Tabla 7.7., de esta Norma, cada seis meses en toma domiciliaria y sólo cuando se observe una turbiedad mayor a 3 UTN como promedio, considerando para el cálculo al menos 9 determinaciones a lo largo de un mes.

**7.2.9.** Si el agua se desinfecta con ozono, se deben medir aniones y formaldeído especificados en la Tabla 7.7., de esta Norma, cada seis meses en toma domiciliaria y sólo cuando se observe una turbiedad mayor a 3 UTN como promedio, considerando para el cálculo al menos 9 determinaciones a lo largo de un mes.

**Tabla 7.7.- Límites máximos permisibles de subproductos de desinfección.**

Parámetros	Unidades	Límite máximo permisible
<b>Trihalometanos</b>		
Bromodiorometano	µg/L	60
Bromofomo	µg/L	100
Clorofomo	µg/L	200
Dibromoclorometano	µg/L	100
<b>Ácidos haloacéticos totales</b>		
Ácido tricloroacético	µg/L	200
Ácido didoroacético	µg/L	50
Ácido cloroacético	µg/L	20
<b>Aniones</b>		
Bromatos	µg/L	10
Cloratos	µg/L	700
Cloritos	µg/L	700
<b>Formaldehído</b>	µg/L	900

**7.2.10.** La distribución de los puntos de control para residuales de la desinfección en el sistema de abastecimiento del agua, deberá contemplar los siguientes criterios:

**7.2.10.1.** Los puntos de muestreo deben ser representativos de las diferentes obras de captación que abastecen el sistema.

**7.2.10.2.** Distribuir uniformemente los puntos de muestreo en el sistema y en su caso considerar los lugares más susceptibles de contaminación, como:

**7.2.10.2.1.** Zonas densamente pobladas y con alcantarillado insuficiente.

**7.2.10.2.2.** Escuelas, rastros y mercados.

**7.2.10.2.3.** Tanques de almacenamiento y de distribución.

**7.2.10.2.4.** En proporción al número de ramales.

**7.2.10.2.5.** Seleccionar como mínimo un punto de muestreo inmediatamente después del proceso de potabilización u obra de captación posterior a la desinfección.

**7.2.11.** Seguimiento y control de los parámetros inorgánicos especificados en la Tabla 7.8. de esta Norma, cada seis meses, en punto de muestreo inmediatamente después del proceso de potabilización o tanque posterior a la desinfección:

**Tabla 7.8.- Límites máximos permisibles de inorgánicos.**

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Límite máximo permisible</b>
Arsénico	mg/L	0,01
Fluoruros como ión Flúor	mg/L	1,5
Mercurio	mg/L	0,001
Plomo	mg/L	0,01

**7.2.12.** Los procedimientos para toma de muestras están especificados en el Apéndice C Normativo y los métodos de prueba, en el Apéndice D Normativo.

**7.3.** Subprograma de inspección y mantenimiento de instalaciones hidráulicas.

**7.3.1.** Este programa debe contener las actividades de mantenimiento preventivo y correctivo e incluir como mínimo un recorrido anual por parte del organismo operador responsable, a cada una de las instalaciones hidráulicas que conforman el sistema de abastecimiento, con la finalidad de detectar y eliminar fugas que significan un riesgo sanitario cuando el suministro se interrumpe.

**7.3.2.** Establecer un programa de limpieza que garantice la preservación de la calidad del agua. La limpieza debe incluir la extracción de sólidos sedimentados, remoción de materiales incrustados, limpieza y desinfección de instalaciones hidráulicas con la frecuencia necesaria para minimizar los riesgos asociados a estas condiciones.

**7.3.3.** Contar con reportes de mantenimiento y limpieza que contenga como mínimo: fecha, servicio y responsable.

**7.4.** Subprograma de capacitación del personal.

**7.4.1.** Establecer un programa de capacitación y actualización anual de acuerdo a las actividades del personal, que incluya lo relacionado con la operación y mantenimiento del sistema, el muestreo y análisis de la calidad del agua.

**7.5.** Subprograma de contingencias.

**7.5.1.** Establecer un programa de contingencias, que incluya:

**7.5.1.1.** Las actividades de rehabilitación de las obras hidráulicas, la identificación de fuentes o sistemas alternos de suministro de agua y los métodos de distribución de agua alterna, en caso de fallas en los sistemas ocasionadas por situaciones imprevistas.

**7.5.2.** El organismo operador responsable debe informar inmediatamente a la autoridad por escrito sobre los casos de contingencias relativas a la calidad del agua, cuando ésta constituya un riesgo a la salud humana.

**7.6.** Subprograma de comunicación.

**7.6.1.** Establecer el mecanismo que permita comunicar de forma inmediata a la población de las restricciones para uso y consumo humano, así como los riesgos asociados a través de un medio de comunicación masivo.

**7.6.2.** En caso de que el servicio sea intermitente, el organismo operador responsable deberá de informar a la población y hacer campañas para el mejor manejo del agua a nivel domiciliario.

**7.6.3.** Establecer el mecanismo que permita comunicar de forma periódica, en el periódico de mayor circulación local los resultados del control.

**7.7.** Subprograma de control de Vehículos cisterna.

Debe contar con la siguiente información documental:

**7.7.1.** Reporte de los resultados de las determinaciones de cloro residual libre por zona de distribución, en el que se incluya: fecha y nombre de la persona que realiza el servicio.

**7.7.2.** Tipo y localización de las fuentes de abastecimiento o líneas de distribución de agua potable, donde se abastece.

**7.7.3.** Zonas de distribución de agua.

**7.7.4.** Volumen diario de agua distribuido.

**7.8.** En caso de alguna contingencia que pueda generar la presencia de agentes biológicos patógenos u otras sustancias químicas tóxicas no consideradas en la presente Norma, el organismo operador responsable del Programa de Evaluación y Manejo de Riesgos deberá realizar una caracterización especial.

**7.9.** El organismo operador responsable del sistema de abastecimiento de agua, revisará el PEMA y en su caso modificará cada tres años.

**7.10.** El organismo operador responsable del sistema de abastecimiento de agua debe designar al responsable sanitario del sistema.

## **8. Vigilancia del sistema de abastecimiento de agua**

La autoridad en el ámbito de su competencia debe verificar el cumplimiento de los requisitos sanitarios de los sistemas de abastecimiento y la calidad del agua, considerando lo siguiente:

**8.1.** Debe establecer programas de vigilancia de la calidad del agua, de sus sistemas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano con una periodicidad anual.

**8.2.** Realizar el monitoreo establecido en las Tablas 7.3. y 7.6., de esta Norma, con una frecuencia mensual, cuando se indica semanal o quincenal y semanal cuando se indica diaria.

**8.3** El muestreo se efectuará de conformidad con el procedimiento de muestreo descrito en Apéndice C Normativo.

**8.4** Toda la documentación señalada en el capítulo 7., debe estar a disposición de la autoridad sanitaria competente.

**8.5** El organismo operador responsable del sistema de abastecimiento, podrá solicitar a la autoridad sanitaria el Certificado de Calidad de Agua Para Uso y Consumo Humano y Certificado de Condiciones Sanitarias del Sistema de Abastecimiento. El certificado se otorgará si se cumple con los parámetros de control, así como de los resultados de residuales de la desinfección y análisis bacteriológicos en toma domiciliaria, por lo menos en el 90% de las muestras colectadas en la red de distribución, durante un periodo de doce meses consecutivos. Además presentar ante la autoridad sanitaria, el pago de derechos, de acuerdo con lo establecido por el artículo 195-K-3, de la Ley Federal de Derechos y el Formato de Solicitud inscrito en el Registro Federal de Trámites y Servicios.

**8.6** El organismo operador responsable del sistema tendrá como máximo 5 días hábiles posteriores a la verificación, para presentar una copia de las bitácoras, procedimientos, programas y diagramas de flujo a la autoridad sanitaria competente, en caso de que al momento de la visita no lo tenga a disposición.

**8.7** Una vez que se concluya la visita de verificación se integrará toda la información recabada en el acta de verificación sanitaria, para el dictamen correspondiente por parte de la autoridad sanitaria.

### **9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas**

Esta Norma no es equivalente a ninguna norma internacional ni mexicana.

### **10. Procedimiento de evaluación de la conformidad**

La evaluación de la conformidad podrá ser solicitada por el representante legal o la persona que tenga facultades para ello, ante la autoridad competente o las personas acreditadas y aprobadas para tales efectos.

### **11. Bibliografía**

**11.1.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 21th Ed. Washington D. C. 2005. EUA.

**11.2.** Guidelines for Drinking-Water Quality. Incorporating First Addendum to 3th Edition, Vol. 1. WHO. Geneva, 2006.

**11.3.** Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias. Procedimiento AI VRA-08 "Determinación de la concentración de actividad alfa y beta total en agua".

**11.4.** Water Quality and Treatment. A handbook of Community Water Supplies. AWWA, Fifth McGraw Hill, Inc., 1999

**11.5.** EPA (2005). Guidelines for design of small public groundwater systems. Division of drinking and groundwater. Ohio Environmental Protection Agency. Third Edition, 76p. Web Site Address: <http://www.epa.state.oh.us/ddagw/>.

**11.6.** Davison, Annete y Deere, Dan. Material de trabajo para Planes de seguridad del Agua para consumo humano. Material para capacitadores de capacitación. OMS, Singapur, 2007.

### **12. Observancia de la norma**

La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales a través de la Comisión Nacional del Agua y a los gobiernos de las Entidades Federativas, en sus respectivos ámbitos de competencia.

### **13. Vigencia**

Esta Norma entrará en vigor a los 180 días naturales contados a partir del día siguiente de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

## **TRANSITORIOS**

**ÚNICO.-** La entrada en vigor de la presente Norma, deja sin efectos las siguientes Normas Oficiales Mexicanas:

- a)** Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de noviembre de 2000.
- b)** Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998, Vigilancia y Evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por sistemas de abastecimiento público, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de septiembre de 2001.
- c)** Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de julio de 2005.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 27 de junio de 2014.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Mikel Andoni Arriola Peñalosa**.- Rúbrica.

## 14. Apéndices.

### Apéndice A Normativo.

#### Guía para la elaboración del PEMA.

##### A.1. INTRODUCCIÓN.

En este apéndice se especifican las bases para el establecimiento del PEMA, basándose en un sistema de APPC, a la vez que se reconoce que los detalles para la aplicación pueden variar según las condiciones de cada Entidad Federativa.

El sistema de APPC, tiene fundamentos científicos y de carácter sistemático, permite identificar peligros específicos y medidas para su control con el fin de garantizar la inocuidad del agua de suministro a la población. Es un instrumento para evaluar los peligros y establecer sistemas de control que se centran en la prevención, en lugar de basarse principalmente en el ensayo del producto final. Todo sistema de APPC es susceptible de cambios que pueden derivar de los avances en el diseño del equipo, los procedimientos de elaboración o el sector tecnológico.

El sistema APPC puede aplicarse a lo largo de todo el sistema de distribución, desde la obra de captación hasta el consumidor final, su aplicación deberá basarse en pruebas científicas de peligros para la salud humana, además de mejorar la inocuidad del agua, la aplicación del sistema APPC, facilita asimismo la vigilancia sanitaria.

Para que la aplicación del sistema de APPC dé buenos resultados, es necesario que tanto la dirección como el personal se comprometan y participen plenamente. También se requiere un enfoque multidisciplinario en el cual se deberá incluir, cuando proceda, a expertos geólogos, microbiólogos, especialistas en medicina y salud pública, expertos en salud ambiental, químicos e ingenieros.

La aplicación del sistema de APPC es compatible con la aplicación de sistemas de gestión de calidad, como la serie ISO 9000 y es el método utilizado de preferencia para controlar la inocuidad de los alimentos en el marco de tales sistemas. Si bien, aquí se ha considerado la aplicación del sistema de APPC a la inocuidad del agua, el concepto puede aplicarse a otros aspectos de la calidad.

##### A.2. DEFINICIONES.

**A.2.1. Análisis de peligros:** al proceso de recopilación y evaluación de información sobre los peligros y las condiciones que los originan para decidir cuáles son importantes con la inocuidad del agua y por tanto, planteados en el sistema de APPC.

**A.2.2. Controlado:** a la condición obtenida por cumplimiento de los procedimientos y de los criterios marcados.

**A.2.3. Controlar:** adoptar todas las medidas necesarias para asegurar y mantener el cumplimiento de los criterios establecidos en el sistema de APPC.

**A.2.4. Desviación:** a la situación existente cuando un límite crítico es incumplido.

**A.2.5. Diagrama de flujo:** a la representación sistemática de la secuencia de fases u operaciones llevadas a cabo en la producción o elaboración de un determinado producto alimenticio.

**A.2.6. Fase:** a cualquier punto, procedimiento, operación o etapa, incluida la captación, desde la producción hasta el consumidor final.

**A.2.7. Límite crítico:** al criterio que diferencia la aceptabilidad o inaceptabilidad del proceso en una determinada fase.

**A.2.8. Medida correctiva:** a la acción que hay que realizar cuando los resultados de la vigilancia en los PCC indican pérdida en el control del proceso.

**A.2.9. Medida de control:** a cualquier medida y actividad que puede realizarse para prevenir o eliminar un peligro o para reducirlo a un nivel aceptable.

**A.2.10. Peligro:** al agente biológico, químico o físico presente en el agua, o bien la condición en que éste se halla, que puede causar un efecto adverso para la salud.

**A.2.11. PEMA:** al documento preparado de conformidad con los principios del sistema de APPC, de tal forma que su cumplimiento asegura el control de los peligros que resultan significativos para la inocuidad del agua.

**A.2.12. PCC:** a la fase en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad del agua o para reducirlo a un nivel aceptable.

**A.2.13. Sistema de APPC:** al sistema que permite identificar, evaluar y controlar peligros significativos.

**A.2.14. Validación:** a la constatación de que los elementos del de APPC son efectivos.

**A.2.15. Verificación:** a la aplicación de métodos, procedimientos y ensayos, además de la vigilancia, para constatar el cumplimiento del sistema de APPC.

**A.2.16. Vigilar:** a la acción de llevar a cabo una secuencia planificada de observaciones o mediciones de los parámetros de control para evaluar si un PCC está bajo control.

### **A.3. PRINCIPIOS DEL PEMA.**

#### **A.3.1. PRINCIPIO 1:**

Realizar un análisis de peligros.

#### **A.3.2. PRINCIPIO 2:**

Determinar los PCC.

#### **A.3.3. PRINCIPIO 3:**

Establecer un límite o límites críticos.

#### **A.3.4. PRINCIPIO 4:**

Establecer un sistema de vigilancia del control de los PCC.

#### **A.3.5. PRINCIPIO 5:**

Establecer las medidas correctivas que han de adoptarse cuando la vigilancia indica que un determinado PCC no está controlado.

#### **A.3.6. PRINCIPIO 6:**

Establecer procedimientos de comprobación para confirmar que el PEMA funciona eficazmente.

#### **A.3.7. PRINCIPIO 7:**

Establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y los registros apropiados para estos principios y su aplicación.

### **A.4. DIRECTRICES PARA LA APLICACION DEL PEMA.**

En la identificación del peligro, en su evaluación y en las operaciones subsiguientes de diseño y aplicación del PEMA, debe tenerse en cuenta los efectos de las características geológicas del área de captación de la fuente de abastecimiento, los usos del suelo, las prácticas industriales, agropecuarias o forestales, especificaciones de sistemas de potabilización, integridad de las redes de distribución de agua y los datos epidemiológicos relativos al consumo de agua.

El objetivo del PEMA es que el control se centre en los PCC. En el caso de que se identifique un peligro que debe controlarse pero no se encuentre ningún PCC, rediseñar la operación.

### **A.5. APLICACIÓN.**

La aplicación de los principios del PEMA consta de las siguientes operaciones, que se identifican en la secuencia lógica para la aplicación del sistema de APPC.

#### **A.5.1. Formación del equipo del PEMA.**

Para la conformación del equipo debe asegurarse de que dispone de los conocimientos y competencia técnica adecuados para el objetivo del Plan. Para lograrlo, lo ideal es crear un equipo multidisciplinario. Cuando no se disponga de tal competencia técnica en el municipio deberá recabarse asesoramiento especializado de otras fuentes como, por ejemplo, Institutos de Investigación o Universidades, así como de la literatura sobre el sistema de APPC. Una persona adecuadamente capacitada que tenga acceso a tal orientación está en condiciones de aplicar el sistema de APPC. Se debe determinar el ámbito de aplicación del PEMA, que ha de describir el segmento de la distribución del agua y las clases generales de peligros que han de abordarse (por ejemplo, si abarcará todas las clases de peligros o solamente algunas de ellas).

**A.5.2. Descripción del sistema.**

Debe formularse una descripción completa del sistema de distribución del agua, que incluya tanto información pertinente a la inocuidad como, por ejemplo, infraestructura física, de los sistemas de: tratamiento, desinfección, almacenamiento y distribución.

**A.5.3. Determinación del uso del agua.**

El uso del agua que ha de destinarse debe basarse en las estrategias que se establezcan con la finalidad de evitar el consumo del agua en tanto no se implemente el tratamiento adecuado. En determinados casos, habrá que tener en cuenta si se dota de suministro alternativo para el consumo a grupos vulnerables de la población.

**A.5.4. Elaboración de un diagrama de flujo.**

El equipo PEMA (véase también el apartado 1) debe construir un diagrama de flujo, éste debe de representar todas las fases de las operaciones relativas a la distribución del agua. Al aplicar el sistema a una operación determinada, se debe tener en cuenta las fases anteriores y posteriores a dicha operación.

**A.5.5. Confirmación in situ del diagrama de flujo.**

Deben adoptarse medidas para confirmar la correspondencia entre el diagrama de flujo y la operación de elaboración en todas sus etapas, momentos y modificarlo si procede. La confirmación del diagrama de flujo deberá estar a cargo de una persona o personas que conozcan suficientemente las actividades de elaboración.

**A.5.6. Enumeración de todos los posibles riesgos relacionados con cada fase, ejecución de un análisis de peligros y estudio de las medidas para controlar los riesgos estimados.**

El equipo de PEMA debe enumerar todos los peligros que pueden razonablemente preverse que se producirán en cada fase, desde la obra de captación, el almacenamiento, la desinfección o tratamiento y la distribución hasta el punto de consumo.

<b>Ejemplos de peligros en fuentes de captación (cuencas hidrográficas)</b>	
<b>Suceso peligroso (fuente de peligro).</b>	<b>Peligro asociado.</b>
<b>Fenómenos meteorológicos y climáticos.</b>	<b>Inundación.</b> <b>Cambios en la calidad del agua.</b>
<b>Variaciones estacionales.</b>	<b>Cambios en la calidad del agua de alimentación.</b>
<b>Geología.</b>	<b>Arsénico.</b> <b>Fluoruro.</b> <b>Plomo.</b>
<b>Agricultura.</b>	<b>Contaminación microbiológica.</b> <b>Plaguicidas.</b> <b>Nitrato.</b> <b>Abono con estiércol líquido o sólido.</b> <b>Desecho de cadáveres de animales.</b>
<b>Explotación forestal.</b>	<b>Plaguicidas.</b> <b>Hidrocarburos aromáticos policíclicos (fuegos).</b>
<b>Industria (incluidos los emplazamientos de antiguas industrias y las industrias abandonadas).</b>	<b>Contaminación química y microbiológica</b> <b>Pozos de infiltración (entrada al sistema de agua superficial).</b>
<b>Suceso peligroso.</b>	<b>Peligro asociado.</b>

<b>Minería (incluidas las minas abandonadas).</b>	<b>Contaminación química</b>
<b>Transporte: carreteras.</b>	<b>Plaguicidas Sustancias químicas derramadas en accidentes de tráfico.</b>
<b>Transporte: líneas de Ferrocarril.</b>	<b>Plaguicidas.</b>
<b>Desarrollo urbanístico.</b>	<b>Escorrentía. Descargas de aguas servidas.</b>
<b>Viviendas: fosas sépticas.</b>	<b>Contaminación microbiológica.</b>
<b>Mataderos.</b>	<b>Contaminación orgánica y microbiológica.</b>
<b>Fauna.</b>	<b>Contaminación microbiológica.</b>
<b>Usos recreativos.</b>	<b>Contaminación microbiológica.</b>
<b>Demanda de agua para otros Usos.</b>	<b>Cantidad insuficiente.</b>
<b>Almacenamiento de agua Cruda.</b>	<b>Toxinas y floraciones de algas, eutrofización.</b>
<b>Acuífero.</b>	<b>Cambios inesperados en la calidad del agua.</b>
<b>Deficiente impermeabilización de la toma de agua de pozo.</b>	<b>Entrada de agua superficial.</b>
<b>Revestimiento de pozo-sondeo corroído o incompleto.</b>	<b>Entrada de agua superficial.</b>
<b>Inundación.</b>	<b>Cantidad y calidad suficientes de agua cruda.</b>

<b>Ejemplos de peligros en el tratamiento</b>	
<b>Suceso peligroso (fuente de peligro).</b>	<b>Peligro asociado.</b>
<b>Cualquier peligro no controlado o atenuado en la cuenca de captación.</b>	<b>Los señalados en el cuadro de peligros en la cuenca de captación.</b>
<b>Suministro eléctrico.</b>	<b>Interrupción del tratamiento / agua no Desinfectada.</b>
<b>Capacidad de las instalaciones de tratamiento.</b>	<b>Sobrecarga de la instalación de tratamiento.</b>
<b>Desinfección.</b>	<b>Fiabilidad. Subproductos de la desinfección.</b>
<b>Mecanismo de derivación.</b>	<b>Tratamiento inadecuado.</b>
<b>Avería del tratamiento.</b>	<b>Agua no tratada.</b>
<b>Uso en el tratamiento de materiales y sustancias químicas no aprobados.</b>	<b>Contaminación del sistema de abastecimiento de Agua.</b>
<b>Uso de sustancias químicas</b>	<b>Contaminación del agua.</b>

<b>en el tratamiento.</b>	
<b>Obstrucción de filtros.</b>	<b>Eliminación insuficiente de partículas.</b>
<b>Profundidad insuficiente del medio filtrante.</b>	<b>Eliminación insuficiente de partículas.</b>
<b>Seguridad deficiente / Vandalismo.</b>	<b>Contaminación / corte de suministro.</b>
<b>Fallo de instrumentación.</b>	<b>Pérdida de control.</b>
<b>Inundación.</b>	<b>Inutilización total o parcial de instalaciones de Tratamiento.</b>
<b>Fuego / explosión.</b>	<b>Inutilización total o parcial de instalaciones de Tratamiento.</b>

<b>Ejemplos de peligros en la red de distribución</b>	
<b>Suceso peligroso (fuente de peligro).</b>	<b>Peligro asociado.</b>
<b>Cualquier peligro no controlado o atenuado en el tratamiento.</b>	<b>Los señalados en el cuadro de peligros en el Tratamiento.</b>
<b>Estanquidad y hermeticidad inadecuada de la tubería.</b>	<b>Entrada de contaminación.</b>
<b>Tubería rota.</b>	<b>Entrada de contaminación.</b>
<b>Fluctuaciones de la presión.</b>	<b>Entrada de contaminación.</b>
<b>Intermitencia del suministro.</b>	<b>Entrada de contaminación.</b>
<b>Apertura y cierre de válvulas</b>	<b>Perturbación de depósitos por la inversión o modificación del flujo Ingreso de agua contaminada.</b>
<b>Uso de materiales no Aprobados.</b>	<b>Contaminación del sistema de abastecimiento de Agua.</b>
<b>Acceso de terceros a las tomas de agua.</b>	<b>Contaminación por el contra-flujo Perturbación de depósitos por el aumento de flujo.</b>
<b>Conexiones no autorizadas.</b>	<b>Contaminación por el contra-flujo.</b>
<b>Embalse de servicio abierto.</b>	<b>Contaminación por la fauna salvaje.</b>
<b>Embalse de servicio con fugas</b>	<b>Entrada de contaminación.</b>
<b>Acceso no protegido a embalse de servicio.</b>	<b>Contaminación.</b>
<b>Seguridad / vandalismo.</b>	<b>Contaminación.</b>
<b>Terreno contaminado.</b>	<b>Contaminación del agua por el uso de tubería Inadecuada.</b>

Posteriormente, se debe llevar a cabo un análisis de peligros para identificar, en relación con el plan del sistema de APPC, cuáles son los peligros cuya eliminación o reducción a niveles aceptables resulta indispensable, por su naturaleza, para distribuir agua de calidad adecuada para uso y consumo humano.

Al realizar un análisis de peligros, deberán incluirse, siempre que sea posible, los siguientes factores:

- Probabilidad de que surjan peligros y la gravedad de sus efectos perjudiciales para la salud;
- Evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la presencia de peligros;
- Supervivencia o proliferación de los microorganismos involucrados;
- Producción o persistencia de toxinas, sustancias químicas o agentes físicos en el agua, y
- Las condiciones que pueden originar lo anterior.

Debe analizarse qué medidas de control, si las hubiera, se pueden aplicar en relación con cada peligro.

Puede que sea necesario aplicar más de una medida para controlar un peligro o peligros específicos, y que con una determinada medida se pueda controlar más de un peligro.

Ejemplo de una matriz simple de calificación y priorización de riesgos						
Nivel	Probabilidad	Gravedad de las consecuencias				
		Insignificante 1	Menor 2	Moderado 3	Mayor 4	Catastrófico 5
A	Casi seguro.	5	10	15	20	25
B	Probable.	4	8	12	16	20
C	Moderadamente probable.	3	6	9	12	15
D	Poco probable.	2	4	6	8	10
E	Raro.	1	2	3	4	5

Clases de Riesgos	Descripción de los Riesgos (Riesgo aceptable o no)
Muy Alto (MA)	Riesgo extremo y no aceptable, claramente se requiere prioridad de acción inmediata y puntual, siendo necesarios medidas de control y establecimiento de límites críticos para el PCC y el Punto de Control.
Alto (A)	Riesgo alto y no aceptable, necesita una acción inmediata y puntual, siendo necesarios medidas de control y establecimiento de límites críticos para el PCC y el Punto de Control.
Moderado (M)	Riesgo moderado y no aceptable, se necesita una acción de gestión o una acción de intervención física a medio y largo plazo, consecuentemente definir un Punto Crítico de Atención que no son posibles de monitorear por medio de límites críticos y si se establecen intervenciones físicas y medidas de control direccionadas para reducir o eliminar el peligro a un riesgo aceptable. El riesgo también puede ser un punto de atención donde las medidas de control no pueden ser realizadas de inmediato, necesitando de una acción interinstitucional.
Bajo (B)	Riesgo bajo aceptable, que puede ser gerenciado por procedimientos de rutina. Este riesgo requiere de más estudios para comprender si el evento peligroso es un riesgo aceptable, significativo o no, y si una determinada etapa pasa a un nivel de riesgo inaceptable, será necesaria una medida de control y el establecimiento de límites críticos para el PCC y el Punto de Control.
Muy Bajo (MB)	Riesgo aceptable, siendo insignificante y no representando claramente ninguna prioridad.

<i>Peligro</i>	<i>Suceso peligroso, fuente/causa</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Severidad</i>	<i>Calificación de riesgo</i>
----------------	---------------------------------------	---------------------	------------------	-------------------------------

<i>Peligro</i>	<i>Suceso peligroso, fuente/causa</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Severidad</i>	<i>Calificación de riesgo</i>
Microbiológico.	Método de desinfección inadecuado.	4	4	Muy alto
Químico.	Formación de subproductos de desinfección en niveles que exceden los establecidos en guías para el agua potable.	3	3	Medio
Microbiológico.	Desinfección menos efectiva debido a una elevada turbiedad.	4	4	Muy alto
Microbiológico.	Mal funcionamiento mayor/fallas en la planta de desinfección.	2	5	Alto
Microbiológico.	Fugas en la red de distribución de agua.	3	4	Alto
Microbiológico.	Falla en plantas de desinfección UV.	3	4	Alto
Microbiológico.	Bajo residual de cloro en sistemas de distribución y reticulares.	4	4	Muy alto
Microbiológico.	Corte del suministro eléctrico en la planta de desinfección.	4	5	Muy alto
Físico.	Contaminación en la dosificación.	4	5	Muy alto
Químico.	Error en el suministro de Químicos.	2	5	Alto
Químico.	Sobre y baja dosificación de plantas de fluorización.	4	3	Alto
Químico.	Sobre dosificación.	4	3	Alto
Físico.	Corrección de pH.	3	1	Bajo

<b>Ejemplos de medidas cualitativas de posibilidades y de severidad que pueden ser usadas en la calificación de riesgos</b>			
<b>Nivel</b>	<b>Descriptor</b>	<b>Definición</b>	<b>Puntaje</b>
<i>Categorías de posibilidades.</i>			
<b>A</b>	Casi seguro.	Una vez por día.	5
<b>B</b>	Probablemente.	Una vez a la semana.	4
<b>C</b>	Posiblemente Moderado.	Una vez al mes.	3
<b>D</b>	Poco probable.	Una vez al año.	2
<b>E</b>	Raro.	Una vez cada cinco años	1

<b>Categorías de severidad</b>			
<b>1</b>	Catastrófica.	Potencialmente letal para grandes poblaciones.	5
<b>2</b>	Mayor.	Potencialmente letal para poblaciones pequeñas.	4
<b>3</b>	Moderado.	Potencialmente dañino para grandes poblaciones.	3
<b>4</b>	Menor.	Potencialmente dañino para poblaciones pequeñas.	2
<b>5</b>	Insignificante.	Ningún impacto o no se detecta.	1

#### **A.5.7. Determinación de los PCC.**

Es posible que haya más de un PCC al que se aplican medidas de control para hacer frente a un peligro específico. La determinación de un PCC en el PEMA se puede facilitar con la aplicación de un árbol de decisiones, como por ejemplo el Diagrama 2, en el que se indique un enfoque de razonamiento lógico. El árbol de decisiones deberá aplicarse de manera flexible, considerando si la operación se refiere a la captación, potabilización, almacenamiento, rebombeo, distribución u otro fin, y deberá utilizarse con carácter orientativo en la determinación de los PCC. Este ejemplo de árbol de decisiones puede no ser aplicable a todas las situaciones, por lo cual podrán utilizarse otros enfoques. Se recomienda que se imparta capacitación en la aplicación del árbol de decisiones.

Si se identifica un peligro en una fase en la que el control es necesario para mantener la inocuidad y no existe ninguna medida de control que pueda adoptarse en esa fase o en cualquier otra, el proceso deberá modificarse en esa fase, o en cualquier fase anterior o posterior, para incluir una medida de control.

#### **A.5.8. Establecimiento de límites críticos para cada PCC.**

Para cada PCC, deberán especificarse y validarse, si es posible, límites críticos. En determinados casos, para una determinada fase, se elaborará más de un límite crítico. Entre los criterios aplicados suelen figurar las mediciones de temperatura, turbiedad, fuente de abastecimiento, pH, usos del suelo en el área de captación.

Si se han utilizado guías al sistema de APPC elaboradas por expertos para establecer los límites críticos, deberá ponerse cuidado para asegurar que esos límites sean plenamente aplicables a la actividad específica y al producto o grupos de productos en cuestión. Los límites críticos deberán ser mensurables.

#### **A.5.9. Establecimiento de un sistema de control para cada PCC.**

El control es la medición u observación programadas de un PCC en relación con sus límites críticos. Mediante los procedimientos de supervisión del organismo operador responsable, deberá poderse detectar una pérdida de control en el PCC.

Además, lo ideal es que la vigilancia proporcione esta información a tiempo como para hacer correcciones que permitan asegurar el control del proceso para impedir que se infrinjan los límites críticos. Cuando sea posible, los procesos deberán corregirse cuando los resultados de la vigilancia indiquen una tendencia a la pérdida de control en un PCC y las correcciones deberán efectuarse antes de que ocurra una desviación. Los datos obtenidos de la vigilancia deberán ser evaluados por una persona que deberá tener los conocimientos y la competencia necesarios para aplicar medidas correctivas, cuando proceda y que será designada por el responsable del sistema de abastecimiento de agua. Si la vigilancia no es continua, su grado o frecuencia deberán ser suficientes como para garantizar que el PCC esté controlado. La mayoría de los procedimientos de vigilancia de los PCC deberán efectuarse con rapidez, porque se referirán a procesos continuos y no habrá tiempo para ensayos analíticos prolongados. Con frecuencia se prefieren las mediciones físicas y químicas a los ensayos microbiológicos, porque pueden realizarse rápidamente y a menudo indican el control microbiológico del producto.

Todos los registros y documentos relacionados con la vigilancia de los PCC deberán estar firmados por la persona o personas que efectúan la vigilancia y por el funcionario o funcionarios de la empresa encargados de la revisión.

**A.5.10. Establecimiento de medidas correctivas.**

Con el fin de hacer frente a las desviaciones que puedan producirse, deberán formularse medidas correctivas específicas para cada PCC. Estas medidas deberán asegurar que el PCC vuelva a estar controlado. Las medidas adoptadas deberán incluir también un sistema adecuado de eliminación del producto afectado. Los procedimientos relativos a las desviaciones y la eliminación de los productos deberán documentarse en los registros del PEMA.

**A.5.11. Establecimiento de procedimientos de Vigilancia.**

Deberán establecerse procedimientos de vigilancia para determinar si el PEMA funciona correctamente, podrán utilizarse métodos, procedimientos y ensayos de comprobación y verificación, en particular mediante muestreo aleatorio y análisis. La frecuencia de las comprobaciones deberá ser suficiente para confirmar que el PEMA está funcionando eficazmente. La comprobación deberá efectuarla una persona distinta de la encargada de la vigilancia y las medidas correctivas. En caso de que algunas de las actividades de comprobación no se puedan llevar a cabo por el organismo operador responsable, podrán ser realizadas por expertos externos o terceros calificados en nombre del mismo.

Entre las actividades de comprobación pueden citarse, a título de ejemplo, las siguientes:

- a) Examen del PEMA y de sus registros;
- b) Examen de las desviaciones;
- c) Confirmación de que los PCC se mantienen bajo control.

Cuando sea posible, las actividades de validación deberán incluir medidas que confirmen la eficacia de todos los elementos del PEMA.

**A.5.12. Establecimiento de un sistema de documentación y registro.**

Para aplicar un PEMA, es fundamental que se apliquen prácticas de registro eficaces y precisas. Deberán documentarse los procedimientos y los sistemas de documentación y registro, deberán ajustarse a la naturaleza y magnitud de la operación en cuestión y ser suficientes para ayudar a comprobar que se realizan y mantienen los controles dentro de los intervalos establecidos, del sistema de distribución de agua.

Los ejemplos de documentación son:

- a) Análisis de peligros;
- b) Determinación de los PCC, y
- c) Determinación de los límites críticos.

Como ejemplos de registros se pueden mencionar:

- a) Actividades de vigilancia de los PCC;
- b) Desviaciones y las medidas correctivas correspondientes;
- c) Procedimientos de comprobación aplicados, y
- d) Modificaciones al plan del sistema de APPC.

**Apéndice B Normativo.****Guías de procesos para la potabilización del agua.**

Se puede aplicar los procesos de potabilización específicos siguientes o los que resulten de las pruebas de tratabilidad.

Parámetros	Tratamientos
<b>FÍSICOS</b>	
pH	Neutralización.
Turbiedad	Coagulación-floculación-sedimentación-filtración. Ultrafiltración. Microfiltración. Microfloculación con ozono. Filtración lenta. Filtración en múltiples etapas. Ósmosis inversa.

<b>PARÁMETROS INORGÁNICOS</b>	
Cianuros Totales	Coagulación-floculación-sedimentación-filtración. Oxidación química.
Dureza Total	Ablandamiento químico. Nanofiltración. Intercambio iónico. Ósmosis inversa. Electrodialisis.
Fluoruros	Ablandamiento químico <sup>1</sup> , coagulación. Adsorción en alúmina activada. Ósmosis inversa. Electrodialisis. Adsorción en carbón de hueso.
Nitrógeno de Nitratos	Intercambio iónico. Ósmosis inversa. Electrodialisis. Tratamiento biológico (desnitrificación).
Nitrógeno de Nitritos	Intercambio iónico. Ósmosis inversa. Electrodialisis. Oxidación química. Ozonización
<b>MICROORGANISMOS</b>	
Bacterias ( <i>E. coli</i> , coliformes fecales, organismos termotolerantes y enterobacterias patógenas).	Coagulación/floculación/sedimentación/filtración, seguida por desinfección. Filtración en múltiples etapas. Filtración lenta. Microfiltración. Ultrafiltración, seguida de desinfección. Desinfección con luz ultravioleta, ozono, cloro, compuestos de cloro (dióxido de cloro), yodo o plata iónica o coloidal.
Quistes de protozoarios ( <i>Giardia lamblia</i> )	Coagulación-floculación-sedimentación. La efectividad depende del coagulante, la temperatura, el pH, alcalinidad y turbiedad. Remoción completa mediante procesos de filtración en membrana, si éstas se conservan íntegras. Filtración lenta. Procesos de membrana: microfiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. Ozonización.
<b>METALES Y METALOIDES</b>	

Arsénico	<p>Coagulación-floculación-sedimentación o flotación-filtración.<sup>1</sup>          Ósmosis inversa.          Intercambio aniónico.<sup>2</sup>          Electrodiálisis.<sup>2</sup>          Adsorción en alúmina activada.<sup>2</sup>          Ablandamiento y precipitación con cal.<sup>1</sup>          Adsorción con óxidos de hierro.          Adsorción sobre óxidos de hierro granular o arenas cubiertas con óxido de hierro.- Remueve As (III) y As (V).          Nanofiltración.</p>
Antimonio	<p>Coagulación-precipitación-filtración.          Ósmosis inversa.          Electrodiálisis.</p>
Bario	<p>Intercambio catiónico.          Ablandamiento y precipitación con cal.          Electrodiálisis</p>
Cadmio	<p>Coagulación-floculación-sedimentación o flotación-filtración.          Ablandamiento con cal<sup>2</sup>.          Ósmosis inversa.          Intercambio catiónico.          Extracción selectiva con resinas de intercambio aniónico en medio básico (para cantidades traza del elemento).</p>
Cobre	<p>Coagulación-floculación-sedimentación-filtración.          Intercambio catiónico.          Ósmosis inversa.</p>
Cromo	<p>Cromo trivalente:          Coagulación-floculación-sedimentación o flotación-filtración.          Ósmosis inversa.          Intercambio catiónico.          Electrodiálisis.          Ablandamiento con cal.<sup>1</sup>          Cromo hexavalente:          Ósmosis inversa.          Intercambio aniónico.          Electrodiálisis.</p>
Mercurio	<p>Mercurio inorgánico:          Ósmosis inversa.          Electrodiálisis.          Ablandamiento con cal.<sup>1</sup>          Coagulación-floculación-sedimentación o flotación-filtración.          Adsorción en carbón activado.          Extracción selectiva con resinas de intercambio aniónico en medio básico (para cantidades traza del elemento).</p>
Níquel	<p>Ósmosis inversa.</p>

	Intercambio catiónico. Electrodiálisis.
Plomo	Ósmosis inversa. Intercambio catiónico. Electrodiálisis.
Selenio	Para selenio tetravalente y hexavalente: Ósmosis inversa. Intercambio aniónico. Electrodiálisis. Adsorción en alúmina activada. Sólo para selenio tetravalente: Coagulación-floculación-sedimentación o flotación-filtración. Membranas.
<b>FITOTOXINAS</b>	
Microcistina-LR	La filtración es una opción para la remoción de cianobacterias intactas. Si las microcistinas u otras cianotoxinas se encuentran libres en el agua, se ha recomendado la oxidación con ozono o cloro, en concentraciones y tiempos de contacto adecuados, así como carbón activado granular o carbón activado en polvo.
<b>SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN <sup>3</sup></b>	
<b>TRIHALOMETANOS</b>	
Bromodiclorometano	Desorción con aire. Adsorción en carbón activado granular. Oxidación con ozono.
Bromoformo	
Cloroformo	
Dibromoclorometano	
<b>ÁCIDOS HALOACÉTICOS TOTALES</b>	
Ácido Tricloroacético	Ozonización y filtración biológicamente activa.
Ácido dicloroacético	Coagulación para remover precursores y/o control del pH durante la cloración.
Ácido Cloroacético	
<b>ANIONES</b>	
Bromatos	Una vez que se forman es difícil removerlos. La prevención se basa en el control apropiado de las condiciones de desinfección. Cuando en la fuente hay bromuros, se previene la formación con la presencia de amonio a pH 9.
Cloratos	No hay tratamiento. Puede evitarse o controlarse su formación mediante prácticas del control de la dosis de dióxido de cloro o la adición del anión cuando se aplica hipoclorito de sodio.
Cloritos	Aplicación de sales ferrosas.
<b>FORMALDEHÍDO</b>	Control y modificación del proceso para evitar la generación

	de concentraciones $\geq 0.03$ mg/L.
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS HALOGENADOS ADSORBIBLES FIJOS</b>	Carbón activado granular. Ozonización. Oxidación avanzada. Membranas.
	Nanofiltración Ósmosis inversa Filtros de carbón activado granular. ozonización.
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS NO HALOGENADOS</b>	Nanofiltración. Ósmosis inversa. Filtros de carbón activado granular. Ozonización
	Procesos avanzados de oxidación, carbón activado granular.
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS HALOGENADOS ADSORBIBLES PURGABLES</b>	Procesos avanzados de oxidación. Arrastre con aire. Ozonización.
<b>CARBONO ORGÁNICO PURGABLE</b>	Carbón activado granular. Arrastre con aire. Ozonización.

Notas:

1. Sólo en caso que el agua también presente alta dureza carbonatada.
2. En caso de arsénico trivalente será necesaria una etapa de oxidación previa al tratamiento.

#### **Apéndice C Normativo.**

##### **Procedimientos para el muestreo.**

##### **C.1. Preparación de envases para toma de muestra.**

Los envases para la toma de muestra y la hoja de cadena de custodia, deberán ser proporcionados por el laboratorio responsable del análisis.

##### **C.1.1 Para análisis microbiológico.**

Esterilización de frascos para muestras de agua. Esterilizar los frascos de muestreo en estufa a 170°C, por un tiempo mínimo de 60 min o en autoclave a 121°C durante 15 min, antes de la esterilización debe cubrirse el tapón del frasco con papel resistente a ésta, en forma de capuchón, en caso de utilizar frascos con tiosulfato para muestras de agua que contienen cloro residual libre, previo a la esterilización agregar 0.1 mL de tiosulfato de sodio al 3% por cada 120 mL de capacidad de los mismos.

La colecta de muestras con alto contenido de metales, incluyendo cobre o zinc (mayor a 1.0 mg/L), los frascos para el muestreo deben contener 0.3 mL de solución de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 15 % (ajustar el pH de la solución a 6.5, antes de su uso en frasco de 120 mL de capacidad adicionar por separado al frasco de muestreo antes de la esterilización o combinarse con la solución de tiosulfato de sodio antes de la adición.

##### **C.1.2 Para análisis físico, químico y radiactivo.**

El volumen mínimo de la muestra se indica en la Tabla C.1.

Para muestras que no requieren de envases prelavados con algún reactivo, tomar un poco del agua que se va a analizar, se cierra el envase y agita fuertemente para enjuagar, desechando esa agua; se efectúa esta operación dos o tres veces, procediendo enseguida a la toma de muestra.

## **C.2 Manejo de muestras.**

Las muestras deben colocarse en hielera con bolsas refrigerantes, de gel o bolsas de hielo cerradas para su transporte al laboratorio, a una temperatura entre 4 y 10°C, cuidando de no congelarlas. El hielo utilizado debe cumplir con las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana citada en el punto 3.2, del capítulo de Referencias, de esta Norma.

El periodo máximo que debe transcurrir entre la toma de muestra y el inicio del análisis es:

- a) Para análisis microbiológico de preferencia entre las 4 y 8 h, máximo 24 h.
- b) Para análisis físicos, químicos y radiactivos, el periodo depende de la preservación empleada para cada parámetro, como se indica en la Tabla C.1.

### **C.2.1. Identificación y control de muestras.**

Para la identificación de las muestras deben etiquetarse los envases con la siguiente información:

**C.2.1.1.** Número de control para identificar la muestra, independientemente del número de registro del laboratorio.

**C.2.1.2.** Fecha y hora de muestreo.

**C.2.2.** Para el control de la muestra deben anotarse, en la hoja de custodia, los datos correspondientes a la etiqueta del envase, así como la siguiente información:

**C.2.2.1.** Identificación del punto o sitio de muestreo;

**C.2.2.2.** Temperatura del agua;

**C.2.2.3.** pH;

**C.2.2.4.** Cloro residual libre;

**C.2.2.5.** Tipo de análisis a efectuar;

**C.2.2.6.** En su caso, reactivo empleado para la preservación;

**C.2.2.7.** Observaciones relativas a la toma de muestra, en su caso, de preferencia en situaciones de muestras especiales provenientes de alguna contingencia o evento ocasional, y

**C.2.2.8.** Nombre de la persona que realizó el muestreo.

### **C.3. Procedimiento para toma de muestra.**

#### **C.3.1. En obra de captación con bomba de mano, grifo o válvula.**

El agua de los grifos o válvulas debe provenir directamente del sistema de distribución. No debe efectuarse toma de muestra en grifos o válvulas que presenten fugas entre el tambor y el cuello, ya que el agua puede correr por la parte exterior del grifo o válvulas y contaminar la muestra. Deben removerse los accesorios o aditamentos externos como mangueras, boquillas y filtros de plástico o hule antes de tomar la muestra.

##### **C.3.1.1. Microbiológicos.**

Colocarse guantes, limpiar el orificio de salida del grifo o válvula con una gasa estéril o torunda de algodón impregnada de solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 100 mg/L., alternativamente cuando el material y las condiciones del punto de salida lo permitan, se podrá calentar a flama directa y posteriormente limpiarse con alcohol.

Debe dejarse correr el agua hasta asegurarse que el agua que contenían las tuberías ha sido renovada o que la temperatura del agua se ha estabilizado antes de tomar la muestra. Reducir el volumen de flujo para permitir el llenado del envase sin salpicaduras.

Cerca del orificio de salida, en el caso de frascos de vidrio con tapón esmerilado y protegidos con papel, deben quitarse simultáneamente el tapón del frasco y el papel de protección, manejándolos como unidad,

evitando que se contaminen el tapón, el papel de protección, o el cuello del frasco. Para lo anterior es necesario sostener el tapón o tapa con el esmerilado o rosca hacia abajo; en el caso de frascos estériles desechables desprender y eliminar el sello de seguridad y mantener la tapa con la rosca hacia abajo; para el caso de uso de bolsas estériles desprender y eliminar el sello de seguridad de la bolsa.

Proceder a tomar la muestra sin enjuagar el envase; se debe dejar el espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis, aproximadamente 10% de volumen del frasco. Efectuada la toma de muestra, deben colocarse el tapón con el papel de protección o la tapa al frasco; en el caso de las bolsas proceder al cerrado hermético.

Si el pozo no cuenta con grifo o válvula para toma de muestra, debe abrirse la válvula de una tubería de desfogue y proceder como en el caso de grifo o válvula.

### **C.3.2. En obra de captación o tanque de almacenamiento sin bomba de mano, grifo o válvula.**

Deben lavarse manos y antebrazos con agua y jabón, para el muestreo microbiológico colocarse guantes.

En el caso de frascos de vidrio con tapón esmerilado quitar únicamente el papel de protección evitando que se contamine y en el caso de envases y bolsas estériles desechables, desprender el sello de seguridad.

Sumergir el envase en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad de 15 a 20 cm para muestras microbiológicas y de compuestos volátiles y a dos terceras partes de la profundidad total del tanque u obra de captación para los demás parámetros, destapar y a continuación girar el envase ligeramente permitiendo el llenado, en todos los casos debe evitarse tomar la muestra de la capa superficial o del fondo, donde puede haber nata o sedimento y en el caso de obras de captación de cuerpos de agua superficiales, no deben tomarse muestras próximas a la orilla o distantes del punto de extracción; si existe corriente en el cuerpo de agua, la toma de muestra debe efectuarse con la boca del envase a contracorriente. Efectuada la toma de muestra debe colocarse el tapón o tapa, sacar el envase del agua y colocar el papel de protección en su caso. Si se utiliza bolsa, sumergirla a la profundidad arriba indicada. Tomar la muestra y cerrar la bolsa bajo el agua, posteriormente sellar ésta fuera del agua.

Cuando no es posible tomar la muestra con la extensión del brazo, debe atarse al envase un sobrepeso usando el extremo de un cordel limpio, o en su caso equipo comercial de muestreo.

Proceder a tomar la muestra, bajando el envase dentro de la obra de captación o tanque hasta una profundidad de 15 a 20 cm para muestras microbiológicas y de compuestos volátiles y a dos terceras partes de la profundidad total del tanque u obra de captación para los demás parámetros, evitando que el envase toque las paredes.

### **C.3.3. En obra de captación de embalse, lago o río.**

Deben lavarse manos y antebrazos con agua y jabón, para muestreo microbiológico, colocarse guantes.

En el caso de frascos de vidrio con tapón esmerilado quitar únicamente el papel de protección evitando que se contamine y en el caso de envases y bolsas estériles desechables, desprender el sello de seguridad.

#### **C.3.3.1. Microbiológicos.**

Sumergir el envase en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad de 15 a 20 cm para muestras microbiológicas, destapar y a continuación girar el envase ligeramente permitiendo el llenado, en todos los casos debe evitarse tomar la muestra de la capa superficial o del fondo, donde puede haber nata o sedimento y en el caso de obras de captación de cuerpos de agua superficiales, no deben tomarse muestras próximas a la orilla o distantes del punto de extracción; si existe corriente en el cuerpo de agua, la toma de muestra debe efectuarse con la boca del envase a contracorriente. Efectuada la toma de muestra debe colocarse el tapón o tapa, sacar el envase del agua y colocar el papel de protección, en su caso. Si se utiliza bolsa, sumergirla a la profundidad arriba indicada. Tomar la muestra y cerrar la bolsa bajo el agua, posteriormente sellar ésta fuera del agua. Cuando no es posible tomar la muestra con la extensión del brazo, debe atarse al envase un sobrepeso usando el extremo de un cordel limpio, o en su caso equipo comercial de muestreo. Proceder a tomar la muestra, bajando el envase dentro de la obra de captación o tanque hasta una profundidad de 15 a 20 cm, evitando que el envase toque las paredes.

#### **C.3.3.2. Microcistina.**

Sumergir el envase en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad de 15 a 20 cm para muestras microbiológicas, destapar y a continuación girar el envase ligeramente permitiendo el llenado, en todos los casos debe evitarse tomar la muestra de la capa superficial o del fondo, donde puede haber nata o sedimento y en el caso de obras de captación de cuerpos de agua superficiales, no deben tomarse muestras próximas a la orilla o distantes del punto de extracción; si existe corriente en el cuerpo de agua, la toma de muestra debe efectuarse con la boca del envase a contracorriente. Efectuada la toma de muestra debe colocarse el tapón o tapa, sacar el envase del agua y colocar el papel de protección, en su caso. Si se utiliza bolsa, sumergirla a la profundidad arriba indicada. Tomar la muestra y cerrar la bolsa bajo el agua, posteriormente sellar ésta fuera del agua. Cuando no es posible tomar la muestra con la extensión del brazo, debe atarse al envase un sobrepeso usando el extremo de un cordel limpio, o en su caso equipo comercial de muestreo. Proceder a tomar la muestra, bajando el envase dentro de la obra de captación o tanque hasta una profundidad de 15 a 20 cm, evitando que el envase toque las paredes.

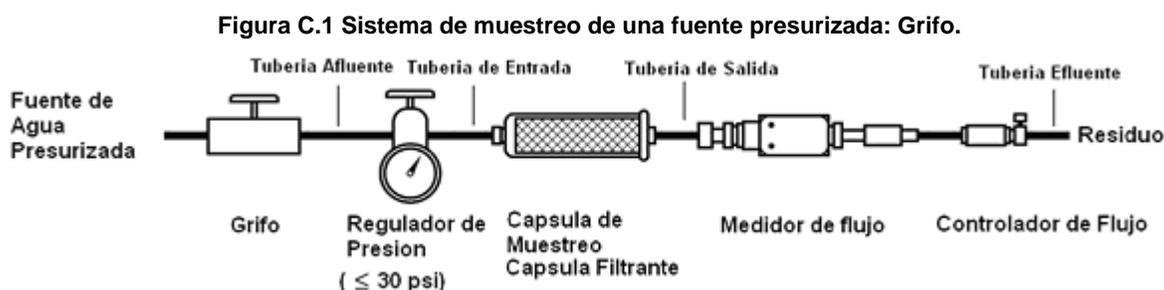
### C.3.3.3. Giardia.

Toma de muestra en el punto de uso o muestreo en línea.

Para el muestreo de oquistes y quistes de Giardia se deberá usar guantes.

La recolección de muestras puede ser a través de una fuente presurizada y no presurizada.

C.3.3.3.1. La recolección de muestras puede ser a través de una fuente presurizada.



C.3.3.3.1.1. Antes de conectar el sistema de muestreo, dejar correr el agua de 2 a 3 min o hasta que la turbidez del agua sea uniforme.

C.3.3.3.1.2. Ajustar el flujo de agua.

C.3.3.3.1.3. Conectar el sistema de muestreo sin la cápsula filtrante. (Ver figura C.1).

C.3.3.3.1.4. Abrir el grifo y dejar pasar el agua hasta regular la velocidad de flujo a 2 L/min.

C.3.3.3.1.5. Permitir el paso de 2 a 10 L de agua como parte del enjuague del sistema.

C.3.3.3.1.6. Identificar con marcador indeleble sobre la etiqueta de la cápsula filtrante: lugar de muestreo, nombre del operador, fecha, lecturas de medición iniciales y turbidez de la muestra.

C.3.3.3.1.7. Instalar la cápsula filtrante en la línea del sistema, asegurando la entrada y salida con los sujetadores o accesorios apropiados.

C.3.3.3.1.8. Iniciar la filtración.

C.3.3.3.1.9. Abrir el flujo de agua y la válvula de venteo de la cápsula filtrante hasta quedar completamente llena la cápsula.

C.3.3.3.1.10. Dejar pasar de 10 hasta 50 L de agua, cerrar el grifo permitiendo que la presión baje completamente.

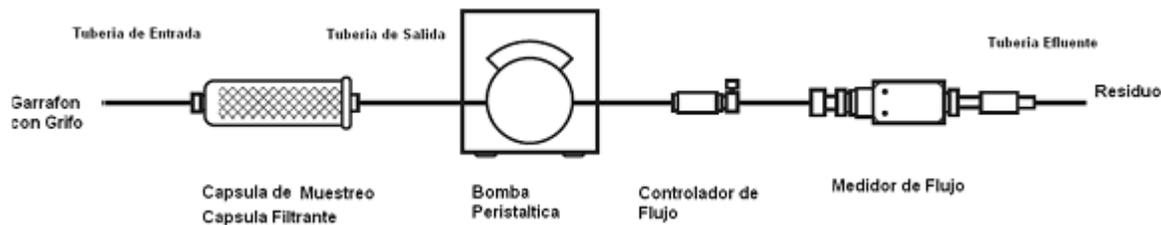
C.3.3.3.1.11. Registrar el tiempo de término y las lecturas de medición finales en la etiqueta de la cápsula.

C.3.3.3.1.12. Desconectar la entrada de la cápsula asegurándose de no derramar nada de agua de la cápsula y tapar.

C.3.3.3.1.13. Aflojar la salida de la cápsula y sellar la cápsula con la tapa de vinil.

C.3.3.3.1.14. Colocar las cápsulas en una hielera, con bolsas de gel para mantenerlas frías y transportarlas al laboratorio.

C.3.3.3.2. Sistema de muestreo de una fuente no presurizada: Tanques.

**Figura C.2 Sistema de muestreo de una fuente no presurizada**

**C.3.3.3.2.1.** Ajustar el flujo de agua.

**C.3.3.3.2.2.** Conectar el sistema de muestreo sin la cápsula filtrante al garrafón con la muestra de agua.

**C.3.3.3.2.3.** Encender la bomba peristáltica para ajustar la velocidad de flujo: 2 L/min.

**C.3.3.3.2.4.** Permitir el paso de 2 a 10 L de agua como parte del enjuague del sistema y ajustar la bomba en este periodo.

**C.3.3.3.2.5.** Apagar la bomba cuando la velocidad de flujo haya sido ajustada.

**C.3.3.3.2.6.** Identificar con marcador indeleble sobre la etiqueta de la cápsula filtrante, el lugar de muestreo, nombre del operador, fecha, lecturas de medición iniciales y turbidez de la muestra.

**C.3.3.3.2.7.** Instalar la cápsula filtrante en la línea del sistema, asegurando la entrada y salida con los sujetadores o accesorios apropiados.

**C.3.3.3.2.8.** Colocar un garrafón graduado al final del sistema para el drenado con capacidad mayor al volumen filtrado o igual para facilitar la filtración de la muestra.

**C.3.3.3.2.9.** Iniciar la filtración.

**C.3.3.3.2.10.** Abrir el grifo del garrafón y la válvula de venteo de la cápsula hasta quedar completamente llena por gravedad.

**C.3.3.3.2.11.** Encender la bomba peristáltica para iniciar el flujo del agua a través de la cápsula filtrante.

**C.3.3.3.2.12.** Verificar que la velocidad de flujo sea de 2 L/min.

**C.3.3.3.2.13.** Dejar pasar toda la muestra del garrafón (10 L o 50 L), apagar la bomba peristáltica permitiendo que la presión baje completamente.

**C.3.3.3.2.14.** Enjuagar el garrafón con 1 L de agua de enjuague para un garrafón de 10 L y 5 L de agua de enjuague para un garrafón de 50 L. Agitarlo y enjuagar las paredes, volver a conectar el sistema, encender la bomba permitiendo el paso del agua a través de la cápsula filtrante.

**C.3.3.3.2.15.** Desconectar la entrada de la cápsula, asegurándose de no derramar nada de agua de la cápsula y tapar.

**C.3.3.3.2.16.** Aflojar la salida de la cápsula y sellar la cápsula con la tapa de vinilo.

**C.3.3.3.2.17.** Colocar las cápsulas en una hielera, con bolsas de gel para mantenerlas frías y transportarlas al laboratorio.

La muestra deberá ser almacenada en el laboratorio entre 1 y 10°C (evitando la congelación) hasta ser procesadas en un periodo no mayor de 96 h después del muestreo.

#### **C.3.3.4. Físicoquímicos.**

Los recipientes, reactivos y preservación de las muestras, deben ajustarse a lo indicado en la Tabla C.1.

**Tabla C.1. Requerimientos para el muestreo**

Parámetro	Recipiente	Volumen de muestra mínimo (mL)	Preservación	Almacenamiento máximo
Cloro y yodo residual.	Plástico o vidrio.	100	Analizar inmediatamente.	La determinación debe hacerse en el sitio de muestreo, 15 min.
Fluoruros.	Plástico.	100	No requiere.	28 días.
Hidrocarburos aromáticos volátiles.	Vial de vidrio, enjuagado con solventes orgánicos o secado, tapa recubierta de teflón.	25-40	Adicionar HCl a pH<2; agregar 1000 mg ácido ascórbico/L si contiene cloro residual; refrigerar.	14 días.
Mercurio.	Plástico o vidrio, enjuagado con 1:1 de HNO <sub>3</sub> .	1000	Adicionar HNO <sub>3</sub> hasta pH<2, refrigerar a 4°C.	28 días.
Nitritos.	Plástico o vidrio.	100	Analizar lo más pronto posible o refrigerar.	48 h.
pH.	Plástico o vidrio.	50	Analizar inmediatamente.	La determinación debe hacerse en el sitio de muestreo, 15 min.
Plaguicidas.	Vidrio, enjuagado con solventes orgánicos o secado, tapa recubierta de teflón.	1000	Refrigerar y adicionar 1000 mg de ácido ascórbico/L si hay presencia de cloro residual.	7 días hasta extracción; 40 días después de extracción.
Radiactividad alfa global.	Plástico o vidrio.	1000	Adicionar HCl O HNO <sub>3</sub> hasta pH <2.	6 meses.
Radiactividad beta global.	Plástico o vidrio.	1000	Adicionar HCl O HNO <sub>3</sub> hasta pH <2.	6 meses.
Temperatura.	Plástico o vidrio.		Medir inmediatamente.	15 min
Turbiedad.	Plástico o vidrio.	100	Analizar inmediatamente.	La determinación debe hacerse en el sitio de muestreo, 15 min.
Trihalometanos.	Vial de vidrio, tapa recubierta de teflón.	25-40	Refrigerar de 4-10°C en oscuridad.	7 días.
Yodo.	Vidrio (ámbar).	50	Medir inmediatamente.	No aplica
Microbiológico	Plástico o vidrio esterilizado.	300	Refrigerar de 4-10°C en oscuridad y agregar 0.1 mL de tiosulfato de sodio al 3% si presenta cloro residual.	24 h
Colifagos.	Plástico o vidrio esterilizado.	2 000		24 h
Protozoarios	Plástico o vidrio esterilizado.	20,000		24 h
Microcistina.	Plástico o vidrio.	2 000	Refrigerar de 4-10°C en oscuridad.	48 h.
Ooquistes y quistes de Giardia.	Cápsula filtrante y Garrafón plástico.	10 000	Refrigeración de 1 a 10°C.	96 h

**Apéndice D Normativo.**

**Métodos de prueba.****D.1. Determinación de Coliformes fecales, Método de tubos múltiples.****D.1.1. Fundamento.**

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varias especies. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico. La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes, han presentado problemas. El primero, es que *E. coli* es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa, sino que lo hacen después de 48 h, por lo que no se les identifica por medio de este método. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperadas en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad.

Coliformes, bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que a 35°C fermentan la lactosa con la producción de gas bajo las condiciones especificadas en esta norma.

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a 35 ±1°C durante 24 a 48 h, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

**D.1.2. Condiciones de prueba y medidas de seguridad.**

**D.1.2.1.** Trabajar en condiciones asépticas en un área limpia y descontaminada.

**D.1.2.2.** Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante horno, durante 2 h., de 170 a 175°C o 1 h a 180°C o autoclave a 121 ±1.0°C durante 15 min como mínimo.

**D.1.2.3.** Seguir las indicaciones precautorias que se señalan en el apartado de preparación de medios de cultivo.

**D.1.2.5.** Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada con pH de 5 a 7.

**D.1.2.6.** El material de vidrio puede sustituirse por material desechable no tóxico. No debe usarse material de vidrio dañado por la esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

**D.1.3. Control de calidad.**

**D.1.3.1.** El laboratorio debe tener claramente definido un sistema de control de calidad para asegurar que los materiales, equipos, reactivos, medios de cultivo y técnicas sean adecuados para la prueba.

**D.1.4. Materiales.**

**D.1.4.1.** Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 mL y 1 mL (o si es necesario de 11 mL y 2 mL), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total;

**D.1.4.2.** Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca;

**D.1.4.3.** Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.;

**D.1.4.4.** Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm, con tapones metálicos o de rosca;

**D.1.4.5.** Campanas de fermentación (tubos de Durham);

**D.1.4.6.** Gradillas de plástico o metal, y

**D.1.4.7.** Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro.

**D.1.5. Medios de cultivo y reactivos.**

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

**D.1.5.1. Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).**

Ingrediente	Cantidad
Fosfato monopotásico.	34.0 g
Agua.	1.0 L

**D.1.5.1.1. Preparación.**

**D.1.5.1.1.1.** Disolver 34.0 g de fosfato monopotásico en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7.2 con solución reguladora de hidróxido de sodio 0.01 N o una disolución de HCl 0.01N según se requiera;

**D.1.5.1.1.2.** Llevar a 1L con agua;

**D.1.5.1.1.3.** Esterilizar durante 15 min a  $121 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ;

**D.1.5.1.1.4.** Conservar en refrigeración (solución concentrada);

**D.1.5.1.1.5.** Tomar 1.25 mL de la solución concentrada y llevar a 1 L con agua;

**D.1.5.1.1.6.** Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL para tener disponible cuando se requiera realizar dilución de la muestra;

**D.1.5.1.1.7.** Esterilizar durante 15 min a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$ ;

**D.1.5.1.1.8.** Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales, y

**D.1.5.1.1.9.** Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a  $5^\circ\text{C}$  en un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

**D.1.5.2. Caldo lactosado (medio de enriquecimiento para agua potable y hielo).**

Ingrediente	Medio de concentración 1.5	Medio de concentración sencilla
Extracto de carne.	4.5 g	3.0 g
Peptona de gelatina.	7.5 g	5.0 g
Lactosa.	7.5 g	5.0 g
Agua destilada.	1000.0 mL	1000.0 mL

**D.1.5.2.1. Preparación.**

**D.1.5.2.1.1.** Disolver los ingredientes en 1 L de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante;

**D.1.5.2.1.2.** Ajustar el pH final con disolución de hidróxido de sodio 0.01 N o una disolución de HCl 0.01N según se requiera, de tal manera que después de la esterilización éste sea de  $6.9 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ ;

**D.1.5.2.1.3.** Distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 mL en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1.5, cada tubo debe tener campana de fermentación;

**D.1.5.2.1.4.** Esterilizar en autoclave por 15 min a  $121 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ;

**D.1.5.2.1.5.** Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor. El aspecto del caldo es claro y de color beige, y

**D.1.5.2.1.6.** Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 mL del caldo preparado, cuando se agreguen 10 mL de la muestra.

**D.1.5.3. Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).**

Ingrediente	Medio de concentración 1.5	Medio de concentración sencilla
Triptosa.	30.0 g	20.0 g
Lactosa.	7.5 g	5.0 g
Fosfato dipotásico.	4.125 g	2.75 g
Fosfato monopotásico.	4.125 g	2.75 g
Cloruro de sodio.	7.50 g	5.0 g
Lauril sulfato de sodio.	0.15 g	0.1 g
Agua destilada.	1.0 L	1.0 L

**D.1.5.3.1. Preparación**

**D.1.5.3.1.1.** Disolver los componentes en 1 L de agua, calentando si es necesario o cuando utilice medio de cultivo deshidratado siga las instrucciones del fabricante;

**D.1.5.3.1.2.** Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de  $6.8 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ;

**D.1.5.3.1.3.** Distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 mL en tubos de 20 x 200 mm, el medio de concentración 1.5, cada tubo debe tener campana de fermentación (Durham);

**D.1.5.3.1.4.** Esterilizar en autoclave por 15 min a  $121 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ;

**D.1.5.3.1.5.** Se recomienda almacenar en refrigeración el medio una vez preparado;

**D.1.5.3.1.6.** Las campanas de fermentación no deben de contener burbujas de aire una vez atemperadas después de la esterilización;

**D.1.5.3.1.7.** Alternativamente a las campanas de Durham, utilizar púrpura de bromocresol a una concentración de 0.01 g/L al caldo de laurilriptosa, la producción de ácido se observará por el vire de este indicador, y

**D.1.5.3.1.8.** Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 mL de caldo preparado, cuando se agreguen 10 mL de muestra.

**D.1.5.4. Caldo bilis verde brillante (medio de confirmación).**

Ingrediente	Cantidad
Peptona.	10.0 g
Lactosa.	10.0 g
Sales biliares.	20.0 g
Verde brillante.	0.0133 g
Agua.	1.0 L

**D.1.5.4.1. Preparación.**

**D.1.5.4.1.1.** Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario;

**D.1.5.4.1.2.** Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7.2 a  $25^{\circ}\text{C}$ ;

**D.1.5.4.1.3.** Distribuir el medio en cantidades de 10 mL en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación;

**D.1.5.4.1.4.** Esterilizar en autoclave por 15 min a  $121 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ , y

**D.1.5.4.1.5.** Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

**D.1.5.5. Caldo EC.**

Ingrediente	Medio de concentración sencilla
Triptosa.	20.0 g
Lactosa.	5.0 g
Fosfato dipotásico.	4.0 g
Fosfato monopotásico.	1.5 g
Cloruro de sodio.	5.0 g
Mezcla de sal de bilis.	1.5 g
Agua destilada.	1.0 L

**D.1.5.5.1. Preparación.**

**D.1.5.5.1.1.** Disolver los componentes en 1 L de agua, calentando si es necesario o cuando utilice medio de cultivo deshidratado siga las instrucciones del fabricante;

**D.1.5.5.1.2.** Distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm cada tubo debe tener campana de fermentación (Durham) invertida;

**D.1.5.5.1.3.** Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de  $6.9 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ;

**D.1.5.5.1.4.** Esterilizar en autoclave por 12 min a  $121 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ , y

**D.1.5.5.1.5.** Se recomienda almacenar en refrigeración el medio una vez preparado.

#### **D.1.6. Aparatos e instrumentos.**

**D.1.6.1.** Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de  $170^{\circ}\text{C}$ , con termómetro calibrado y/o verificado;

**D.1.6.2.** Incubadora que evite variaciones mayores a  $0.5^{\circ}\text{C}$  y termómetro calibrado y/o verificado;

**D.1.6.3.** Incubadora con recirculación de agua que evite variaciones mayores a  $0.5^{\circ}\text{C}$  y termómetro calibrado y/o verificado;

**D.1.6.4.** Termómetro de máximas y mínimas;

**D.1.6.5.** Autoclave que alcance una temperatura mínima de  $121 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  con termómetro calibrado y/o verificado, y

**D.1.6.6.** Potenciómetro con una escala mínima de 0.1 unidades de pH a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### **D.1.7. Recomendaciones generales previas al análisis de la muestra.**

Las muestras en frascos con un espacio vacío (de al menos 2.5 cm), pueden homogeneizarse por inversión rápida 25 veces. Las muestras en frascos que tengan de  $\frac{2}{3}$  a  $\frac{3}{4}$  de lleno, deberán agitarse 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm, completados en un tiempo de 7 s, para asegurar una unidad analítica representativa.

Como alternativa al uso de campanas de fermentación (Durham) utilizar púrpura de bromocresol a una concentración de 0.01 g/L al medio de cultivo, la producción ácida se observará por el vire de este indicador.

#### **D.1.8. Procedimiento.**

##### **D.1.8.1. Coliformes totales presuntivo.**

**D.1.8.1.1.** Inoculación. Agitar la muestra. Transferir volúmenes de 10 mL de muestra a cada uno de 5 tubos con 20 mL de caldo lactosado de mayor concentración o caldo lauril sulfato triptosa de concentración 1.5 mL, 1.0 mL y 0.1 mL de muestra a cada uno de los tubos de las series de 5 respectivamente con 10 mL de caldo lactosado de concentración sencilla o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol.

**D.1.8.1.2.** Incubación. Incubar los tubos a  $35^{\circ}\text{C}$ . Examinar a las  $24 \pm 2$  h y observar si hay formación de gas o la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por  $48 \pm 2$  h.

##### **D.1.8.2. Coliformes totales confirmativo.**

De cada tubo de la prueba con caldo lactosado o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol que muestre hidrólisis del medio y formación de gas, agitar y tomar una azada, procediendo a sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación, caldo bilis verde brillante incubar a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h, o si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por  $48 \pm 2$  h.

##### **D.1.8.3. Coliformes fecales confirmativo.**

Como una alternativa de cada tubo que muestre hidrólisis del medio o formación de gas, agitar y tomar una azada, procediendo a sembrar en un número igual de tubos con medio EC.

#### **D.1.9. Expresión de los resultados**

Considerar los tubos del procedimiento coliformes totales confirmativo del medio bilis verde brillante en que se observe formación de gas, después del periodo de incubación requerido y buscar el NMP de coliformes totales/100 mL (véase Tabla A.1.1.).

Considerar los tubos del procedimiento coliformes fecales confirmativo del medio EC en que se observe formación de gas, después del periodo de incubación requerido y buscar el NMP de coliformes fecales/100 mL (véase Tabla A.1.1.).

#### D.1.10. Consideraciones generales.

**D.1.10.1.** Cuando sólo una dilución muestra tres tubos positivos, elegir ésta y las diluciones mayores posteriores.

**D.1.10.2.** Cuando más de una dilución muestra tres tubos positivos y la última da menos de tres, elegir esta última y las dos diluciones anteriores más bajas.

**D.1.10.3.** Cuando en ninguna dilución hay tres tubos positivos y éstos se encuentran en más de tres diluciones, seleccionar las dos diluciones mayores positivas y la siguiente.

**D.1.10.4.** Cuando los tubos positivos sólo se encuentran en la muestra sin diluir (10 mL) y en la primera dilución (1 mL), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del NMP.

**D.1.10.5.** En cada caso se obtiene un número de tres cifras, lo cual es representado (véase tabla A.1.1.). En la columna que indica el número de tubos positivos se busca el índice del NMP.

**D.1.10.6.** La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución.

**D.1.10.7.** Evitar imprecisiones en los conteos debidos a descuido o fallas para reconocer colonias.

#### D.1.11. Índices de reproducibilidad y repetibilidad.

La precisión del analista deberá estar dentro de un 5% y entre analistas del 10%.

#### D.1.12. Informe de prueba.

**D.1.12.1.** Informar como:

NMP Coliformes totales/100 mL.

NMP Coliformes fecales/100 mL.

**Tabla. D.1.- NMP para 100 mL de muestra cuando se utilizan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas.**

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N
m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M
L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P
0	0	0	<1.8	1	0	0	2	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N	10	1.0	0.1	N
m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M	m	m	m	M
L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P	L	L	L	P
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Fuente: AOAC 18a. Edición. Revisión 2, 2007.

## D.2. Determinación coliformes fecales, Método de sustrato cromogénico.

### D.2.1. Fundamento.

Este método de prueba, se basa en la detección de *E. coli* en agua potable, fuentes de abastecimiento, agua de uso recreativo, agua envasada y hielo. Cuando el reactivo (comercialmente disponible) es adicionado a la muestra e incubado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Esta prueba detecta, 1 UFC de *E. coli*/100 mL. La fluorescencia se produce cuando *E. coli* metaboliza el indicador nutritivo. El medio puede utilizarse como presencia/ausencia o por cuantificación de: 5 tubos, 10 tubos, series de 15 tubos o el sistema de charolas de cuantificación (comercialmente disponibles).

### D.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

Medio que contiene el sustrato cromogénico definido (comercialmente disponible).

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

### D.2.3. Materiales.

D.2.3.1. Vasos estériles no fluorescentes;

D.2.3.2. Charolas con 51 celdas de un solo tamaño o;

D.2.3.3. Charolas con 48 celdas pequeñas y 48 celdas grandes;

D.2.3.4. Tubos de ensaye de 20 x 150 mm, y

D.2.3.5. Tubos de ensaye de 16 x 150 mm.

### D.2.4. Aparatos e instrumentos.

**D.2.4.1.** Selladora de charolas de cuantificación (comercialmente disponibles);

**D.2.4.2.** Lámpara de luz UV de 6 watts con una longitud de onda de 366 nm;

**D.2.4.3.** Incubadora a 37°C ±0.5°C de aire o baño de agua, y

**D.2.4.4.** Termómetro con variaciones de ±0.5°C con un intervalo de 10°C a 50°C calibrado y/o verificado.

#### **D.2.5. Procedimiento.**

Interferencia: La presencia de *Bacillus spp* puede interferir con la prueba en muestras de agua con una conductividad por arriba de 20,000 µSiemens/cm a 25°C. Por lo que es necesario hacer una dilución 1:10 con agua estéril.

##### **D.2.5.1. Presencia/Ausencia.**

**D.2.5.1.1.** Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 30°C).

**D.2.5.1.2.** Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira.

**D.2.5.1.3.** Golpear el paquete para asegurarse que todo el polvo se vaya al fondo.

**D.2.5.1.4.** Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma.

**D.2.5.1.5.** Agregar el reactivo a 100 mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible.

**D.2.5.1.6.** Cubrir y sellar asépticamente el recipiente.

**D.2.5.1.7.** Agitar hasta disolución del polvo.

**D.2.5.1.8.** Incubar por 24 h a 41°C ±0.5°C.

**D.2.5.1.9.** Observar la fluorescencia a las 24 h con la lámpara de UV de 6 watts y 366 nm de longitud onda en un cuarto oscuro. Asegurarse que la luz se encuentre alejada de sus ojos y dirigida hacia la muestra. Si se observa fluorescencia, se confirma entonces la presencia de coliformes fecales.

**D.2.5.1.10.** Si la muestra se incuba por más de 28 h, aplicar lo siguiente: Si no hay fluorescencia después de 28 h, se considera una prueba negativa válida. Si hay fluorescencia después de 28 h, se considera como un resultado inválido.

##### **D.2.5.2. NMP.- Procedimiento de enumeración para 100 mL de muestra.**

**D.2.5.2.1.** Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 30°C).

**D.2.5.2.2.** Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira.

**D.2.5.2.3.** Golpear el paquete para asegurarse que todo el polvo se vaya al fondo.

**D.2.5.2.4.** Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma.

**D.2.5.2.5.** Agregar el reactivo a 100 mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible.

**D.2.5.2.6.** Cubrir y sellar asépticamente el recipiente.

**D.2.5.2.7.** Agitar hasta disolución del polvo.

**D.2.5.2.8.** Vaciar la muestra con el reactivo dentro de la charola de cuantificación, evitar el contacto con la hoja de la charola y el sello (consultar el instructivo del reactivo).

**D.2.5.2.9.** Incubar 24 h a 41°C ± 0.5°C.

**D.2.5.2.10.** Seguir las mismas instrucciones de interpretación en los siguientes incisos (véase A.2.5.1.9. y A.2.5.1.10.) y contar el número de celdas positivas (fluorescencia). Interpolarse en las tablas (véase tabla A.3.1. y A.3.2.), proporcionada por el fabricante para determinar el NMP de *E. coli*/100 mL. El NMP en 100 mL de muestra equivale, en un 95% de confianza a las UFC presentes en 100 mL.

##### **D.2.5.3. NMP. Serie de 5 tubos con 20 mL y 10 tubos con 10 mL**

**D.2.5.3.1.** Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 30°C).

**D.2.5.3.2.** Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira.

**D.2.5.3.3.** Golpear el paquete para asegurarse que todo el polvo se vaya al fondo.

**D.2.5.3.4.** Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma.

**D.2.5.3.5.** Agregar el reactivo a 100 mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible.

**D.2.5.3.6.** Cubrir y sellar asépticamente el recipiente.

**D.2.5.3.7.** Agitar hasta disolución del polvo.

**D.2.5.3.8.** Transferir 20 mL a cada uno de los 5 tubos o 10 mL a cada uno de 10 tubos de la muestra con el reactivo. Asegurarse que los tubos no emitan fluorescencia por sí mismos.

**D.2.5.3.9.** Incubar 24 h a 41°C ± 0.5°C.

**D.2.5.3.10.** Seguir las mismas instrucciones de interpretación en los siguientes incisos (véase A.2.5.1.9. y A.2.5.1.10.) y contar el número de celdas positivas (fluorescencia). Referirse en las tablas (véase Tabla A.2.1. y A.2.2.), para el NMP de *E. coli*/100 mL.

**D.2.5.3.11.** NMP. Serie de 15 tubos de dilución.

#### **D.2.5.4. Muestra directa.**

**D.2.5.4.1.** Agregar un reactivo de sustrato cromogénico definido a un frasco (estéril) que contenga 100 mL de la muestra. Cerrar y homogeneizar hasta disolución del polvo.

**D.2.5.4.2.** Pipetear 5 veces 10 mL de la mezcla anterior y colocarlos en cada uno de 5 tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca, cerrar e identificar.

#### **D.2.5.5. Muestra diluida 1:10.**

**D.2.5.5.1.** Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira.

**D.2.5.5.2.** Golpear el paquete para asegurarse que todo el polvo se vaya al fondo.

**D.2.5.5.3.** Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma.

**D.2.5.5.4.** Agregar el reactivo del paquete con el sustrato cromogénico definido a un frasco estéril que contenga 100 mL de agua estéril (desionizada o destilada). Tapar y mezclar hasta disolución del reactivo. Pipetear 9 mL de esta mezcla a cada uno de 10 tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca estériles (5 tubos para la dilución 1:10 y 5 para la dilución 1:100) e identificarlos.

**D.2.5.5.5.** Pipetear 1 mL de la muestra (esto constituye una muestra diluida 1:10) dentro de cada uno de los primeros 5 tubos, preparados como se indicó anteriormente.

**D.2.5.5.6.** Cerrar y mezclar.

#### **D.2.5.6. Dilución 1:100.**

**D.2.5.6.1.** Pipetear 10 mL de la muestra homogeneizada a un frasco estéril que contenga 90 mL de agua estéril (desionizada o destilada). Cerrar y homogeneizar. Pipetear 1.0 mL de esta dilución dentro de cada uno de los 5 tubos restantes, preparados como anteriormente se indicó.

**D.2.5.6.2.** Tapar y mezclar.

#### **D.2.5.7. Diluciones adicionales.**

**D.2.5.7.1.** Para cualquier dilución adicional, seguir los lineamientos descritos en D.2.5.6.1. tomando en cuenta el grado de dilución pretendido.

#### **D.2.5.8 Incubación.**

**D.2.5.8.1.** Incubar las series de tubos inoculados a 41°C ±0.5°C por 24 h. Al cabo de este tiempo observar con una lámpara de luz UV de 6 watts con una longitud de onda de 366 nm. Determinar el NMP de *E. coli*/100 mL (véase Tabla A.3.3.)

#### **D.2.6. Expresión de los resultados.**

**D.2.6.1. Cálculos.**

**D.2.6.1.1.** Para determinar presencia de coliformes fecales o ausencia de coliformes fecales no hay cálculos que realizar.

**D.2.6.1.2.** Para la cuantificación referirse a las tablas de NMP correspondientes. Considerar en los cálculos la dilución cuando proceda.

**D.2.6.2. Interpretación de resultados.**

**D.2.6.2.1.** Si se observa fluorescencia en los frascos, tubos o charolas, se confirma entonces la presencia de *E. coli*.

**D.2.6.3. Criterios de validez de la prueba.**

**D.2.6.3.1.** Revisar y registrar las temperaturas de las incubadoras diariamente, a fin de asegurarse que se encuentran dentro de los límites establecidos en D.2.5.8.1.

**D.2.6.3.2.** Deberá llevarse a cabo un control de calidad en cada nuevo lote de reactivo, el cual consiste en el siguiente protocolo:

**D.2.6.3.3.** Para cada tipo de cepa ATCC enlistadas más adelante, estriar en agar.

**D.2.6.3.4.** De cada cepa bacteriana, tomar una asada de 1 µL de cada colonia e inocular un tubo de ensayo con 5 mL de agua desionizada estéril. Cerrar y agitar completamente.

**D.2.6.3.5.** A continuación tomar una asada de 1 µL del tubo de ensayo y usar para inocular un frasco con 100 mL de agua desionizada o destilada estéril debidamente etiquetada. Seguir los siguientes pasos:

**D.2.6.3.5.1.** Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 30°C);

**D.2.6.3.5.2.** Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira;

**D.2.6.3.5.3.** Golpear el paquete para asegurarse que todo el polvo se vaya al fondo;

**D.2.6.3.5.4.** Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma;

**D.2.6.3.5.5.** Agregar el reactivo a 100 mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible;

**D.2.6.3.5.6.** Cubrir y sellar asépticamente el recipiente;

**D.2.6.3.5.7.** Agitar hasta disolución del polvo;

**D.2.6.3.5.8.** Incubar por 24 h a 41°C ±0.5°C, y

**D.2.6.3.5.9.** Observar la fluorescencia a las 24 h con la lámpara de UV de 6 watts y 366 nm de longitud de onda en un cuarto oscuro. Asegurarse que la luz se encuentre alejada de sus ojos y dirigida hacia la muestra. Si se observa fluorescencia, se confirma entonces la presencia de enterococos fecales.

**D.2.6.3.5.10.** Si la muestra se incuba por más de 28 h, aplicar lo siguiente: Si no hay fluorescencia después de 28 h, se considera una prueba negativa válida. Si hay fluorescencia después de 28 h, se considera como un resultado inválido.

**D.2.6.3.5.11.** Comparar los resultados de esta prueba con los resultados esperados (véase Tabla D.2.1)

**Tabla.- D.2.1 Resultados esperados del control**

Control	ATCC	Resultados esperados
<i>Enterococcus faecium</i>	335667	Fluorescencia
<i>Serratia marcescens</i> (Gram -)	43862	No fluorescencia
<i>Aerococcus viridians</i> (Gram +)	10400	No fluorescencia

**D.2.7. Informe de prueba.**

Informar como presencia/ausencia o el resultado basado en el cálculo de la densidad de *E. coli* determinado en la tabla de NMP apropiada.

### **D.3. Determinación de Microcistina, Método inmunoenzimático.**

#### **D.3.1. Fundamento.**

Este método describe el Ensayo inmunoenzimático competitivo de enzimas-ligada (ELISA). En la prueba, la toxina microcistina en la muestra compete con la enzima (peroxidasa horseradish)- etiquetada a microcistina para un número limitado de sitios de enlace en la superficie interior de los pocillos de ensayo. Después de una etapa de lavado simple, el resultado de la competencia se visualiza en una etapa de desarrollo de Color. Como con todos los inmunoensayos competitivos de muestras, la concentración es inversamente proporcional al desarrollo del color.

Color más oscuro = concentración más baja

Color más ligero = concentración mayor

Límite de Detección

El límite de detección (LOD) de este kit es 0.147 ppb. El límite de detección fue determina por interpolación en 81,3% Conjugado microcistina-enzima (CME)\* de una curva estándar. 81,3% CME fue determinado a 3 desviaciones estándar de la media de una población de muestras de agua negativas.

\* 100% CME es igual a la cantidad máxima de conjugado microcistina-enzima que está unido por el anticuerpo en ausencia de cualquier microcistina en la muestra (es decir, control negativo). % CME= ((OD) de la muestra o calibrador/(OD) del control negativo) x 100.

#### **D.3.2. Límite de cuantificación.**

El límite de cuantificación (LOQ) de este kit se validó a 0,175 ppb (cuantificación entre el calibrador más bajo de 0,160 ppb y 0.175 ppb puede ser confiable, pero no se ha validado). El límite de cuantificación fue determinada por fortificar una población de las muestras de agua negativos en 0,175 ppb. La recuperación media fue de 108% con un coeficiente de variación (CV) [(desviación estándar/media) x 100] de 13,6%.

#### **D.3.3. Precisión.**

Soluciones control de Microcistina-fortificados se analizaron repetidamente dentro de un solo ensayo, y en ensayos diferentes en distintos días. Los datos se expresan como %CV tanto para la concentración y recuperado por absorbancia (OD).

#### **D.3.4. Fortalecimiento y Recuperación.**

Seis muestras de agua superficial se reforzaron con microcistina a una concentración de 1,0 ppb. La recuperación promedio fue de 111%, con un CV de 3,6%.

#### **D.3.5. Reactividad cruzada.**

Este kit no hace distinción entre las variantes de toxina microcistina, pero detecta su presencia en diferentes grados. La tabla adjunta muestra el valor de 50% CME y el valor para el 81,3% CME límite de detección para cuatro microcistina variantes de toxina y la toxina nodularina. La concentración es en ppb. El ácido húmico no interfiere en el ensayo hasta una concentración de 100 ppm.

#### **D.3.6. Materiales.**

**D.3.6.1.** Punta desechable para pipeta de 20 µl, 100 µl y 125 µl ajustable con desplazamiento de aire;

**D.3.6.2.** Rotulador (indeleble);

**D.3.6.3.** Cinta o Parafilm ;

**D.3.6.4.** Cronómetro (30 min);

**D.3.6.5.** Agua destilada para preparar solución de lavado;

**D.3.6.6.** Material de vidrio para almacenar la solución de lavado;

**D.3.6.7.** Pizeta para lavar las tiras con solución de lavado;

**D.3.6.8.** Lector de placas de microtitulación o lector de banda;

**D.3.6.9.** Lavador de placas de microtitulación (opcional);

**D.3.6.10** Pipeta de doce canales que medirá 20 µl, 100 µl y 125 µl (opcional);

**D.3.6.11.** Rack para Tubos de dilución (opcional), y

**D.3.6.12.** Agitador orbital de placas (opcional).

### **D.3.7. Preparación de las soluciones.**

#### **D.3.7.1. Buffer de lavado:**

Para hacer 1 L, añadir el contenido de un paquete de buffer fosfato salino - Tween 20, pH 7,4 (Solución de lavado de sales) a 1 L de agua destilada. Mezclar a fondo para disolver las sales. Ésta se puede almacenar a temperatura ambiente.

#### **D.3.8. Procedimiento.**

- Lea todas las instrucciones antes de correr el kit.
- Deje que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente antes de empezar (al menos 30 min con una caja tiras y reactivos a temperatura ambiente – no quitar las tiras de la bolsa con desecante, hasta que se hayan calentado).
- Organizar todas las muestras, reactivos y pipetas de manera que los pasos 1 y 2 puedan ser realizados en 10 min o menos.
- Si hay más de tres tiras se van a ejecutar a la vez, los 10 min es probable que se exceda, y el uso de una pipeta multicanal se recomienda (véase "Nota" a continuación).
- Si tres o menos tiras se van a ejecutar, utilice un dispositivo desechable de punta de desplazamiento de aire pipeta y una punta de pipeta limpia para añadir cada calibrador y la muestra a los pocillos.

Solución diluyente de ensayo, Conjugado, el Substrato y la Solución Stop puede ser adicionada de la misma manera, alternativamente, utilizar una pipeta de repetición con una punta desechable para estos tres reactivos.

- Si se utilizan menos de las doce tiras, vuelva a sellar las tiras no necesarias, devolverlas a la bolsa suministrada con el desecante.
- Utilice las marcas de identificación en el marco de la placa como guía cuando se adicionen las muestras y reactivos. Dos tiras pueden ser utilizadas para ejecutar el Control Negativo, tres calibradores (C1-C3) y muestras de cuatro, por duplicado.

**D.3.8.1.** Añadir rápidamente 125 µl de Diluyente de Ensayo microcistina a cada pocillo que será utilizado, preferiblemente con una pipeta de repetición o multicanal.

**D.3.8.2.** Inmediatamente adicionar 20 µl de Control Negativo, 20 µl de cada Calibrador (C1-C3) y 20 µl de cada Muestra (S1-S8) a sus respectivos pocillos, como se muestra a la izquierda. (Siga este mismo orden de adición de los reactivos).

#### **No añadir conjugado microcistina-enzima en este paso.**

**D.3.8.3.** Mezclar bien el contenido de los pocillos moviendo el soporte de tira con un rápido movimiento circular sobre la mesa de trabajo por un total de 20-30 s. Tenga cuidado de que no se derrame el contenido.

NOTA: Para reducir al mínimo el tiempo de configuración se recomienda que un canal de múltiples pipeta se use en las etapas 1, 2, 5, 8 y 10, cuando más de 3 tiras se utilizan.

**D.3.8.4.** Cubrir los pocillos con cinta o Parafilm para evitar la evaporación e incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Si se dispone de un agitador orbital agitar a 200 rpm.

**D.3.8.5.** Añadir 100 µl de conjugado microcistina-enzima a cada pocillo. No vacíe el contenido de los pocillos o lavar las tiras en este momento.

**D.3.8.6.** Mezclar bien el contenido de los pocillos como en el paso 3. Cubra los pocillos con cinta o parafilm y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Utilizar agitador orbital si están disponibles.

**D.3.8.7.** Después de la incubación, retire con cuidado la cubierta y agite con fuerza el contenido de los pocillos en un fregadero u otro recipiente adecuado. Bañar los pozos completamente con solución de lavado, y luego agitar para vaciarlo. Repita este paso de lavado cuatro veces. Sacudir golpeando la placa sobre una toalla de papel para remover la solución de lavado lo mejor que sea posible. Alternativamente, utilizar un lavador de placas de microtitulación con Solución de Lavado para una mejor etapa de lavado.

**D.3.8.8.** Añadir 100 µl de Substrato a cada pocillo.

**D.3.8.9.** Mezclar bien el contenido de los pocillos, como en el paso 3. Cubra los pocillos con nueva cinta o parafilm y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente.

Utilice un agitador orbital si están disponibles.

Precaución: la Solución Stop es de HCl 1,0 N Manipular con cuidado.

**D.3.8.10.** Añadir 100 µl de Solución Stop a cada pocillo y mezclar bien. Ésta tornará el contenido de los pocillos a color amarillo.

NOTA: Lea la placa dentro de los siguientes 30 minutos de la adición de la Solución Stop.

Cómo interpretar los resultados.

Medición espectrofotométrica.

1. Ajustar la longitud de su lector de placas de microtitulación a 450 nm. (Si tiene la capacidad de longitud de onda dual, utilice 600, 630 o 650 nm como referencia de longitud de onda).

2. Si el lector de placas no hace auto-cero en el aire, ajustar a cero el instrumento con un blanco de agua en pocillo con 200 µl. Medir y registrar la OD de cada contenido. Alternativamente, mida y registre la OD en cada pocillo, entonces restar la OD del blanco de agua de cada una de las lecturas.

3. Una curva ajustada semi-logarítmica deberá ser usada como curva estándar si el lector de placas de microtitulación que se está utilizando tiene la capacidad de reducción de datos. Si no, calcular los resultados manualmente como se describe en la siguiente sección.

Cómo calcular los resultados cuantitativos:

1. Después de leer los pozos, promediar la OD de cada set de calibradores y muestras, y calcular el % de conjugado microcistina-enzima (CME) como sigue:

$$\% \text{ CME} = (\text{Media OD del Calibrador o Muestra} / \text{OD Media del Control Negativo}) \times 100.$$

El cálculo del % CME se utiliza para igualar diferentes corridas de un ensayo. Mientras que valores netos de OD de los Controles Negativos, Calibradores y las Muestras pueden diferir de corrida a corrida. La relación % CME de calibradores y muestras para el Control Negativo deberá permanecer relativamente constante.

El CV para cada par de valores de OD de calibrador y OD de la muestra no debe exceder el 15%.

2. Graficar el % CME de cada calibrador contra la concentración de microcistina en una escala semi-logarítmica.

3. Determinar la concentración de microcistina de cada muestra mediante la búsqueda de su valor % CME y el nivel de concentración correspondiente en el gráfico.

4. La interpolación de concentración de la muestra es solamente posible si el % CME de la muestra cae dentro del rango de % CME de los calibradores.

Si el % CME de una muestra es mayor que el valor más bajo del calibrador, la muestra deberá ser reportada como menor de 0,16 ppb. (< 0.16 ppb).

Si el % CME de una muestra es menor que el valor más alto del calibrador, la muestra deberá ser reportada como más de 2.5 ppb. (>2.5 ppb). Si la concentración debe determinarse para estas muestras de alto nivel, diluir la muestra 1:8 en agua destilada. Correr esta dilución en una repetición del inmunoensayo. Si el resultado ahora cae dentro del rango de los % CME de los calibradores, entonces debe multiplicar la concentración medida en la muestra diluida por un factor de 8.

**Tabla D.3.1. Ejemplo de una configuración típica placa. (1 x 8 tiras)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	NC										
B	C1	C1										
C	C2	C2										
D	C3	C3										
E	S1	S1										
F	S2	S2										
G	S3	S3										
H	S4	S4										

**Tabla D.3.2. Ilustración Cálculo Cuantitativo.**

Contenido de Pocillos	OD	OD Media	%CV	%CME	Concentración Microcistina (ppb)
Control Negativo.	1.398 1.347	1.373	2.628	100	NA
Calibrador 0.16 ppb.	1.184 1.177	1.181	0.419	86	NA
Calibrador 0.6 ppb.	0.773 0.776	0.775	0.274	56.4	NA
Calibrador 2.5 ppb.	0.246 0.250	0.248	1.140	18.1	NA
Muestra.	0.573 0.567	0.570	0.744	41.5	1.01

Los valores actuales pueden variar; estos datos sólo tienen el propósito de demostración.

#### **D.3.9. Instrucciones para el Protocolo de ensayo con una mayor sensibilidad.**

El protocolo de ensayo siguiente producirá un ensayo con valores de calibrador de 0.05, 0.20 y 0.83 ppb. Este protocolo es adecuado sólo para muestras incoloras y/o de agua potable, aguas superficiales que contienen materia orgánica visible que causa probable interferencia en el ensayo.

NOTA: Todas las precauciones y notas sobre, cómo ejecutar el ensayo aplican a este formato de ensayo.

Además de los elementos mencionados anteriormente, estos elementos adicionales serán necesarios para este protocolo de análisis:

- Punta desechable ajustable para desplazamiento de aire, pipeta que medirá 50 y 200 µl.
- Tubos de ensayo de vidrio para diluir los calibradores.

Dilución de Calibradores.

Diluir el Control Negativo y los 3 Calibradores 1:3 en agua destilada, añadiendo 100 µl de cada Calibrador suministrado con este kit y 200 µl de agua destilada. Etiquetar estas diluciones de Control Negativo, 0,05, 0,20 y 0, 83 ppb. Mezclar bien.

#### **D.3.9.1. Procedimiento.**

**D.3.9.1.1.** Rápidamente añadir 50 µl de Diluyente de la Prueba microcistina a cada pocillo que será utilizado, preferiblemente con una pipeta de repetición o multicanal.

**D.3.9.1.2.** Inmediatamente, añadir 50 µl de Control Negativo, 50 µl de cada Calibrador diluido (C1-C3) y 50 µl de cada Muestra (S1-S8) a su respectivo pocillo. (Siga este mismo orden de adición para todos reactivos.) No añadir conjugado microcistina-enzima en este paso.

**D.3.9.1.3.** Mezclar bien el contenido de los pocillos moviendo el soporte de tira en un rápido movimiento circular sobre la mesa de trabajo para un total de 20-30 s. Tener cuidado de no derramar el contenido.

NOTA: Para reducir al mínimo el tiempo de configuración se recomienda que un canal de múltiples pipeta se use en las etapas 1, 2, 5, 8 y 10, cuando se utilizan más de 3 tiras.

**D.3.9.1.4.** Cubrir los pocillos con cinta o Parafilm para evitar la evaporación e incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Si se dispone de un agitador orbital, agitar a 200 rpm.

**D.3.9.1.5.** Retire con cuidado la cinta o Parafilm y luego añadir 100 µl del Conjugado microcistina enzima a cada pocillo. No vacíe el contenido de los pocillos o lavar las tiras en este momento.

**D.3.9.1.6.** Mezclar bien el contenido de los pocillos como en el paso 3. Cubra los pocillos con cinta o parafilm y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Utilizar agitador orbital si está disponible.

**D.3.9.1.7.** Después de la incubación, retire con cuidado la cubierta y agite con fuerza el contenido de los pocillos en un fregadero u otro recipiente adecuado. Bañar los pozos completamente con solución de lavado, y luego agitar para vaciarlo. Repita este paso de lavado cuatro veces. Sacudir golpeando la placa sobre una toalla de papel para eliminar la mayor cantidad posible de Solución de Lavado. También puede utilizar un lavador de placas de microtitulación con solución de lavado para cada etapa de lavado.

**D.3.9.1.8.** Añadir 100 µl de Substrato a cada pocillo.

**D.3.9.1.9.** Mezclar bien el contenido de los pocillos, como en el paso 3. Cubra los pocillos con nueva cinta o parafilm y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente.

Utilice un agitador orbital si está disponible.

Precaución: la solución de stop es de HCl 1,0 N. Manipular con cuidado.

**D.3.9.1.10.** Añadir 100 µl de Solución de Stop a cada pocillo y mezclar bien. Ésta tornará el contenido de los pocillos a color amarillo.

NOTA: Lea la placa dentro de los 30 min de la adición de la Solución de Stop.

Asignación de valores de calibrador.

En este formato de ensayo, se asignan los valores: bajo, medio y alto de los calibradores de microcistina concentraciones de 0,05 ppb, 0,2 ppb y 0,83 ppb, respectivamente.

Para la interpretación y cálculo de resultados vea las secciones sobre cómo Interpretar los resultados y cómo calcular los resultados anteriores. La información contenida en estas secciones es aplicable a este ensayo, con la excepción de que los valores del calibrador son diferentes.

Aspectos destacados:

- Detección Cuantitativa en Laboratorio de la toxina Microcistina en las aguas Superficiales.
- Detecta 0,16 a 2,5 ppb.
- Opción de alta sensibilidad.

Para muestras de agua potable detecta de 0,05 a 0,83 ppb.

**Tabla D.3.3. Precisión.**

	Recuperación (%CV)	OD (%CV)
<b>0.25 ppb-1.0 ppb</b>	Intra-Assay n=7 3.9%-5.8%	1.6%-5.3%
<b>0.25 ppb-1.0 ppb</b>	Intra-Assay n=11 6.0%-3.6%	n/a n/a

**Tabla D.3.4. Reactividad Cruzada.**

Compuesto	50% CME	LOD 81.3% CME
<b>Microcistina LR</b>	<b>0.50</b>	<b>0.15</b>
<b>Microcistina LA</b>	<b>0.81</b>	<b>0.24</b>
<b>Microcistina RR</b>	<b>0.92</b>	<b>0.27</b>
<b>Microcistina YR</b>	<b>1.42</b>	<b>0.44</b>
<b>Nodularia</b>	<b>0.73</b>	<b>0.21</b>

#### **D.4. Determinación de Giardia.**

##### **D.4.1. Fundamento.**

Es conocido que la tinción de muestras fecales son los medios más eficaces para el examen coprológico para identificar protozoos intestinales.

Una tinción adecuada facilita la detección e identificación de los quistes y trofozoitos y ofrece un registro permanente de los protozoos encontrados.

Pequeños protozoos, son a menudo no determinados en los montajes húmedos (de muestras no concentradas o concentradas). Por lo que la técnica tricrómica Wheatley para muestras con residuos fecales ofrece ventajas sobre técnicas de teñido. Es una modificación del procedimiento de tinción original de Gomori, es un procedimiento rápido y simple, que produce uniformemente tinciones de mejor calidad, en la diferenciación entre los protozoos intestinales, células humanas, levadura y material del artefacto.

Las muestras generalmente se fijan en portaobjeto utilizando alcohol polivinílico y secándolas utilizando aire seco o por tratamiento a 60° C. Ácido acético-acetato sódico-formol también pueden ser utilizados.

##### **D.4.2. Medios de cultivo y reactivos.**

1. Solución etanol-yodo al 70%: Preparar adicionando cristales de yodo en alcohol al 70% hasta obtener una solución oscura. Para su utilización, diluir con alcohol al 70% hasta que se obtenga un color marrón, rojizo oscuro o color té fuerte.

2. Etanol al 70%

3. Tinción Tricrómica, disponible comercialmente

4. Etanol-ácido al 90%

    etanol al 90%.                    99,5 ml

    Ácido acético (glacial).        0,5 ml

5. Etanol al 95%

6. Xileno

##### **D.4.3. Procedimiento.**

**D.4.3.1** Para muestras fijadas en alcohol polivinílico, colocar el portaobjetos en solución etanol-yodo al 70%, durante 10 min;

**D.4.3.2** Colocar el portaobjeto en etanol al 70% durante 5 min;

**D.4.3.3** Retirar y colocar una vez más el portaobjeto en etanol al 70% durante 3 min;

**D.4.3.4** Colocar el portaobjeto en Tinción tricrómica durante 10 min;

**D.4.3.5** Lavar en sol. Etano-ácido al 90% de 1 a 3 s;

**D.4.3.6** Enjuague varias veces en etanol al 100%, repetir el enjuague dos veces;

**D.4.3.7** Colocar el portaobjeto en Xileno durante 10 min;

**D.4.3.8** Monte con cubreobjetos usando medio de montaje, y

**D.4.3.9** Examinar el frotis microscópico utilizando el objetivo de 100 X, 200X.

##### **D.4.4. Expresión de los resultados.**

###### **D.4.4.1. Cálculos.**

**D.4.4.1.1.** Para determinar

Presencia de Giardia

Ausencia de Giardia

No hay cálculos que realizar.

#### **D.5. Método para la determinación de Cloro Residual Libre**

##### **D.5.1. Introducción.**

La desinfección del agua es un factor esencial para el control de las enfermedades diarreicas y gastrointestinales, de ello depende que un sistema de abastecimiento de agua mantenga un servicio confiable que, suministre el líquido de calidad sanitaria adecuado para el uso y consumo humano. La mejor manera de poder garantizar dicha calidad, es mediante el monitoreo regular de cloro residual libre a través de diferentes

metodologías e instrumentos de medición, del cloro residual libre en la red municipal de abastecimiento de agua, lo cual nos permitirá medir la eficiencia del método de desinfección y corregir de manera inmediata las posibles desviaciones que se detecten. Siempre que los niveles de cloro residual libre se mantengan dentro de lo señalado por la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, podremos disminuir el riesgo de enfermedades de origen hídrico.

#### D.5.2. Interferencias.

La presencia de residuos flotantes y materia fina, las cuales pueden sedimentarse rápidamente dará lecturas bajas. El color verdadero, es decir el color del agua debido a sustancias disueltas que absorben luz, causará valores bajos de turbiedad.

Existen algunas fuentes de error como son: la presencia de burbujas en las paredes de la celda, al momento de realizar la lectura, empañamiento de las celdas, suciedad del vidrio y los efectos de vibración alteran la visibilidad superficial de la muestra originando errores en las lecturas.

#### D.5.3. Equipo.

D.5.3.1. Kit para determinar cloro residual libre y pH.

D.5.3.2. Componentes del kit para la determinación de cloro residual, para la determinación de cloro residual libre y pH.

D.5.3.3. El estuche para determinar cloro residual libre consta de:

D.5.3.3.1. Comparador colorimétrico con dos celdas unidas con escala de medición. Para la medición de cloro residual libre, cuenta con una escala colorimétrica que va de una tonalidad rosa tenue a intenso, con parámetros entre 0.0 y 3.0 ppm y con valores intermedios de 0.2 y 1.5 ppm. Para pH, las tonalidades son de amarillo a rojo con parámetros entre 6.8 a 8.2.

D.5.3.3.2. Ambas celdas tienen marcadas en la parte superior el aforo.

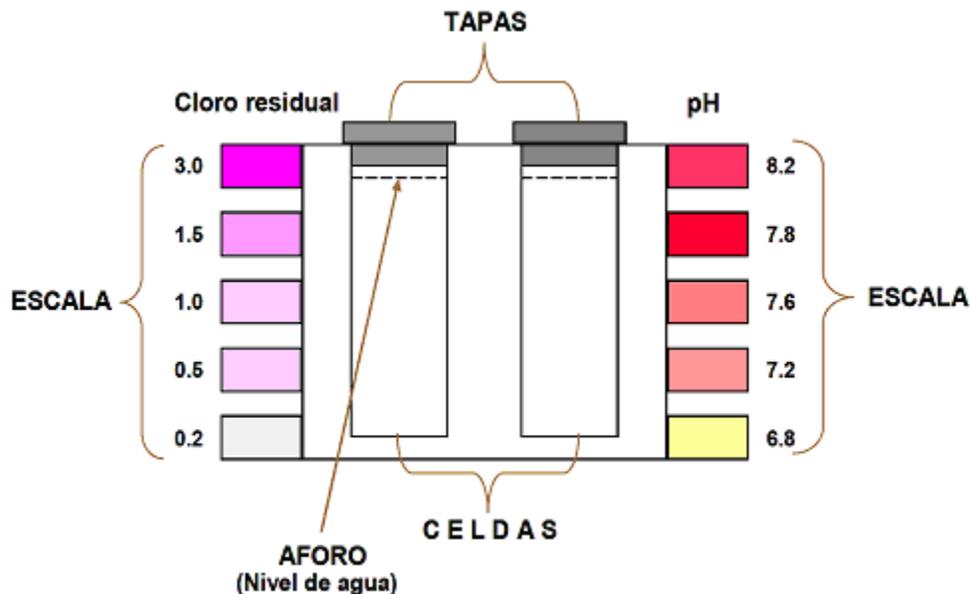
D.5.3.3.3. Dos tapas, una para cada celda.

D.5.3.3.4. Reactivo N,N-dietil-p-difenildiamina, en tabletas o a través de dosificador, conteniendo la cantidad exacta para ser utilizado en el equipo y apropiado para la medición de cloro residual libre.

D.5.3.3.5. Frasco gotero con solución o blíster con pastillas de rojo fenol.

D.5.3.3.6. Tarjeta blanca que se utiliza de fondo para la lectura de la prueba.

Figura B.1.3.3.1.- Escala de cloro Residual



#### D.5.4. Procedimiento.

D.5.4.1. Previo al monitoreo de cloro residual libre y pH, revisar que el kit para el monitoreo de cloro residual y pH, se encuentre completo y en buenas condiciones es decir, limpio, sin residuos de la lectura anterior, sin ralladuras o fugas.

**D.5.4.2.** Liberar la llave o grifo de aditamentos conectados, tales como mangueras, a fin de que la determinación de cloro residual y pH sea directa y no interfieran en el resultado.

**D.5.4.3.** Abrir la llave o grifo, dejar correr el agua por un espacio de 30 a 60 s, para garantizar que el agua contenida en la tubería ha sido vaciada, ésta podrá ser colectada en un recipiente, para evitar su desperdicio.

**D.5.4.4.** El agua deberá provenir directamente del sistema de abastecimiento, no se deberá monitorear si el grifo presenta fugas entre el tambor y el cuello, ya que el agua podrá correr por la parte exterior del grifo y contaminar la muestra.

**D.5.4.5.** Registrar la ubicación del punto, fecha y hora de muestreo.

**D.5.4.6.** Enjuagar las celdas con el agua a monitorear por tres veces con agitación.

**D.5.4.7.** Llenar con agua a monitorear las dos celdas hasta el aforo sin sobrepasar.

**D.5.4.8.** Agregar 1 pastilla de N,N-dietil-p-difenildiamina (DPD) a la celda de prueba para cloro residual libre, abriendo la envoltura con las manos, evitando el contacto de la pastilla con los dedos, en caso de utilizar dosificador, cerciorarse que la totalidad de la dosis sea colectada en la celda.

**D.5.4.9.** Agregar 5 gotas de solución rojo fenol o en su defecto la pastilla, a la celda de prueba de pH.

**D.5.4.10.** Colocar las tapas a las celdas e invertirlos varias veces para mezclar la solución y la disolución de la pastilla y agitar.

**D.5.4.11.** Comparar cada celda de prueba con su respectiva escala colorimétrica, colocando un fondo blanco para poder observar el color que presenta el agua.

**D.5.4.12.** Registrar el resultado del monitoreo de cloro residual libre y pH.

**D.5.4.13.** Si la coloración no alcanza la escala de 0.2 ppm se deberá de reportar como menor de 0.2 (<0.2), si por el contrario la coloración rebasa la escala de 1.5 ppm se deberá registrar como mayor de 1.5 (>1.5).

**D.5.4.14.** El contenido de las celdas podrá arrojarse al drenaje, enjuagar hasta que no contenga residuos y secar el equipo después de cada determinación.

## **D.6. Método para la determinación de Yodo residual libre.**

### **D.6.1. Método de análisis.**

Determinación de yodo residual *in situ*, empleando el método colorimétrico, mediante Kit para medición de yodo residual.

### **D.6.2. Kit para medición de yodo residual.**

**D.6.2.1.** Celda de comparación en acrílico.

**D.6.2.2.** Celda contenedora para muestra.

**D.6.2.3.** Reactivo R-0769 BUFFER B&W (60 ml).

**D.6.2.4.** Reactivo R-0768 IODINE indicador B&W (60 ml).

**D.6.2.5.** Escobillón para limpieza de celda.

### **D.6.3. Procedimiento de visita para la determinación de Yodo residual libre.**

**D.6.3.1. Selección de sitios de muestreo.** Para cada sistema formal de abastecimiento, se identificarán los sitios donde esté instalado Yodador, donde se practicará periódicamente el muestreo y determinación de Yodo residual.

**D.6.3.2. Revisión del equipo de muestreo.** Previo a la visita deberá revisarse que el equipo para la determinación de Yodo residual se encuentre en buen estado, y que cuente con tapa y con los reactivos R-0768 Iodine Indicador B&W (Indicador) y R-0769 Iodine Buffer B&W (Regulador de pH Buffer).

**D.6.3.3. Monitoreo de Yodo residual libre.** Se realizará el recorrido en las comunidades donde existe Yodador, para realizar la medición de Yodo residual correspondientes.

**D.6.3.4. Eliminación de interferencias.** Cuando existen aditamentos conectados al grifo, tales como mangueras, es necesario retirarlos.

**D.6.3.5. Eliminación de agua estancada en toma.** El agua que se encuentra en la tubería que va de la línea de distribución en la red al grifo, normalmente está estática, por lo que puede no ser representativa. Es necesario dejar correr el agua a flujo máximo hasta asegurarse que el líquido contenido en la tubería se haya descargado.

**D.6.3.6.** Enjuague de la celda. La celda puede contener residuos de la determinación anterior que pueden interferir en el resultado, por lo que es necesario enjuagar la celda antes de tomar la muestra, cuando menos dos veces con el agua que se va a muestrear.

**D.6.3.7.** *Volumen de muestra.* Llenar la celda de medición hasta la marca 11.5 mL y adicionar 5 gotas del reactivo R-0769 Iodine Buffer B&W (Regulador de pH Buffer), tapar la celda y agitar por 10 s, posteriormente adicionar 5 gotas del reactivo R-0768 Iodine Indicador B&W (Indicador), tapar nuevamente la celda y agitar. La cantidad de reactivos es específica para el volumen de agua de la celda. Al tomar una cantidad de muestra diferente a la que señala la celda o si se utiliza menor cantidad de reactivo, el resultado de la concentración de Yodo residual de la muestra no será representativo. Es necesario asegurarse de llenar la celda hasta la marca y adicionar la cantidad de reactivo adecuado.

**D.6.3.8.** *Limpieza del comparador.* También pueden existir alteraciones en la lectura del resultado si existe suciedad o agua en el comparador, por lo que deberá limpiarse antes de la lectura con un papel suave.

**D.6.3.9.** *Lectura.* Para obtener un mejor contraste, se deberá proceder a la lectura utilizando un fondo blanco, es importante asegurar que al introducir la celda de medición en el kit, el lado opaco de esta quede hacia atrás.

Proceder a comparar el color en la celda de medición con los colores patrones.

**D.6.3.10.** *Registro de la lectura.* Se deberá realizar la anotación del resultado de la muestra en el formato de monitoreo. Registrar como ppm.

Al finalizar la medición deberá enjuagarse muy bien la celda con agua, para prolongar la vida útil de la celda y evitar interferencias de color.

**D.6.3.11.** Registro de resultados. En el formato correspondiente se deberá anotar la identificación del punto de muestreo y su resultado.

## **D.7. Método para la determinación de turbiedad.**

### **D.7.1. Fundamento.**

El método se basa en la comparación entre la intensidad de la luz dispersada por la muestra bajo condiciones definidas y la intensidad de luz dispersada por una suspensión de referencia en condiciones semejantes. Las lecturas se realizan empleando un turbidímetro de campo, obteniendo una curva patrón con una suspensión de referencia de formacina preparada bajo condiciones específicas. El polímero de formacina es la referencia de turbiedad más aceptada, debido a que es fácil prepararlo y tiene propiedades reproducibles de dispersión de la luz, en comparación con otros como arcilla o agua turbia natural.

La turbiedad del agua es producida por materias en suspensión, como arcilla, cieno o materias orgánicas e inorgánicas finamente divididas, compuestos orgánicos solubles coloreados, plancton y otros microorganismos.

La turbiedad es una expresión de la propiedad óptica que origina que la luz se disperse y absorba en vez de transmitirse en línea recta a través de la muestra.

### **D.7.2. Interferencias.**

**D.7.2.1.** La presencia de residuos flotantes y materia fina, las cuales pueden sedimentarse rápidamente darán lecturas bajas. El color verdadero, es decir el color del agua debido a sustancias disueltas que absorben luz, causará valores bajos de turbiedad.

**D.7.2.2.** Existen algunas fuentes de error como son la presencia de burbujas en las paredes de la celda al momento de realizar la lectura, empañamiento de las celdas, suciedad del vidrio y los efectos de vibración alteran la visibilidad superficial de la muestra originando errores en las lecturas.

### **D.7.3. Aparatos e Instrumentos.**

**D.7.3.1.** Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg, calibrada y verificada.

**D.7.3.2.** Turbidímetro: La sensibilidad del instrumento debe permitir la detección de diferencias de turbiedad de al menos 0.05 unidades y cubrir un intervalo de 0 a 40 unidades. Equipado con lámpara de tungsteno o led infrarrojo.

### **D.7.4. Reactivos y materiales.**

**D.7.4.1.** Sulfato de hidracina ( $N_2H_6SO_4$ ), con una pureza mayor de 99.95% o avalado por la DGN. Compuesto sumamente tóxico con características cancerígenas por lo que debe manipularse con extremo cuidado, evitando su inhalación, ingestión y contacto con ojos, piel y mucosas.

**D.7.4.2.** Hexametilentetramina ( $C_6H_{12}N_4$ ), con una pureza mayor de 99.95% o avalado por la DGN.

**D.7.4.3.** Agua libre de turbiedad. Se obtiene filtrando agua destilada a través de un filtro de tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ . O algunas otras aguas desmineralizadas comerciales que tengan una baja turbiedad. Verificar que tengan una turbiedad equivalente a la del agua destilada filtrada.

**D.7.5. Materiales.**

Todo el material volumétrico utilizado en este procedimiento debe ser clase A, verificado y/o calibrado.

**D.7.5.1.** Matraces volumétricos de 100 mL;

**D.7.5.2.** Pipetas volumétricas de diferentes volúmenes;

**D.7.5.3.** Celdas de vidrio de cristal incoloro y transparente, deben mantenerse limpios por dentro y por fuera y evitar que se rayen o estrellen, y

**D.7.5.4.** Sistema de filtración con membrana de celulosa de 0.2  $\mu\text{m}$ .

**D.7.6. Procedimiento.**

**D.7.6.1. Preparación de la suspensión patrón concentrada de formacina de 400 UNT.**

**D.7.6.1.1.** Solución I. Pesar 1.000 g con precisión de 0.0001 g de sulfato de hidracina ( $\text{N}_2\text{H}_6\text{SO}_4$ ), disolver en agua y aforar a 100 mL. Esta disolución es estable un mes.

**D.7.6.1.2.** Solución II. Pesar 10.00 g con precisión de 0.0001 g de hexametilentetramina ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$ ), disolver en agua y aforar a 100 mL. Esta disolución es estable un mes.

**D.7.6.1.3.** Mezclar en un matraz volumétrico de 100 mL, 5 mL de la solución I y 5 mL de la solución II, dejar en reposo 24 h a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  y llevar al volumen con agua. Preparar la solución en cada uso.

**D.7.6.2. Preparación de la suspensión patrón concentrada de formacina de 40 UNT.**

Diluir 10.0 mL de la suspensión patrón concentrada en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con agua.

**D.7.6.3. Preparación de patrones de turbiedad diluidas.**

Diluir porciones de la suspensión patrón de turbiedad con agua. Preparar por lo menos cinco puntos de la curva de calibración incluyendo como punto medio de la curva 5 UNT.

**NOTA:** Pueden utilizarse patrones comerciales con certificado o trazables a patrones nacionales o internacionales.

**D.7.7. Calibración del Turbidímetro.**

**D.7.7.1.** Seguir las instrucciones del fabricante. Si la escala no está precalibrada, preparar la curva de calibración para el rango establecido.

**D.7.8. Procedimiento en el sitio de muestreo.**

**D.7.8.1.** Acondicionar el equipo de acuerdo con las instrucciones del fabricante;

**D.7.8.2.** Colectar un volumen apropiado para la celda del turbidímetro;

**D.7.8.3.** Asegurar ausencia de burbujas en la celda del aparato;

**D.7.8.4.** Limpiar la celda con papel óptico o equivalente, evitando dejar residuos adheridos, y

**D.7.8.5.** Leer la turbiedad directamente de la escala del instrumento.

**D.7.9. Expresión de resultados.**

**D.7.9.1.** Reportar los resultados de la siguiente forma con la precisión correspondiente.

Margen de turbiedad (UTN)	Informe de cifra UTN más próxima
0—1.0	0.05
1—10	0.1

**D.7.9.2.** Reportar el resultado como: UTN.

**D.7.9.3.** Si la turbiedad excede 10 UTN, reportar como: >10 UTN.

**D.8. Métodos de prueba para la determinación de antimonio, arsénico, bario, cadmio, cobre, cromo, manganeso, mercurio, níquel, plomo y selenio por espectrometría de absorción atómica.**

**D.8.1. Fundamento.**

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico.

La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el % de absorción.

La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

### D.8.2. Interferencias.

**Tabla D.8.2.1.- Principales tipos de interferencias y correcciones en la determinación de metales y metaloides.**

Tipo de interferencia	Corrección
La ionización química de algunos elementos como el sodio, el potasio, el magnesio y el calcio causa error en la lectura originando mayor o menor absorbancia.	La adición de un elemento que sea más ionizable que el analito que se va a determinar por ejemplo el uso del óxido o sal de lantano, el cloruro de potasio u otro equivalente.
Cuando en la flama hay presencia de átomos unidos en combinación molecular, se presenta una disminución en la absorbancia. Esto puede ocurrir cuando la flama no alcanza temperaturas altas, las cuales son necesarias para disociar las moléculas o cuando el átomo disociado es inmediatamente oxidado a un compuesto que no se disocia más a esa temperatura de la flama.	Estas interferencias pueden ser reducidas o eliminadas utilizando una flama más oxidante: óxido nitroso-acetileno, en lugar de aire-acetileno.
La absorción de fondo se produce debido a que no todos los materiales de la matriz necesariamente se atomizan en un 100%. Las formas moleculares no disociadas de los materiales de la matriz pueden tener espectros de absorción muy ensanchados; las partículas sólidas en la flama pueden dispersar luz en una amplia región de longitudes de onda.	Con una fuente continua se puede realizar automáticamente la corrección de fondo empleando una lámpara de arco de deuterio en la zona de ultravioleta o una lámpara de yoduro de tungsteno para las longitudes de onda visibles. La corrección de Zeeman se basa en el principio de un campo magnético en el que se divide la línea espectral en dos haces de luz linealmente polarizada, paralela y perpendicular al campo magnético. Se puede comparar la absorción en presencia y ausencia de un campo magnético, siendo la diferencia la absorción atómica de interés.
En horno de grafito altas concentraciones de cloruros pueden causar bajos resultados debido a que la volatilidad de muchos elementos se incrementa y el analito se pierde durante el proceso de pirolisis.	Los efectos de matriz pueden disminuirse parcialmente o completamente con la optimización del programa de temperatura. El uso de tubos recubiertos pirolíticamente y plataformas. El uso de modificadores químicos como el nitrato de magnesio o el fosfato de amonio. La técnica de adición de estándar. Con el uso del corrector de fondo.

### D.8.3. Medidas de control de calidad.

**D.8.3.1.** El coeficiente de correlación de la curva ( $r$ ) deberá ser  $\geq 0.995$ .

**D.8.3.2.** Leer en el equipo el blanco de curva y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del  $\pm 10\%$  del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a calibrar y repetir las lecturas del último lote de muestras.

### D.8.4. Aparatos e instrumentos.

Los límites de detección, sensibilidad y rangos de trabajo de los metales pueden variar con la matriz y los modelos del espectrómetro de absorción atómica.

Espectrómetro de absorción atómica calibrado y verificado, equipado con:

**D.8.4.1.** Flama;

**D.8.4.2.** Horno de grafito;

**D.8.4.3.** Generador de hidruros o vapor frío, y/o Sistemas Analizadores Automáticos de Inyección de Flujo;

**D.8.4.4.** Sistema de corrección de fondo;

**D.8.4.5.** Lámparas de cátodo hueco y/o Lámparas multi-elemento y/o Lámpara de descarga sin electrodos de cada uno de los elementos a analizar;

**D.8.4.6.** Sistema de ventilación para eliminar el humo y los vapores que son peligrosos para la salud del analista;

**D.8.4.7.** Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga sin electrodos;

**D.8.4.8.** Celda de cuarzo para mercurio y celda de cuarzo para otros elementos como arsénico y antimonio;

**D.8.4.9.** Soporte de la celda;

**D.8.4.10.** Tubo de aireación;

**D.8.4.11.** Frasco de reacción, botella de 250 mL con un tapón de caucho para mantener el tubo de aireación;

**D.8.4.12.** Tubo de secado y tubo de conexión;

**D.8.4.13.** Automuestreador (opcional);

**D.8.4.14.** Recirculador de agua para enfriamiento;

**D.8.4.15.** Balanza analítica con sensibilidad de  $\pm 0.1$  mg calibrada y/o verificada;

**D.8.4.16.** Horno de microondas o sistema de reflujo o sistema de digestión abierto.

**D.8.4.17.** Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm, y

**D.8.4.18.** Micropipetas automáticas de diferentes capacidades; calibradas y/o verificadas.

#### **D.8.5. Material.**

Todo el material volumétrico utilizado en este procedimiento debe ser clase A, calibrado y/o verificado. El material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones:

**D.8.5.1.** El jabón que se use debe ser neutro;

**D.8.5.2.** Enjuagar perfectamente con agua corriente;

**D.8.5.3.** Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia de plástico) que contenga una disolución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 10%;

**D.8.5.4.** Dejarlo tapado y reposando por un lapso mínimo de 2 h;

**D.8.5.5.** Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) con agua desionizada;

**D.8.5.6.** Dejar escurrir y secar;

**D.8.5.7.** Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire, y

**D.8.5.8.** Para la determinación de niveles traza de algunos elementos como cadmio es necesario utilizar material exclusivo y seguir un estricto procedimiento de limpieza como se describe a continuación:

**D.8.5.8.1.** Sumergir en una disolución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 50% volumen/volumen mínimo 2 h, los frascos reservorios del auto-muestreador del horno de grafito, los viales y todo el material involucrado, enjuagar con agua tipo I varias veces;

**D.8.5.8.2.** Secar en un ambiente libre de polvo, y

**D.8.5.8.3.** Tapar con papel parafinado o en bolsas cerradas de plástico.

**NOTA:** Se observa que el HCl, es más efectivo para el lavado de material de polietileno o polipropileno, mientras que el ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  es preferible usarlo con el material de PTFE o de vidrio.

**D.8.5.9.** Viales;

**D.8.5.10.** Tubos de grafito, cubiertos pirolíticamente con plataforma L'vov, preferentemente para elementos de alta y medianamente volátiles;

**D.8.5.11.** Matraces volumétricos de diferentes capacidades:

**D.8.5.12.** Puntas de plástico para micropipetas;

**D.8.5.13.** Filtros con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ;

**D.8.5.14.** Recipientes de polipropileno o PTFE;

**D.8.5.15.** Embudos de filtración de diferentes capacidades;

**D.8.5.16.** Papel filtro de filtración media, y

**D.8.5.17.** Material común de laboratorio (probetas, vasos de precipitados, matraces y pipetas).

#### **D.8.6. Reactivos y disoluciones.**

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación.

**D.8.6.1.** Aire comprimido libre de agua y libre de partículas, cuyo contenido de oxígeno sea  $\leq 20\%$ .

**D.8.6.2.** Acetileno grado absorción atómica en acetona.

**D.8.6.3.** Óxido nítrico de alta pureza grado absorción atómica, el regulador debe ser no congelable o debe colocarse un serpentín de calentamiento alrededor del regulador de flujo.

**D.8.6.4.** Argón o nitrógeno de alta pureza grado absorción atómica.

**D.8.6.5.** Agua Tipo I.

**D.8.6.6.** Disoluciones de estándares de referencia trazables a patrones nacionales o internacionales de cada uno de los metales.

**NOTA:** Las disoluciones pueden prepararse a partir de las sales, y deben tener una pureza  $\geq 99.95\%$ . Todas las sales deben ser secadas por 1 h a  $105^\circ\text{C}$ , a menos que se especifique otra cosa.

**D.8.6.7.** Disolución de Nitrato de Magnesio hexahidratado [ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ] de alta pureza (con contenido de metales a niveles traza).

**D.8.6.8.** HCl de alta pureza (con contenido de metales a niveles traza).

**D.8.6.9.** HCl 6 N. Medir 56 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.

**D.8.6.10.** HCl 4 N. Medir 33 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.

**D.8.6.11.** Disolución de HCl al 50%. En un matraz de 1 L, conteniendo de 300 a 400 mL de agua, agregar 500 mL de HCl concentrado. Llevar al volumen con agua.

**D.8.6.12.** Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (densidad específica 1.84).

**D.8.6.13.** Ácido nítrico de alta pureza ( $\text{HNO}_3$ ) al 65% v/v (con contenido de metales en niveles traza).

**D.8.6.14.** Ácido nítrico al 50% v/v. Medir 50 mL de ( $\text{HNO}_3$ ) en 50 mL de agua.

**D.8.6.15.** Disolución de ácido nítrico/ácido sulfúrico. En un matraz de 1 L, conteniendo de 300 a 500 mL de agua, agregar 58 mL de ácido nítrico concentrado de muy baja concentración de mercurio y 67 mL de ácido sulfúrico concentrado. Llevar al volumen con agua.

**D.8.6.16.** Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (Para la descontaminación del material).

**D.8.6.17.** Yoduro de Potasio (KI) de alta pureza (con contenido de metales en niveles traza).

**D.8.6.18.** Disolución de yoduro de potasio (KI) al 10% p/v. Disolver 10 g de KI en agua y 10 g de ácido ascórbico, llevar a 100 mL con agua (esta disolución debe prepararse en el momento de usarse).

**D.8.6.19.** Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).

**D.8.6.20.** Dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

**D.8.6.21.** Disolución de dicromato de potasio: Pesar 0.5 g de dicromato de potasio, pasar a un matraz volumétrico de 1 L que contenga agua, agregar 5 mL de ácido nítrico concentrado y 0.5 mL de HCl. Llevar a volumen con agua.

**NOTA:** Las disoluciones y concentraciones pueden variar según lo recomendado por el fabricante del equipo de absorción.

**D.8.6.22.** Hidróxido de sodio (NaOH).

**D.8.6.23.** Disolución de hidróxido de sodio al 1% peso/volumen. Pesar 1 g de hidróxido de sodio y llevar al volumen a 100 mL con agua.

**D.8.6.24.** Borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ).

**D.8.6.25.** Disolución reductora de borohidruro de sodio al 4% peso/volumen en disolución de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) al 1% peso/volumen. Pesar 4 g de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) en 100 mL de una disolución de hidróxido de sodio al 1% peso/volumen. Filtrar al vacío.

**NOTA:** La concentración de esta disolución puede variar según lo recomendado por el fabricante del equipo de absorción.

**D.8.6.26.** Disolución de paladio con niveles traza de metales (de alta pureza).

**D.8.6.27.** Fosfato de amonio monobásico ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) con niveles traza de metales (de alta pureza).

**D.8.6.28.** Sulfato ácido de hidroxilamina [ $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ ] o Clorhidrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ).

**D.8.6.29.** Cloruro estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ) o sulfato estanoso ( $\text{SnSO}_4$ ).

**D.8.6.30.** Disolución reductora de estaño. Mezclar 50 mL de ácido sulfúrico concentrado con aproximadamente 300 mL de agua. Enfriar a temperatura ambiente y 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato o cloruro de hidroxilamina y 25 g de cloruro o sulfato estanoso en disolución; disolver completamente y llevar a 500 mL con agua.

**NOTA:** Las disoluciones y concentraciones pueden variar según lo recomendado por el fabricante del equipo de absorción.

**D.8.7. Procedimiento.****D.8.7.1. Preparación de las muestras.**

**D.8.7.1.1.** Las muestras se pueden analizar directamente por espectrometría de absorción atómica sin realizar la digestión si son inodoras, incoloras y transparentes.

**D.8.7.1.2.** Previo al análisis, adicionar a 100 mL de muestra, 1 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) de alta pureza. En caso que se observe un precipitado realizar una digestión adicionando 1 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) de alta pureza concentrado, calentar a  $85^\circ\text{C}$  hasta reducir el volumen a 20 mL cuidando que no hierva.

**D.8.7.1.3.** Calentar a reflujo por 20 min y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL.

**D.8.7.1.4.** Centrifugar a 1600 rpm por 30 min o dejar reposar toda la noche y analizar el sobrenadante.

**D.8.7.1.5.** Se puede utilizar el horno de microondas para digerir las muestras si se forma un precipitado al adicionar el ácido nítrico. Proceder de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante.

**D.8.7.1.6.** Preparar un blanco fortificado por cada lote, y una muestra fortificada por cada 10 muestras o por grupo si son menos.

**D.9. Método para la determinación de Cobre, Manganeso y Bario por la técnica de flama.****D.9.1. Preparación de disoluciones de Cobre.**

**D.9.1.1.** Disolución estándar de cobre de 100 mg/L. Tomar 10 mL de la disolución estándar de 1000 mg/L y depositar en un matraz volumétrico de 100 mL, que contiene agua desionizada posteriormente agregar 5 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) de alta pureza y llevar al volumen con agua desionizada.

**D.9.1.2.** A partir de la disolución anterior preparar un blanco y 5 puntos de calibración (véase Tabla D.9.1.).

**D.9.2. Preparación de la curva de calibración de Cobre.****Tabla D.9.1.- Curva de calibración de Cobre.**

Concentración (mg/L)	Volumen de disolución estándar de 100 mg/L	Volumen de $\text{HNO}_3$ adicionado (mL)	Volumen de aforo con agua (mL)
Blanco de curva	0	2	100
0.25	250 $\mu\text{l}$	2	100
0.50	500 $\mu\text{l}$	2	100
1.0	1 mL	2	100
2.0	2 mL	2	100
4.0	4 mL	2	100

**D.9.3. Preparación de disoluciones de Manganeso.**

**D.9.3.1** Disolución estándar de manganeso de 100 mg/L. Medir 10 mL de la disolución estándar de 1000 mg/L y depositar en un matraz volumétrico de 100 mL que contiene agua desionizada, posteriormente agregar 5 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) de alta pureza y aforar con agua desionizada.

**D.9.3.2.** A partir de la disolución anterior preparar un blanco y 5 puntos de calibración (véase Tabla D.9.2.).

**D.9.4. Preparación de la curva de calibración de Manganeso.****Tabla D.9.2.- Curva de calibración de Manganeso.**

Concentración (mg/L)	Volumen de disolución estándar de 100 mg/L	Volumen de HNO <sub>3</sub> adicionado (mL)	Volumen de aforo con agua (mL)
Blanco de curva	0	2	100
0.10	100 µl	2	100
0.20	200 µl	2	100
0.40	400 µl	2	100
1.0	1 mL	2	100
2.0	2 mL	2	100

**D.9.5. Preparación de disoluciones de Bario.**

**D.9.5.1.** Disolución estándar de Bario de 100 mg/L.

**D.9.5.1.1.** Disolver 0.1516 g de cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>) (secar a 250°C por 2 h), adicionar 10 mL de (5 mL agua +5 mL de HCl), adicionar 10 mL de (5 mL agua +5 mL de HCl) y llevar al volumen de 1000 mL con agua. 1 mL es aproximadamente 100 µg de bario. A partir de esta disolución preparar una curva de calibración (Véase Tabla D.9.3.) (agregar solución de Cloruro de Potasio, lantano o cesio (10 mg/mL de potasio K) a los estándares y a las muestras).

**Tabla D.9.3.- Curva de calibración de Bario.**

Concentración en (mg/L)	Volumen de disolución de 100 µg de Ba	Volumen de aforo con agua (mL)
Blanco de curva	0	100
0.25	250 µl	100
0.5	500 µl	100
0.7	700 µl	100
2.0	2 mL	100
4.0	4 mL	100

**D.9.6. Condiciones de operación para Cobre, Bario y Manganeso.**

**D.9.6.1. Cobre:** Mezcla de Aire-Acetileno con quemador de 10 cm con nebulizador, longitud de onda 324.7 nm.

**D.9.6.2. Manganeso:** Mezcla de Aire-Acetileno con quemador de 10 cm con nebulizador, longitud de onda 279.5 nm.

**D.9.6.3. Bario:** Mezcla de Óxido nítrico—Acetileno con quemador de 5 cm con nebulizador, longitud de onda 553.6 nm.

**D.9.7.** Ajustar el espectrofotómetro de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, encender la lámpara y dejar calentar al menos 15 min las lámparas de cátodo hueco y al menos 45 min las lámparas de descarga sin electrodos. Usar una disolución estándar de concentración conocida de cobre para verificar el equipo, una vez que se ha ajustado con la disolución estándar de cobre. Leer por quintuplicado esta disolución.

**D.9.8.** Leer por triplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva de Cobre o de Manganeso según sea el caso del metal que se va a determinar. Elaborar una curva de calibración dentro del intervalo lineal, graficando la absorbancia en función de la concentración. Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**D.9.9.** Leer cada una de las muestras por triplicado, registrar la absorbancia y calcular la concentración del elemento a partir de la curva de calibración. Cuando se use el equipo programable realizar los cálculos finales.

**D.9.10.** Asegurarse que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo lineal de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

**D.10. Método para la determinación de Arsénico, Cadmio, Cromo, Níquel y Plomo por horno de grafito.**

**D.10.1. Reducción de As (V) a As (III).**

Tomar una alícuota de la muestra y agregar 10 mL de la disolución de KI al 10% y 10 mL de HCl concentrado, llevar al volumen de 100 mL con agua y esperar 2 h antes de poder leer en el equipo.

**NOTA:** La reducción del As (V) a As (III), puede adecuarse a las condiciones que recomienda el manual del fabricante.

**D.10.2. Preparación de disoluciones y curvas de calibración.**

**D.10.2.1.** Medir un volumen apropiado de disolución estándar (aproximadamente 1-10 mL) para el aforo inicial y hacer las diluciones necesarias para cada elemento en particular, utilizando material volumétrico verificado para su preparación. Para la preparación de las disoluciones más concentradas, utilizar ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) de alta pureza de tal forma que la concentración final del ácido sea del 2 al 5%, para poder preservar las disoluciones estándar por mayor tiempo, mantener estas disoluciones bien tapadas y en recipientes de PTFE de preferencia.

**D.10.2.2.** Para la preparación de las disoluciones de trabajo y de la curva de calibración utilizar ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) de alta pureza y la concentración final del ácido debe estar entre 0.1 a 0.2%. Preparar éstas el mismo día del análisis. Preparar 5 niveles de concentración dentro del intervalo lineal para cada elemento.

**D.10.2.3.** Los intervalos de trabajo óptimos para cada uno de los elementos (véase tabla D.10.1.) para un volumen de muestra de 20 µL. Dicho intervalo depende de la sensibilidad del instrumento, del tipo de matriz y del uso de modificadores.

**Tabla D.10.1.- Intervalos de trabajo para cada uno de los elementos.**

Elemento	Masa característica (pg)	Límite de detección (µg/L)	Intervalo de trabajo (µg/L)
As	15	1	5 a 100
Cd	0.7	0.1	0.4 a 4
Cr	3	0.5	5 a 100
Ni	13	1	7 a 70
Pb	15	1	5 a 100

**D.10.2.4.** Preparar una disolución de una concentración conocida de cada uno de los analitos que se van a analizar (As, Cd, Cr, Ni y Pb) para verificar el equipo, para cada uno de los elementos que se van a analizar.

**D.10.2.5. Condiciones de operación del horno de grafito.**

**D.10.2.5.1.** Ajustar el espectrofotómetro de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, encender la lámpara y dejar calentar al menos 15 min las lámparas de cátodo hueco y al menos 45 min las lámparas de descarga sin electrodos.

**D.10.2.5.2.** Siempre utilizar la corrección de fondo.

**D.10.2.5.3.** El programa de temperatura del horno de grafito (secado, pirolisis, atomización y limpieza) depende del analito, de la matriz y de la marca del equipo utilizado. Optimizar utilizando como guía las recomendaciones del fabricante. En la tabla (véase Tabla D.10.2.). Se muestran los principales parámetros utilizados para ajustar el equipo.

En el caso de la determinación del Cromo se sugiere usar tubos con plataforma L'vov.

**Tabla D.10.2.- Parámetros de ajuste en el horno de grafito.**

Elemento	Longitud de onda (nm)	Ancho de rejilla en nm	Temperatura de pirolisis (°C)		Temperatura de atomización (°C)	
			Sin modificador	Con modificador	Sin modificador	Con modificador
As	193.7	0.7	300	1400/1300	1900	2200/2500
Cd	228.8	0.7	300	900	1250	1100/1800
Cr	357.9	0.7	1050	1650	2300	2600
Ni	232.0	0.2	1100	1400	2400	2400
Pb	283.3	0.7	600	1200/600	1500	2000/1900

**D.10.2.5.4.** Utilizar modificadores de matriz para eliminar los efectos de matriz, ya que su uso permite elevar la temperatura de pirolisis y poder eliminar las interferencias sin que se pierda el analito que se va a medir. Si se utilizan modificadores de matriz en las muestras, adicionar también al blanco de la curva, a la curva de calibración, a las disoluciones estándar de verificación, a las muestras fortificadas y a las disoluciones estándar de control de calidad (MCC o MCI). (Véase tabla D.10.3.), se muestran los modificadores más utilizados en el análisis por horno de grafito, dicha cantidad está calculada para volumen de muestra de 10µL.

**Tabla D.10.3.- Principales modificadores de matriz utilizados en el análisis por horno de grafito.**

Elemento	Modificador Químico	Cantidad (µg)
As	Pd + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	15 + 10
Cd	Pd + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> o NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	15 + 10 200 + 10
Cr	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	50
Ni	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	50
Pb	Pd + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> o NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	15 + 10 200 + 10

Los modificadores y las cantidades pueden variar, se pueden utilizar los recomendados por el fabricante.

**D.10.2.5.5.** Si el equipo cuenta con automuestreador, colocar los puntos de la curva, el blanco de reactivos, las muestras y los modificadores de matriz en los viales, los cuales han sido previamente enjuagados con ácido nítrico al 3% y posteriormente con la disolución a analizar.

**D.10.2.6. Lectura en el equipo.**

**D10.2.6.1.** Leer por triplicado el blanco de curva para verificar que no haya contaminación y posteriormente leer la disolución de verificación también por triplicado.

**D.10.2.6.2.** Leer por duplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva. Elaborar una curva de calibración dentro del intervalo lineal, graficando la absorbancia (área o altura de pico) en función de la concentración. La absorbancia integrada como área de pico es más recomendable.

**D.10.2.6.3.** Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**D.10.2.6.4.** Leer cada una de las muestras por duplicado, registrar la absorbancia y calcular la concentración del elemento a partir de la curva de calibración. Cuando se use el equipo programable realizar los cálculos finales.

**D.10.2.6.5.** Asegurarse que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo lineal de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

**D.10.2.7. Medidas de control de calidad.**

**D.10.2.7.1.** El coeficiente de correlación ( $r$ ) de la curva deberá ser  $\geq 0.995$

**D.10.2.7.2.** Leer en el equipo el blanco de curva y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del  $\pm 15\%$  del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a calibrar y repetir las lecturas del último lote de muestras.

**D.11 Método para la determinación de mercurio por la técnica de vapor frío.****D.11.1. Preparación de disoluciones y curvas de calibración.**

**D.11.1.1.** Disolución estándar de 10 mg/L. Medir 1 mL de la disolución estándar de 1000 mg/L, adicionar 1 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado y llevar al aforo con agua en un matraz de 100 mL.

**D.11.1.2.** Disolución estándar de 0.1 mg/L. Diluir 1 mL de la disolución estándar de 10 mg/L de Hg, adicionar 1 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado y llevar al aforo con agua en un matraz de 100 mL.

**D.11.1.3.** A partir de la disolución de 0.1 mg/L preparar la curva de calibración de acuerdo a la tabla (véase Tabla D.11.1).

**Tabla D.11.1. Curva de calibración de Mercurio.**

Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Volumen de disolución estándar de Hg de 0.1 mg/L	Volumen de HCl concentrado (mL)	Volumen de disolución de dicromato de potasio (mL)	Volumen de aforo con agua (mL)
Blanco de calibración	0	10	10	100
0.5	500 $\mu\text{L}$	10	10	100
0.75	750 $\mu\text{L}$	10	10	100
1.0	1.0 mL	10	10	100
2.0	2 mL	10	10	100
5.0	5 mL	10	10	100
10.0	10 mL	10	10	100

**NOTA:** En lugar de la disolución de dicromato de potasio se puede utilizar otro agente oxidante como el permanganato de potasio o proceder de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

**D.11.1.4.** Adicionar a las muestras, a las muestras fortificadas y a las disoluciones estándar de control de calidad (MCC o MCI) el mismo volumen de disolución de dicromato de potasio o el agente oxidante seleccionado.

**D.11.2. Condiciones de operación del instrumento.**

**D.11.2.1.** Ajustar las siguientes condiciones del instrumento de absorción atómica conforme al manual del fabricante:

**D.11.2.2.** Colocar y encender la lámpara.

**D.11.2.3.** Seleccionar la longitud de onda. Generalmente se trabaja a una longitud de onda de 253.6 nm.

**D.11.2.4.** Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante.

**D.11.2.5.** Seleccionar la apertura de la rejilla.

**D.11.2.6.** Ajustar los flujos del gas acarreador (argón o nitrógeno).

**D.11.2.7.** Ajustar la celda.

**D.11.2.8.** Para equipos con sistema automatizado, colocar en uno de los reservorios la disolución de HCl al 50% volumen/volumen y en el otro la disolución de borohidruro de sodio al 4%.

**NOTA:** En lugar de la disolución reductora de borohidruro de sodio al 4% se puede utilizar otro agente reductor como la disolución reductora de estaño o proceder de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

**D.11.2.9.** Ajustar la bomba peristáltica de acuerdo a las condiciones del fabricante y proceder a la lectura en el equipo.

**D.11.2.10.** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de la curva de calibración siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**D.11.2.11.** Optimizar la respuesta con la disolución estándar de verificación de mercurio (Hg).

**D.11.3. Lectura en el equipo.**

**D.11.3.1.** Leer por quintuplicado el blanco de la curva de calibración para verificar que no haya contaminación y posteriormente leer la disolución de verificación también por quintuplicado.

**D.11.3.2.** Leer por triplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva. Elaborar una curva de calibración graficando la absorbancia en función de la concentración.

**D.11.3.3.** Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**D.11.3.4.** Leer cada una de las muestras por triplicado, registrar la absorbancia promedio y calcular la concentración de Hg a partir de la curva de calibración.

**D.11.3.5.** Asegurarse que las concentraciones de las muestras están dentro del intervalo lineal de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

**D.11.4. MCC.**

**D.11.4.1.** El coeficiente de correlación (r) de la curva deberá ser  $\geq 0.995$ .

**D.11.4.2.** Leer en el equipo el blanco de curva y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del  $\pm 10\%$  del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a calibrar y repetir las lecturas del último lote de muestras.

**D.12. Método para la determinación de arsénico y selenio por generador de hidruros.**

**D.12.1. Preparación de disoluciones y curvas de calibración.**

**D.12.1.1.** A partir de las disoluciones estándar de As y Se de 1000 mg/L, preparar disoluciones de trabajo de As y Se de 1 mg/L en HCl de concentración apropiada al método.

**D.12.1.2.** Preparar una disolución blanco y 5 niveles de concentración de cada uno de los metales para un intervalo de concentración lineal (generalmente de 0 a 20  $\mu\text{g/L}$ ).

**D.12.1.3.** Llevar a cabo la reducción de As (V) a As (III) y de Se (VI) a Se (IV).

**D.12.2. Reducción de As (V) a As (III).**

**D.12.2.1.** Tomar una alícuota de la muestra y agregar 10 mL de la disolución de KI al 10% y 10 mL de HCl concentrado, llevar al volumen de 100 mL con agua y esperar 2 h antes de poder leer en el equipo.

**D.12.2.2.** La reducción del As (V) a As (III), puede adecuarse a las condiciones que recomienda el manual del fabricante.

**D.12.3. Digestión de la muestra para el análisis de selenio y reducción de Se (VI) a Se (IV).**

**D.12.3.1.** Para la determinación de selenio, tomar una alícuota de la muestra y agregar 2 mL de HCl 4 N, mantener a ebullición por 1 h. Dejar enfriar y llevar al aforo.

**D.12.3.2.** Se puede utilizar HCl 6 N, en este caso mantener a ebullición por 10 min.

**D.12.3.3.** Tener cuidado para evitar una reoxidación del selenio. La eficiencia en la reducción depende de la temperatura, tiempo de reducción y concentración del HCl. Para optimizar el método, analizar muestras fortificadas con una concentración de selenio conocida.

**D.12.3.4.** No utilizar material de vidrio que haya sido utilizado para la reducción de As (V) con yoduro de potasio.

**D.12.3.5.** Preparar de igual forma un blanco, la curva de calibración, las muestras, la muestra fortificada, MCC y/o MCI.

**D.12.4. Condiciones de operación del instrumento.**

**D.12.4.1.** Ajustar las siguientes condiciones del instrumento de absorción atómica conforme al manual del fabricante.

**D.12.4.1.1.** Colocar y encender la lámpara.

**D.12.4.1.2.** Seleccionar la longitud de onda. Generalmente se trabaja a una longitud de onda de 193.7 nm para arsénico (As) y de 196.0 nm para selenio (Se). Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante.

**D.12.4.1.3.** Seleccionar la apertura de la rejilla.

**D.12.4.1.4.** Ajustar los flujos de los gases (acetileno, aire, argón o nitrógeno).

**D.12.4.1.5.** Ajustar la celda.

**D.12.4.1.6.** Para equipos con sistema automatizado, colocar en uno de los reservorios la disolución de HCl al 50% volumen/volumen y en el otro la disolución de borohidruro de sodio al 4%.

**D.12.4.1.6.1.** Disolución reductora de borohidruro de sodio al 4% peso/volumen en disolución de hidróxido de sodio al 1% peso/volumen. Pesar 4 g de borohidruro de sodio en 100 mL de una disolución de hidróxido de sodio al 1% peso/volumen. Filtrar al vacío.

**D.12.4.1.7.** Ajustar la bomba peristáltica de acuerdo a las condiciones del fabricante y proceder a la lectura en el equipo.

**D.12.4.1.8.** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de la curva de calibración siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**D.12.4.1.9.** Optimizar la respuesta con la disolución estándar de verificación la respuesta del instrumento al analito.

#### **D.12.5. Lectura en el equipo.**

**D.12.5.1.** Leer por quintuplicado el blanco de reactivos para verificar que no haya contaminación y posteriormente leer la disolución de verificación también por quintuplicado.

**D.12.5.2.** Leer por triplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva. Elaborar una curva de calibración dentro del intervalo lineal, graficando la absorbancia en función de la concentración.

**D.12.5.3.** Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**D.12.5.4.** Leer cada una de las muestras por triplicado, registrar la absorbancia y calcular la concentración del elemento a partir de la curva de calibración. Cuando se use el equipo programable realizar los cálculos finales.

**D.12.5.5.** Asegurarse que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo lineal de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

#### **D.12.6. Medidas de control de calidad.**

**D.12.6.1.** El coeficiente de correlación (r) de la curva deberá ser  $\geq 0.995$

**D.12.6.2.** Leer en el equipo el blanco de curva y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del  $\pm 10\%$  del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a calibrar y repetir las lecturas del último lote de muestras.

#### **D.12.7. Expresión de Resultados.**

##### **D.12.7.1. Método de Cálculo.**

**D.12.7.1.1.** Interpolan los valores de absorbancia, área o altura del pico de la muestra analizada en la curva de calibración y obtener los resultados en mg/L del elemento en la muestra empleando la siguiente fórmula:

##### **Fórmula D.12.1.**

$$\text{mg del elemento/L} = \frac{AV}{MF}$$

En donde:

A Concentración del elemento en la muestra leída directamente del equipo o de la curva de calibración, en mg/L;

V es el volumen de la disolución de la muestra digerida (aforo), en mL;

F es el factor para pasar de  $\mu\text{g}$  a  $\text{mg}$ =1000 (En el caso de la técnica de horno de grafito, generador de hidruros y vapor frío ya que la curva está en  $\mu\text{g/L}$ ). Para la técnica de flama el factor de dilución es 1, ya que la concentración interpolada de la curva de calibración está en mg/L;

M es el volumen de la muestra, en mL;

**NOTA:** Sí la muestra ha sido diluida, debe aplicarse el factor de dilución.

**D.12.8. Informe de la Prueba.****D.12.8.1.** Informar como:

mg/L del metal analizado.

**D.13. Método Espectrofotométrico Ultravioleta para la determinación de nitrógeno de nitratos.****D.13.1. Fundamento.**

Se basa en la medición de la absorción de luz ultravioleta a las longitudes de onda de 220 y 275 nm. A 220 nm los nitratos presentes y la materia orgánica tienen una absorbancia máxima, a 275 nm sólo la materia orgánica absorbe. La diferencia de lecturas de la absorbancia a 220 nm menos dos veces la absorbancia a 275 nm es proporcional a la concentración de nitratos.

Este método es utilizado en muestras de agua sin contaminación, y bajo contenido de materia orgánica.

**D.13.2. Interferencias.**

El tratamiento de filtración puede ser utilizado para eliminar la interferencia por sólidos suspendidos. La adición de HCl es para eliminar la interferencia por presencia de carbonatos o hidróxidos, hasta una concentración de 1 000 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

Interfiere en este método cromo hexavalente, cloritos y cloratos, para lo cual es conveniente determinar su concentración en muestras tratadas con ozono y compensarlo en el cálculo final.

**D.13.3. Aparatos e instrumentos.**

**D.13.3.1.** Balanza analítica con sensibilidad de  $\pm 0.1$  mg calibrada y/o verificada.

**D.13.3.2.** Espectrofotómetro calibrado y verificado para utilizarse a una longitud de onda de 220 y 275 nm con celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

**D.13.3.3.** Estufa de secado.

**D.13.3.4.** Parrilla con agitación.

**D.13.4. Material.**

Todo el material volumétrico utilizado en este procedimiento debe ser clase A, calibrado y/o verificado.

**D.13.4.1.** Matraz Erlenmeyer de 125, 250, 500 mL;

**D.13.4.2.** Matraz volumétrico 50, 100, 500, 1 000 mL;

**D.13.4.3.** Bureta de 50 o 100 mL;

**D.13.4.4.** Probeta graduada de 50 mL;

**D.13.4.5.** Pipeta volumétrica de 1, 4 y 50 mL;

**D.13.4.6.** Desecador;

**D.13.4.7.** Termómetro calibrado y/o verificado;

**D.13.4.8.** Piseta;

**D.13.4.9.** Papel secante, para las celdas de lectura;

**D.13.4.10.** Frasco de plástico, para desechos;

**D.13.4.11.** Papel filtro Whatman o equivalente Número 40 o 41, sin cenizas;

**D.13.4.12.** Filtro de nitrocelulosa o vidrio, de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ;

**D.13.4.13.** Agitador magnético con cubierta de teflón, y

**D.13.4.14.** Micropipeta automática calibrada y/o verificada.

**D.13.5. Reactivos.**

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

**D.13.5.1.** Nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) con una pureza mayor de 99.95% o avalado por la DGN;

**D.13.5.2.** Sulfato de aluminio y potasio dodecahidratado (AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•12H<sub>2</sub>O) o Sulfato de aluminio amonio dodecahidratado (AlNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)•12H<sub>2</sub>O);

**D.13.5.3.** Hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH);

**D.13.5.4.** Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), y

**D.13.5.5.** HCl.

**D.13.6. Preparación de disoluciones.**

**D.13.6.1. Suspensión de hidróxido de aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$**

**D.13.6.1.1.** Disolver 125 g de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , o  $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1 L de agua destilada.

**D.13.6.1.2.** Calentar a  $60^\circ\text{C}$  y agregar mientras se agita, lentamente 55 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Dejar reposar la mezcla durante 1 h.

**D.13.6.1.3.** Decantar el sobrenadante y desecharlo, lavar el precipitado con sucesivas adiciones de agua destilada, agitar, reposar y decantar, para eliminar amonio, cloruros, nitratos y nitritos.

**D.13.6.1.4.** Finalmente, después de reposar, decantar lo más posible el líquido sobrenadante, recuperando solo la suspensión concentrada.

**D.13.6.2. Disolución concentrada de nitratos.**

**D.13.6.2.1.** Secar nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) en una estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 24 h.

**D.13.6.2.2.** Enfriar en un desecador.

**D.13.6.2.3.** Pesar 0.7218 g de nitrato de potasio anhidro. Ajustar este peso a la pureza del reactivo patrón utilizado.

**D.13.6.2.4.** Llevar al volumen de 1 000 mL con agua destilada.

**D.13.6.2.5.** Preservar con 2 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), por esta razón tener cuidado al tomar las alícuotas de esta disolución, decantando cuidadosamente en otro recipiente o introduciendo una pipeta, de tal manera que no se succione parte del cloroformo.

**D.13.6.2.6.** Esta disolución contiene: 1 mL = 0.100 mg  $\text{N—NO}_3^-$  y es estable por seis meses.

**D.13.6.3. Disolución patrón de nitrato.**

**D.13.6.3.1.** Diluir 50 mL de disolución madre de nitrato a 500 mL con agua destilada.

**D.13.6.3.2.** Preservar con 2 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).

**D.13.6.3.3.** Esta disolución contiene: 1 mL = 0.010 mg  $\text{N—NO}_3^-$  y es estable por seis meses.

**D.13.6.4. Disolución de HCl.**

Diluir 83 mL de HCl a 1 000 mL con agua.

**D.13.7. Procedimiento analítico.**

**D.13.7.1. Curva de calibración.**

**D.13.7.1.1.** Diluir los siguientes volúmenes de la disolución patrón y aforar a 50 mL.

**Tabla D.13.1.- Curva de calibración de  $\text{N—NO}_3^-$**

Volumen de disolución patrón (mL)	Concentración (mg de $\text{N—NO}_3^-$ /L)	Volumen de aforo (mL)
0.0	0.0	50
1.0	0.20	50
3.0	0.60	50
5.0	1.00	50
7.0	1.40	50
9.0	1.80	50
12.0	2.40	50
15.0	3.00	50
21.0	4.20	50
25.0	5.00	50
35.0	7.00	50
50.0	10.00	50

**D.13.7.1.2.** Añadir exactamente 1 mL de disolución de HCl a cada una de las disoluciones de la curva y agitar vigorosamente.

**D.13.7.1.3.** Medir las absorbancias de los patrones a una longitud de onda de 220 nm y 275 nm.

**D.13.8. Tratamiento de la muestra.**

**D.13.8.1.** Si es necesario eliminar la presencia de color proceder de la siguiente forma:

**D.13.8.1.1.** Colocar en un matraz erlenmeyer de 500 mL, 200 mL de muestra.

**D.13.8.1.2.** Agregar 4 mL de la suspensión de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , agitar.

**D.13.8.1.3.** Dejar reposar por 5 min.

**D.13.8.1.4.** Filtrar a través de papel filtro Whatman No. 40 o 41, sin cenizas, o filtro de malla de 0.45  $\mu\text{m}$ .

**D.13.9. Determinación.**

**D.13.9.1.** Con una alícuota de 50 mL de muestra o clarificado, añadir exactamente 1 mL de disolución de HCl y agitar vigorosamente.

**D.13.9.2.** Hacer las lecturas de absorbancia en la muestra, primero a una longitud de onda de 220 y después a 275 nm.

**D.13.10. Expresión de los resultados.**

**D.13.10.1. Cálculos.**

**D.13.10.1.1.** Obtener la ecuación de la curva de calibración, representada por la siguiente ecuación:

**Ecuación de la recta**

$$y = mx + b$$

En donde:

$m$  es la pendiente;

$b$  es la ordenada al origen;

$y$  es la absorbancia, y

$x$  es la concentración ( $\text{mg N-NO}_3^-/\text{L}$ ).

**D.13.10.1.2.** Corrección por materia orgánica disuelta. Restar dos veces la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 275 nm ( $A_{275}$ ) de la lectura de absorbancia a 220 nm ( $A_{220}$ ).

$$\text{ABS N-NO}_3^- = A_{220} - 2 A_{275}$$

De la ecuación de la recta se despeja  $x$ :

$$y = mx + b$$

$$x = (y - b)/m$$

$$\text{mg de N-NO}_3^-/\text{L} = \frac{[(\text{ABS N-NO}_3^-) - b]}{m}$$

**D.13.10.1.3.** En el caso de muestras coloreadas sometidas a clarificación con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , realizar la siguiente corrección por volumen añadido:

$$\text{mg de N-NO}_3^-/\text{L} = \left[ \frac{(\text{ABS N-NO}_3^-) - b}{m} \right] \left[ \frac{49.01 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right]$$

En donde:

49.01 mL/50 mL es el factor de corrección por dilución de las muestras sometidas a clarificación;

Se toman 200 mL de muestra y se lleva a un volumen final de 204 mL por la adición de 4 mL de suspensión de alúmina, de la disolución clarificada se miden 50 mL para realizar la determinación, por lo tanto el volumen real tomado de la muestra es el siguiente:

200 mL de muestra  $\longrightarrow$  204 mL volumen final de disolución clarificada  
 $X \longrightarrow$  50 mL de la alícuota colectada del matraz de disolución clarificada

$$X = \frac{(200 \text{ mL})(50 \text{ mL})}{204 \text{ mL}}$$

$$X = 49.01 \text{ mL}$$

**D.13.11. Informe de la prueba.****D.13.11.1.** Informar como:

Los resultados se reportan como mg de  $\text{N}-\text{NO}_3^-$  /L de muestra.

**D.14. Método espectrofotométrico visible para la determinación de nitrógeno de nitritos.****D.14.1. Fundamento.**

Los nitritos presentes reaccionan en medio ácido (pH=0 a 2.5) por diazotación con la sulfanilamida para formar una sal de diazonio, la cual por copulación con el dihidrocloruro de N-I-Naftil etilendiamina forma un colorante azoico de color púrpura rojizo que se mide espectrofotométricamente a 543 nm.

**D.14.2. Aparatos e instrumentos.**

**D.14.2.1.** Balanza analítica con sensibilidad de  $\pm 0.1$  mg calibrada y/o verificada.

**D.14.2.2.** Espectrofotómetro calibrado y verificado, para utilizarse en una longitud de onda de 543 nm con celda de paso de luz de 1 cm o mayor.

**D.14.2.3.** Potenciómetro calibrado y/o verificado.

**D.14.3. Material.**

Todo el material volumétrico utilizado en este procedimiento debe ser clase A, calibrado y verificado.

**D.14.3.1.** Matrazes volumétricos de 50, 100, 500 y 1000 mL;

**D.14.3.2.** Matrazes Erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL;

**D.14.3.3.** Desecador;

**D.14.3.4.** Termómetro calibrado y/o verificado;

**D.14.3.5.** Piseta;

**D.14.3.6.** Papel secante para las celdas de lectura;

**D.14.3.7.** Frasco de plástico para desecho;

**D.14.3.8.** Filtro de membrana con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ;

**D.14.3.9.** Pipetas volumétricas de 1, 25 y 50 mL;

**D.14.3.10.** Micropipetas de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  calibradas y/o verificadas;

**D.14.3.11.** Agitador magnético con cubierta de teflón;

**D.14.3.12.** Parrilla de agitación;

**D.14.3.13.** Estufa de secado, y

**D.14.3.14.** Perlas de vidrio.

**D.14.4. Reactivos.**

Todos los reactivos que a continuación se indican deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación.

**D.14.4.1.** Agua destilada Tipo I;

**D.14.4.2.** Ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );

**D.14.4.3.** 4 aminobencensulfanilamida ( $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ );

**D.14.4.4. HCl.****D.14.4.5.** Dihidrocloruro de N–1–naftil etilendiamina;**D.14.4.6.** Oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) con una pureza mayor de 99.95% o avalado por la DGN;**D.14.4.7.** Permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ );**D.14.4.8.** Nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) con una pureza mayor de 99.0%, y**D.14.4.9.** Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).**D.14.5. Disoluciones.****D.14.5.1.** Disolución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1 N.**D.14.5.2.** Disolución de HCl 1 N.**D.14.5.3.** Disolución de HCl al 10%.**D.14.6. Reactivos para desarrollo de color.****D.14.6.1. Disolución de sulfanilamida: 4 aminobencensulfanilamida.**

Disolver 5.0 g de sulfanilamida en una mezcla de 50 mL de HCl concentrado en 300 mL de agua, llevar al volumen de 500 mL con agua. La disolución es estable por varios meses. Deberá almacenarse en frascos ámbar y en refrigeración a  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

**D.14.6.2. Disolución de dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina.**

Disolver 500 mg de dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina y aforar a 500 mL con agua, almacenar en frasco ámbar y poner en refrigeración a  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Renovar la disolución mensualmente o si aparece un color café intenso.

**D.14.6.3. Disolución de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) 0.05 N.**

**D.14.6.3.1.** Disolver 1.60 g de  $\text{KMnO}_4$  y llevar al aforo de 1000 mL con agua; almacenarlo en frasco ámbar durante una semana y decantar evitando agitar el sedimento, filtrar con membrana de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ . Inmediatamente se procede a la valoración de la disolución.

**D.14.6.3.2.** También se puede preparar a partir de una disolución concentrada comercial.**D.14.6.4. Valoración de la disolución:**

**D.14.6.4.1.** Secar aproximadamente 1 g de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  a  $105^\circ\text{C}$ , al menos 12 h. Pesar por triplicado de 100 a 200 mg, y transferir a matraces Erlenmeyer de 250 o 500 mL. A cada recipiente agregar 100 mL de agua destilada, agitar para disolver.

**D.14.6.4.2.** A cada uno de los matraces con disolución de oxalato de sodio, adicionar 10 mL de ácido sulfúrico 1:1, calentar de  $90$  a  $95^\circ\text{C}$  y titular con la disolución de permanganato. Agitar y finalizar hasta obtener un vire ligeramente rosado el cual debe persistir al menos 1 min. Evitar que la temperatura descienda por debajo de  $85^\circ\text{C}$ . Correr un blanco.

**D.14.6.4.3.** Calcular la concentración de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) con la siguiente ecuación:

$$\text{Normalidad del } \text{KMnO}_4 = \frac{\text{g de } \text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{[(A - B) \times 0.06701]}$$

En donde:

A son mL de titulante por muestra, y

B son mL de titulante del blanco.

**D.14.6.5. Preparación de la curva de calibración.****D.14.6.5.1. Disolución madre de nitritos (250 mg/L).****D.14.6.5.1.1.** Pesar 1.232 g de este reactivo, disolverlo y llevarlo al aforo a 1000 mL con agua.

**D.14.6.5.1.2.** Preservar con 1 mL de cloroformo. Por esta razón tener cuidado al tomar las alícuotas de esta disolución, decantando cuidadosamente en otro recipiente o introduciendo una pipeta, de tal manera que no se succione parte del cloroformo.

**D.14.6.5.1.3.**  $1 \text{ mL} = 250 \text{ } \mu\text{g de N} - \text{NO}_2^-$

**D.14.6.6. Valoración de la disolución.**

**D.14.6.6.1.** Tomar 50 mL de la disolución de  $\text{KMnO}_4$ , transferir a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, adicionar perlas de vidrio, agregar 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 50 mL de la disolución madre de nitritos, de tal forma que la pipeta descargue bajo la superficie de la disolución en el matraz. Agitar y calentar aproximadamente a  $80^\circ\text{C}$ .

**D.14.6.6.2.** Titular con la disolución de oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) hasta decoloración.

**D.14.6.6.3.** Titular el exceso de oxalato de sodio con la disolución  $\text{KMnO}_4$  hasta la obtención de un color rosa tenue estable por 30 s.

**D.14.6.6.4.** Calcular la concentración de la disolución madre de nitritos (A) en mg/mL con la siguiente ecuación:

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

En donde:

A son mg de nitrógeno de nitritos  $\text{N}-\text{NO}_2^-$ /mL de disolución madre de nitrito de sodio;

B es el volumen de la disolución de  $\text{KMnO}_4$  adicionado para la valoración, 50 mL iniciales más el volumen empleado en la titulación;

C es la concentración de la disolución de  $\text{KMnO}_4$ , cercano a 0.05 N;

D es el volumen de la disolución de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  agregado;

E es la concentración de la disolución de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , cercano a 0.05 N;

F es el volumen de la disolución madre de nitritos que se valora, 50 mL, y

7 es el peso equivalente del nitrógeno.

**D.14.6.6.5.** 1 mL de disolución de  $\text{KMnO}_4$  0.05 N consumido por la disolución de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) corresponde a 1 750  $\mu\text{g}$  de  $\text{N}-\text{NO}_2^-$ .

**D.14.6.6.6.** Disolución intermedia de nitritos (50 mg/L).

**D.14.6.6.7.** Calcular el volumen de la disolución madre de nitritos (G), de manera que la alícuota contenga 12.5 mg de nitrógeno de nitritos, requerido para la disolución intermedia por medio de la siguiente ecuación:

$$G = \frac{12.5}{A}$$

En donde:

A es la concentración de la disolución madre de nitritos en mg/mL.

Medir con bureta el volumen calculado (G), aproximadamente 50 mL de la disolución madre de nitritos, diluir y llevar al aforo de 250 mL con agua.

**D.14.7. Procedimiento.**

**D.14.7.1. Curva de calibración.**

**D.14.7.1.1.** Medir una serie de alícuotas de la disolución patrón en matraces volumétricos de 50 mL, como se indica (véase Tabla D.14.1.).

**Tabla D.14.1. Curva de calibración de  $\text{N}-\text{NO}_2^-$**

Volumen de solución de nitritos (mL)	Concentración (mg de $\text{N}-\text{NO}_2^-$ /L de muestra)	Volumen de aforo con agua (mL)
0.0	blanco	50
0.1	0.010	50
0.2	0.020	50
0.4	0.040	50
0.6	0.060	50
1.0	0.100	50
1.4	0.140	50
1.7	0.170	50

2.0	0.200	50
2.5	0.250	50

**D.14.7.2. Expresión de los resultados.****D.14.7.2.1. Cálculos.**

**D.14.7.2.1.1.** Obtener la ecuación característica de la curva de calibración, representada por la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

En donde:

$m$  es la pendiente;

$b$  es la ordenada al origen;

$y$  es la absorbancia,  $y$

$x$  es la concentración (mg de  $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ ).

**D.14.7.3. Determinación.**

Hacer la determinación lo más pronto posible. Las muestras almacenadas a  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y en la oscuridad pueden durar hasta dos días.

**D.14.7.4. Pretratamiento cuando hay presencia de sólidos suspendidos en la muestra.**

Filtrar la muestra a través de una membrana con tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ .

**D.14.7.5. Desarrollo de color.**

Transferir 50 mL de muestra a un matraz de 250 mL. Neutralizar a un pH dentro del intervalo de 5.0 a 9.0 utilizando la disolución de HCl 1 N o  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Adicionar 1 mL de disolución de sulfanilamida; agitar varias veces. Permitir que la mezcla reaccione de 2 a 8 min. Adicionar 1 mL de Dihidrocloreuro de N-1-naftil etilendiamina, agitar varias veces. Dejar reposar por lo menos 10 min. Leer en el espectrofotómetro la absorbancia de la disolución a 543 nm.

La presencia de nitritos desarrolla una coloración púrpura rojizo.

**D.14.7.6. Corrección por color.**

Medir 50 mL de la muestra, adicionar 1 mL de HCl al 10% y leer la absorbancia ( $A_C$ ).

**D.14.8. Expresión de los resultados.****D.14.8.1. Cálculos.**

**D.14.8.1.1.** Corregir la absorbancia de la muestra por medio de la ecuación:

$$A = A_M - A_C$$

En donde:

$A$  es la absorbancia corregida;

$A_M$  es la absorbancia de la muestra determinada,  $y$

$A_C$  es la absorbancia de la muestra empleada para corrección de color.

**D.14.8.1.2.** Obtener los mg de  $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ , interpolando en la curva de calibración la absorbancia ( $A_{\text{abs}}$ ) de la muestra, en la siguiente fórmula:

De la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Despejamos  $x$

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$(\text{mg de N-NO}_2^-)/\text{L} = \left[ \frac{\text{Abs} - b}{m} \right] Fd$$

En donde:

$m$  es la pendiente de la curva de calibración;

$b$  es la constante obtenida del ajuste de mínimos cuadrados con los datos de la curva de calibración, y

$Fd$  es el factor de dilución.

#### **D.14.9. Informe de la prueba.**

##### **D.14.9.1. Informar como:**

Los resultados se reportan en mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L con tres cifras decimales.

#### **D.15. Método para la determinación de Compuestos Orgánicos Halogenados adsorbibles (fijos y purgables), (AOX).**

##### **D.15.1. Fundamento.**

Este método consiste en una acidificación de la muestra de agua con ácido nítrico, seguida de una adsorción sobre carbón activado de los compuestos orgánicos contenidos en la muestra, para lo cual se utiliza una de las siguientes técnicas; agitación, cavitación o por adsorción en columna.

La filtración de la muestra antes del análisis permite la determinación separada de compuestos orgánicos adsorbibles disueltos y orgánicos adsorbibles fijos (unidos a halógenos).

La separación de los compuestos volátiles mediante gas de arrastre, permite la cuantificación de los compuestos orgánicos adsorbibles purgables. Determinando los compuestos orgánicos adsorbibles fijos por cuantificación posterior a la extracción de los purgables.

Con fines de calidad del agua para uso y consumo humano, se considera compuestos orgánicos adsorbibles fijos, aquellos a los que no se les da un filtrado previo.

El desplazamiento posterior de haluros inorgánicos, se realiza por enjuague del carbón activado con solución de nitrato de sodio acidificada con ácido nítrico, seguida de combustión del carbón en presencia de oxígeno y absorción posterior de los haluros hidrogenados en una trampa con solución ácida, para posteriormente hacer la determinación de los iones haluro por; titulación argentométrica o microcoulometría.

##### **D.15.2. Interferencias.**

**D.15.2.1.** Es imprescindible un tiempo de 8 h entre la colecta de la muestra y el análisis, principalmente en la determinación de adsorbibles purgables, en cuyo caso ante ninguna circunstancia es aceptable un tiempo mayor de 24 h entre la colecta y el análisis. Cuando esto no sea posible, se deberá acidificar la muestra en el sitio de muestreo y preferentemente congelarla hasta su recepción en el laboratorio. Considerando que el tiempo de almacenamiento repercutirá inversamente proporcional a la recuperación de halógenos. Por lo que es conveniente, asegurar un tiempo máximo de 48 h entre el muestreo y el análisis para el caso de adsorbibles fijos.

**D.15.2.2.** Interferencia positiva resulta de concentraciones de cloro libre residual, por lo que las muestras deberán ser tratadas con sulfito de sodio inmediatamente después de su colecta.

**D.15.2.3.** Algunos compuestos orgánicos bromados o iodados, pueden descomponerse a su forma elemental durante la combustión, dando una pérdida en la cuantificación final.

**D.15.2.4.** La presencia de algas repercute en valores altos, debido al contenido intracelular de cloruros. En este caso se deberá esperar un mínimo de 8 h, entre la acidificación y el análisis, para eliminar dicha interferencia.

**D.15.2.5.** Compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos, interfieren negativamente en la determinación.

##### **D.15.3. Aparatos e instrumentos.**

**D.15.3.1.** Instrumental que cuente con sistema de adsorción por procedimiento de columna. Con tubos de adsorción, diámetro interior 3 mm y longitud 40 a 50 mm, conectados en serie empacados con 50 mg de carbón activado. Pudiéndose utilizar otras dimensiones de columna, en tal caso, su desempeño deberá ser evaluado y demostrar que se cumple con los requisitos de límite de detección;

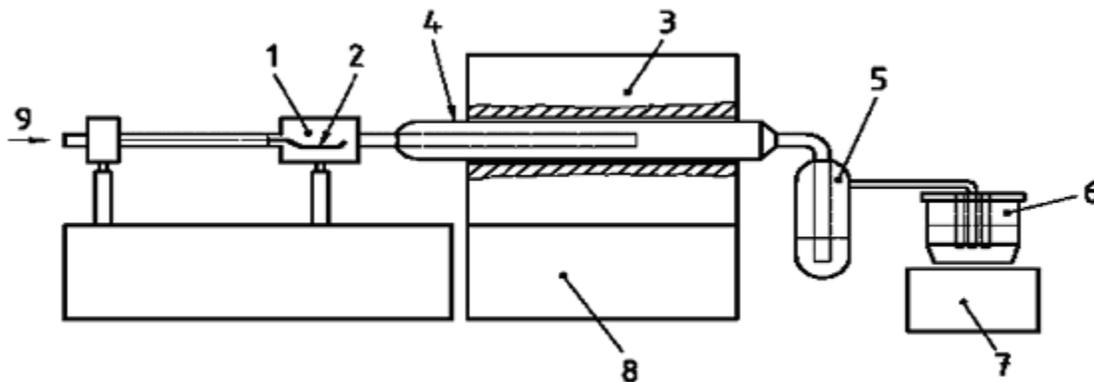
**D.15.3.2.** Sistema de combustión, con horno capaz de alcanzar calentamiento de por lo menos 959°C, equipado con tubo de cuarzo, de diámetro interior de 2 a 4 cm y longitud de cerca de 30 cm (véase figura D.15.1.), pudiéndose utilizar cámaras de combustión horizontal o vertical;

**D.15.3.3.** Compartimiento absorbedor con ácido sulfúrico.

**D.15.3.4.** Titulador argentométrico acoplado, adecuado para la determinación de 0.1 µg de cloruro, con coeficiente de variación de 10% (precisión), o similar, y

**D.15.3.5.** Pipeta automática, adecuada para volúmenes de 10 a 100 µL.

**Figura D.15.1.- Diagrama de un aparato de combustión-titulación para AOX**



1. Entrada de la muestra para AOX.
2. Muestra para AOX.
3. Horno.
4. Tubo de combustión.
5. Absorbedor lleno con ácido sulfúrico.
6. Celda de titulación.
7. Agitador.
8. Instrumento de control de temperatura, flujo de gas.
9. Entrada del gas de combustión.

#### **D.15.4. Material.**

El material a utilizar, deberá ser lavado con ácido y enjuagado con agua exenta de carbono orgánico.

**D.15.4.1.** Matraz Erlen Meyer 100 mL;

**D.15.4.2.** Matraz Erlen Meyer 250 mL;

**D.15.4.3.** Matraz volumétrico 100 mL;

**D.15.4.4.** Matraz volumétrico 1 000 mL;

**D.15.4.5.** Probeta graduada 100 mL;

**D.15.4.6.** Pipeta volumétrica 5 mL, y

**D.15.4.7.** Pipeta volumétrica 50 mL.

#### **D.15.5. Muestreo.**

La muestra se coleccionará en frascos de vidrio ámbar, de 205 mL de capacidad mínima, previamente lavados con ácido, cubiertos con papel aluminio y esterilizados a 400°C por al menos 1 h. La tapa del frasco, con sello de TFE, se debe lavar con detergente, enjuagándolo al menos tres veces con agua exenta de carbono orgánico, envolver en papel aluminio y esterilizada a 100°C durante 1 h. Preferentemente utilizar tapas tipo septum.

#### **D.15.6. Reactivos.**

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación.

**D.15.6.1.** El contenido de AOX deberá ser insignificante cuando se compare con el contenido más bajo de AOX a ser determinado. El contenido total de AOX en el agua, químicos y gases pueden ser corroborados con la medición del blanco total.

**D.15.6.2.** Agua destilada, grado 1 con conductividad  $<0.1 \mu\text{Siemens/cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

**D.15.6.3.**  $\text{SiO}_2 < 0.05 \text{ mg/L}$ .

**D.15.6.4.** Compuestos orgánicos exentos, por adsorción en columna de carbón activado.

**D.15.6.5.** Carbón activado (malla 100 a 200), preferentemente  $10 \mu\text{m}$  a  $50 \mu\text{m}$ , de diámetro. El valor del blanco del carbón activado debe de contener menos de  $15 \mu\text{g}$  de cloruro equivalente por gramo de carbón activado.

**D.15.6.6.** KI.

**D.15.6.7.** Solución de almidón, al 1%.

**D.15.6.8.** Ácido nítrico,  $\text{HNO}_3$  (conc).

**D.15.6.9.** Ácido nítrico diluido ( $\text{HNO}_3$ ) 0.02 M.

**D.15.6.10.** HCl 0.010 M.

**NOTA:** La molaridad debe ser precisa, porque el ácido es usado para verificar la microtitulación.

**D.15.6.11.** Acido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc).

**D.15.7. Preparación de disoluciones.**

**D.15.7.1. Disolución madre de Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) 0.2 M**

**D.15.7.1.1.** Disolver 17 g de nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) en 400 mL de agua destilada, después adicionar 25 mL de  $\text{HNO}_3$  (conc) y posteriormente aforar a 1 000 mL en matraz volumétrico.

**D.15.7.1.2.** Si se almacena en un frasco ámbar, la solución es estable por tres meses.

**D.15.7.2. Disolución de lavado de Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) 0.01 M,  $\text{pH} \approx 1.7$**

**D.15.7.2.1.** Pipetear 50 mL de la solución madre de nitrato, en un matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**D.15.7.2.2.** Si se almacena en un frasco ámbar, la solución es estable por 1 mes.

**D.15.7.3. Disolución de sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) 1 M.**

**D.15.7.3.1.** Disolver 126 g de nitrato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) en 400 mL de agua destilada, y posteriormente transferir a matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**D.15.7.3.2.** La solución es estable por 1 mes si se almacena de  $2$  a  $8^\circ\text{C}$ .

**D.15.7.4. Disolución madre de 4–Clorofenol ( $200 \text{ mg Cl}^- \text{ AOX/L}$ ).**

**D.15.7.4.1.** Disolver 72.5 mg de 4–Clorofenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{ClO}$ ) en 40 mL de agua destilada y posteriormente trasvasar a matraz volumétrico de 100 mL y aforarlo con agua destilada.

**D.15.7.4.2.** Por razones de seguridad, se recomienda usar soluciones disponibles comercialmente.

**D.15.7.4.3.** La solución madre puede ser almacenada por 1 mes de  $2$  a  $8^\circ\text{C}$  en frasco de vidrio.

**D.15.7.5. Disolución patrón de 4–Clorofenol ( $1 \text{ mg Cl}^- \text{ AOX/L}$ ).**

**D.15.7.5.1.** Pipetear 5 mL de la solución madre de 4–Clorofenol ( $200 \text{ mg Cl}^- \text{ AOX/L}$ ) a un matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**D.15.7.5.2.** La solución de trabajo puede ser almacenada por 1 mes de  $2$  a  $8^\circ\text{C}$  en frasco de vidrio.

**D.15.7.6. Disolución madre de ácido 2–Clorobenzoico ( $250 \text{ mg Cl}^- \text{ AOX/L}$ ).**

**D.15.7.6.1.** Disolver 110.4 mg de ácido 2–Clorobenzoico ( $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{COOH}$ ) en 40 mL de agua destilada y trasvasar a matraz volumétrico de 100 mL, aforándolo posteriormente con agua destilada.

**D.15.7.6.2.** El ácido 2–Clorobenzoico ( $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{COOH}$ ) se disuelve lentamente por lo que deberá prepararse esta solución desde un día antes.

**D.15.7.6.3.** Esta solución madre puede ser almacenada a una temperatura de  $2$  a  $8^\circ\text{C}$  en frasco de vidrio.

**D.15.7.7. Disolución patrón de ácido 2–Clorobenzoico (1 mg Cl<sup>-</sup> AOX/L).**

**D.15.7.7.1.** Pipetear 4 mL de la solución madre de ácido 2–Clorobenzoico (250 mg Cl<sup>-</sup> AOX/L) a un matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**D.15.7.7.2.** Esta solución de trabajo puede ser almacenada por una semana entre 2 a 8°C, en frasco de vidrio.

**D.15.7.7.3.** Gases de combustión, puede ser oxígeno (O<sub>2</sub>), o una mezcla de oxígeno y un gas inerte.

**D.15.7.8. Disolución de estándares internos.**

**D.15.7.8.1.** Preparar una serie de estándares en matraces volumétricos de 100 mL.

**D.15.7.8.2.** Considerar el rango de operación del instrumento, preparar un mínimo de cinco estándares a partir de cada solución patrón.

**D.15.7.8.3.** Preparar soluciones estándares nuevas el día que se van a usar.

**D.15.8. Calibración del equipo y material.**

**D.15.8.1.** Llevar un registro diario del comportamiento de operación de refrigeradores y congeladores.

**D.15.8.2.** En el caso de determinación microcoulométrica, verificar el instrumento diariamente dentro de su rango de trabajo, usando por lo menos una de las soluciones siguientes:

**D.15.8.2.1.** Con una jeringa, inyectar directamente un volumen a una concentración entre 50 y 80 µg/L de solución de HCl, 0.01 M en la celda de titulación.

**D.15.8.2.2.** Medir la cantidad de carga transferida en esta prueba.

**D.15.8.3.** Asumiendo teóricamente un 100% de transferencia electrónica. Obtener el factor de prueba *a*, utilizando la ecuación **D.15.8.3.1.**:

**Ecuación D.15.8.3.1.**

$$Q = a \times Q_t \dots \dots \dots (1)$$

En donde:

*Q* es la carga experimental, expresada en Coulomb (C), para la muestra de HCl;

*Q<sub>t</sub>* es la carga teórica, expresada en Coulomb (C), para la muestra de HCl, y

*a* es el factor de prueba.

Para obtener la carga teórica *Q<sub>t</sub>* se utilizará la siguiente ecuación

**Ecuación D.15.8.3.2**

$$Q_t = V \times c \times F \dots \dots \dots (2)$$

En donde:

*V* es el volumen expresado en litros de solución de HCl;

*c* es la concentración de cloruro expresado en moles por litro de la solución del HCl, y

*F* es la constante de Faraday (*F*=96 484.56 C/mol).

El instrumento de medida es adecuado, con factor de prueba *a*, en el rango de 0.97 a 1.03.

**D.15.9. Condiciones de prueba, medidas de seguridad y de control de calidad.**

**D.15.9.1.** Analizar un blanco de muestra y cinco soluciones estándar y compare los resultados.

**D.15.9.2.** Calcular con valores nominales.

**D.15.9.3.** Pruebe la correlación de los valores medidos, comparándolos con los valores nominales de AOX (por ciento de recuperación).

**D.15.9.4.** Los resultados son aceptables si el coeficiente de correlación es ≤ 0.999.

**D.15.9.5.** La varianza alta o por ciento de recuperación no lineal puede causar resultados insatisfactorios.

**D.15.9.6.** En las pruebas de los estándares el valor obtenido y el valor teórico no presentarán una desviación mayor al 10% (recuperación del 90% al 110%).

**D.15.10. Muestreo y pretratamiento de la muestra.**

**D.15.10.1.** En el sitio de muestreo se debe determinar cloro libre residual (oxidantes) los cuales se deben eliminar por adición de solución de sulfito de sodio.

**D.15.10.2.** Si se considera que están presentes compuestos halogenados orgánicos volátiles, como solventes clorados, se recomienda realizar el análisis dentro de las 24 h después del muestreo. No se puede dar un tiempo máximo de almacenamiento, dadas las circunstancias individuales las cuales dictarán los requerimientos.

**D.15.10.3.** En caso de sospecha de presencia de otros oxidantes, se determina su presencia por análisis de una alícuota, paralela a la muestra; agregando un par de cristales de yoduro de potasio y una vez disueltos se les adiciona una o dos gotas de solución de almidón. La generación de un color azul en la alícuota confirma la presencia de oxidantes. Se determina el volumen adecuado para la eliminación de los oxidantes, por prueba y error en alícuotas de la muestra.

**D.15.10.4.** Una vez determinada el volumen de sulfito de sodio necesario para eliminar la interferencia por oxidantes, se colecta la muestra, se adiciona el volumen proporcional de sulfito calculado y se acidifica con ácido nítrico de la siguiente manera:

**D.15.10.4.1.** Colecta de muestra en frasco de vidrio, dejando un espacio de aprox. 5% del volumen total, adicionar el volumen proporcional de sulfito de sodio, adicionar 2 mL de  $\text{HNO}_3$  por litro de muestra y llenar completamente el recipiente de la muestra para evitar burbujas de aire. Usualmente la cantidad de ácido adicionado es suficiente para bajar el  $\text{pH} < 2$ . Puede ser necesario adicionar más  $\text{HNO}_3$  para lograr este  $\text{pH}$ .

**D.15.10.4.2.** Analizar la muestra de agua tan pronto como sea posible después del muestreo, en presencia de algas, analizar después de 8 h del muestreo.

**B.7.10.4.3.** Si no es posible analizarla de inmediato y es necesario almacenarla, conservar la muestra acidificada a  $4^\circ\text{C}$ , o congelar.

**D.15.11. Procedimiento.**

**D.15.11.1.** Previo al análisis de muestras se recomienda determinar el límite de cuantificación a partir de la medición de una serie de blancos del método, como una estimación preliminar. El límite de cuantificación puede ser igualado al valor de nueve veces la desviación estándar de la media del blanco.

**D.15.11.2.** La muestra de prueba tomada para análisis deberá tener un valor dentro del rango óptimo de trabajo del instrumento, que es generalmente entre 1.0 y 300  $\mu\text{g/L}$ . Puede ser necesario verificar que el  $\text{pH}$  de la muestra sea  $< 2$  antes de iniciar el análisis.

**D.15.11.3.** Cuando sea necesaria la dilución no use menos de 5 mL de la muestra original. Anote el factor de la dilución (volumen final dividido entre el volumen original) y tomarlo en cuenta en el cálculo. Si el factor de dilución es mayor de 10 diluir por lo menos 2 veces.

**D.15.11.4. Homogenización**

**D.15.11.4.1.** Asegurar que la muestra es atemperada y homogenizada, por agitación o movimiento de la muestra en el frasco de muestreo, hasta que se observe una mezcla completa.

**D.15.12. Medición instrumental de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables.**

**D.15.12.1.** Inicializar el equipo, permitiendo el tiempo de estabilización recomendada por el fabricante, verificando la temperatura de purga ( $45 \pm 5^\circ\text{C}$ ), la temperatura de combustión ( $800 \pm 10^\circ\text{C}$ ), y el flujo de gas.

**D.15.12.2.** Verificar la calibración del instrumento, mediante la prueba de tres estándares preparados a partir de solución patrón de 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cl}^-/\text{L}$ , preferentemente con concentración de 0.5 1.0 o 1.5  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cl}^-/\text{L}$ . Considerando aceptable una desviación estándar menor a 5% y un coeficiente de correlación mayor a 0.99.

**D.15.12.3.** Tomar una muestra homogenizada de 100 mL. Analizando blancos preparados con solución de ácido nítrico diluido ( $\text{HNO}_3$ ) 0.02 M, y al menos tres testigos estándares, conjuntamente con las muestras.

**D.15.12.4.** Quitar el émbolo del inyector, y verter en su interior 10 mL de la muestra. Volviendo a colocar el émbolo y proceder a ejercer presión para eliminar burbujas dentro del inyector, mediante su expulsión por la válvula de purga. Asegurar el inyector al instrumento de purgado. Verificando que el instrumento esté en el modo de ce integración para orgánicos purgables. Inmediatamente después proceder a abrir la válvula e inyectar la muestra en la cámara.

**D.15.12.5.** Cerrar las válvulas y proceder al purgado durante 10 min.

**D.15.12.6.** Una vez concluida la integración, abrir las válvulas del inyector y proceder a drenar la muestra.

**D.15.12.7.** Registrar la lectura del instrumento.

**D.15.12.8.** Enjuagar perfectamente el inyector y cámara de purgado entre cada muestra a analizar.

**D.15.12.9.** Medición instrumental de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos.

**D.15.12.10.** Inicializar el equipo, permitiendo el tiempo de estabilización recomendada por el fabricante, verificando temperatura de combustión y flujo de gas.

**D.15.12.11.** Tomar una muestra homogenizada de 100 mL. Analizando blancos preparados con solución de ácido nítrico diluido (HNO<sub>3</sub>) 0.02 M, y al menos tres testigos estándares, conjuntamente con las muestras.

**D.15.12.12.** Adicionar 5 mL de la solución madre de nitratos a cada una de las muestras, estándares y blanco.

**D.15.12.13.** Procediendo a inyectar la serie de muestras, patrones y blanco de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

**D.15.12.14.** Registrar la lectura del instrumento.

**D.15.12.15.** Al inicio de las determinaciones y después de una serie de 10 muestras, realizar lavado de las columnas por adición de 25 mL de solución de lavado de nitratos, verificando que la velocidad de flujo de muestra sea de 3 mL/min.

### **D.15.13. Expresión de los resultados.**

#### **D.15.13.1. Cálculos.**

Algunos instrumentos cuentan con programas para el cálculo de la concentración de los compuestos halogenados adsorbibles, considerando los valores de los estándares preparados. En caso contrario calcular la concentración de los compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX) utilizando la siguiente ecuación:

#### **Ecuación D.15.13.1.**

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \text{AOX} = \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \text{AOX}(\text{muestra}) - \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \text{AOX}(\text{blanco}) = \frac{[(Q_s - Q_o)M] \times 1000}{(V \times F)}$$

En donde:

$\mu\text{g/L}$  AOX es la concentración de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles, expresados como  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cl}^-/\text{L}$ ;

$Q_s$  es la lectura del instrumento en Coulomb de la muestra;

$Q_o$  es la lectura del instrumento en Coulomb del blanco;

$M$  es la masa molecular del  $\text{Cl}^-$ ;

$V$  es el volumen de muestra en mL, y

$F$  es la constante de Faraday ( $F=96\,484,56$  C/mol).

### **D.15.14. Informe de prueba.**

#### **D.15.14.1.** Informar como:

mg de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos por L de solución (mg COAF/L).

mg de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables por L de solución (mg COHAP/L).

### **D.16. Método para la determinación de Carbono Orgánico Purgable.**

#### **D.16.1. Fundamento.**

El carbono orgánico presente en agua es oxidado a bióxido de carbono mediante combustión, ya sea por oxidación química, radiación ultravioleta o radiación de alta energía. Una vez transformado en bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) éste es cuantificado por uno de los diversos instrumentos existentes; como son: Espectrometría infrarroja, Coulometría, electrodos de ion selectivo, etc.

En muestras en que la concentración de carbono inorgánico es menor al carbono orgánico, éste se calcula restando el carbono total determinado, menos el carbono inorgánico total purgado. En caso contrario, la eliminación de la interferencia por carbón inorgánico, puede llevarse a cabo mediante acidificación de la muestra a pH < 2 para transformar el carbono inorgánico a CO<sub>2</sub>. Posteriormente el CO<sub>2</sub> producido es purgado.

Durante la purga, el benceno, tolueno, ciclohexano y cloroformo son arrastrados junto a CO<sub>2</sub>, por lo que es conveniente, ante la presencia de estos compuestos orgánico, determinarlos previamente.

**D.16.2. Aparatos e instrumentos.**

Se deberá llevar un registro diario del comportamiento de operación de refrigeradores y congeladores.

Los analizadores y potenciómetros se calibrarán previamente a su utilización.

**D.16.2.1.** Equipo de filtración;

**D.16.2.2.** pH-metro;

**D.16.2.3.** Agitador magnético, y

**D.16.2.4.** Instrumento analizador de carbono orgánico total.

**D.16.3. Material.**

**D.16.3.1.** Perillas para pipetas;

**D.16.3.2.** Lentes protectores;

**D.16.3.3.** Guantes estériles;

**D.16.3.4.** Microjeringas; 0 a 50 µL, 0 a 250 µL y 0 a 1 mL, y

**D.16.3.5.** Frascos ámbar de 1 L, con boca ancha y tapa con sello TFE.

**D.16.4. Reactivos y soluciones.**

**D.16.4.1.** Agua destilada: exenta de CO<sub>2</sub>, se puede preparar por filtración en carbón activado o llevándola a ebullición;

**D.16.4.2.** Ácido fosforoso (H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>);

**D.16.4.3.** Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y

**D.16.4.4.** Solución patrón de carbono orgánico.

Pesar 2.1254 g de ftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>) grado patrón primario y disolver en agua bidestilada exenta de CO<sub>2</sub>, aforando a 1 L.

La solución preparada se puede preservar adicionando; H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, hasta un pH < 2

**D.16.5. Toma de muestra.**

**D.16.5.1.** La muestra se colectará en frascos de vidrio ámbar de 1 L de capacidad mínima, previamente lavados con ácido, cubiertos con papel aluminio y esterilizados a 400°C por al menos 1 h. La tapa del frasco, con sello de TFE, se debe lavar con detergente, enjuagándolo al menos tres veces con agua exenta de carbono orgánico, envolver en papel aluminio y esterilizada a 100°C durante 1 h. Preferentemente utilizar tapas tipo septum.

**D.16.5.2.** Colectar la muestra, teniendo el cuidado de su representatividad, ante la presencia de sustancias no disueltas y llenando el frasco hasta el ras una vez que se le adicione el ácido. Una vez tapado el frasco se debe verificar no dejar burbujas de aire en el interior.

**D.16.5.3.** Manteniendo la muestra entre 2°C y 8°C hasta su recepción en el laboratorio. En caso de no poder ser analizada de inmediato, o ante la presencia de actividad biológica, preservar con H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, adicionando hasta lograr un pH < 2.

**D.16.6. Procedimiento.**

**D.16.6.1.** Se inicializa el instrumento de acuerdo a las especificaciones del fabricante, hasta lograr la estabilización.

**D.16.6.2.** Se prepara la muestra o serie de muestras en conjunto con un mínimo de tres patrones, preparados en concentraciones entre los límites de determinación del procedimiento establecido en el laboratorio y blanco de método. Las muestras deberán estar perfectamente homogenizadas, para evitar taponamientos en las jeringas del automuestreador.

**D.16.6.3.** Cuando se requiera determinar el carbono orgánico disuelto, se inicia filtrando la muestra a través de filtro de fibra de vidrio con poro de 0.45 µm. Los cuales deberán ser previamente acondicionados, sumergiéndolos por al menos 12 h en solución HNO<sub>3</sub> 50%. Utilizando un filtro y soporte de filtro limpios por cada muestra.

**D.16.6.4. Inyección de la muestra.**

Utilizando una jeringa de acuerdo a las especificaciones del fabricante del equipo analizador, seleccionar el diámetro de la aguja o puntilla de acuerdo con las características del material suspendido en la muestra. Utilizando agitador magnético, para una correcta homogenización, e inyectar la muestra en el equipo,

anotando la lectura como dato preliminar, repetir la inyección, hasta que la reproducibilidad de la lectura esté dentro de  $\pm 10\%$ , tomando el último dato como lectura final. En cada corrida de muestras incluir al menos tres patrones de concentración dentro del rango de trabajo.

#### **D.16.6.5. Preparación de la curva de calibración.**

Preparar un mínimo de siete patrones, en concentraciones entre 0 y 4 mg/L, utilizando la solución patrón de biftalato de potasio, considerando en todo momento el blanco de método (blanco de agua destilada) como la lectura blanco, la cual se restará a la lectura de cada patrón. Calculando a partir de ellos la curva de calibración.

En el caso de equipo automatizado, los ajustes por blanco, son calculados por el software.

#### **D.16.7. Medidas de control de calidad.**

**D.16.7.1.** Para demostrar adecuadamente la aptitud técnica del analista se deberán realizar un mínimo de 10 repeticiones, de muestras pareadas, en dos diferentes diluciones, con alícuotas de muestra.

**D.16.7.2.** Se considera aceptable el desempeño del analista, demostrando como máximo, recobro entre 90 y 110% y desviación estándar de 10%.

#### **D.17. Método para la determinación de THM.**

##### **D.17.1. Principio.**

Los THM son extraídos de la muestra con pentano, el extracto obtenido es inyectado en un cromatógrafo de gases equipado con un detector de captura de electrones para separación y análisis. Los THM se refieren a los compuestos bromoformo, bromodichlorometano, dibromoclorometano y cloroformo que pueden ser encontrados como subproductos de aguas que han sido cloradas.

##### **D.17.2. Interferencias.**

**D.17.2.1.** Impurezas contenidas en el solvente de extracción usualmente provocan problemas analíticos. Por ello se hace necesario analizar blancos de solventes cada que se use un frasco nuevo. Se deben descartar solventes que tengan niveles de THM mayores de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

**D.17.2.2.** Niveles bajos de interferencia pueden ser eliminados por destilación o cromatografía en columna.

**D.17.2.3.** Un solvente se considera libre de interferencias si contiene menos de 0.4  $\mu\text{g/mL}$  de triclorometano de forma individual.

##### **D.17.3. Equipo.**

**17.3.1** Cromatógrafo de gases, de preferencia con temperatura programable, sistema de enfriamiento del horno de columna e inyector con camisa de cuarzo tipo septum, equipado con detector de captura de electrones.

##### **D.17.4. Material.**

**D.17.4.1.** Frascos y matraces con tapón de rosca con interior recubierto de PTFE;

**D.17.4.2.** Microjeringas de 1  $\mu\text{L}$  ;

**D.17.4.3.** Microjeringas de 10 a 100  $\mu\text{L}$ ;

**D.17.4.4.** Microjeringas de 25  $\mu\text{L}$ ;

**D.17.4.5.** Jeringas hipodérmicas de vidrio de 10 mL;

**D.17.4.6.** Válvula para jeringa tipo Luer de dos pasos;

**D.17.4.7.** Columna cromatográfica. Puede emplearse cualquiera de las que a continuación se indican:

**D.17.4.7.1.** Columna 1. Columna de vidrio de 2 m de longitud y 4 mm de diámetro interno, empacada con 3% de SP-1000 en Supelcort (malla 100/120);

**D.17.4.7.2.** Columna 2. Columna de vidrio de 2 m de longitud y 4 mm de diámetro interno, empacada con 10% de escualeno en Chromosorb WAW (malla 100/120);

**D.17.4.7.3.** Columna 3. Columna de vidrio de 2 m de longitud y 2 mm de diámetro interno, empacada con 6% OV-11 y 4% SP-2100 en Supelcort (malla 100/120), y

**D.17.4.7.4.** Columna 4. Columna capilar de sílica fundida DB-624 o equivalente, con dimensiones de 30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro interno, espesor de película de 3  $\mu\text{m}$ .

**D.17.5. Reactivos.****D.17.5.1.** Pentano grado análisis orgánico de trazas (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>);**D.17.5.2.** Metanol grado análisis orgánico de trazas (CH<sub>4</sub>O);**D.17.5.3.** Carbón activado;**D.17.5.4.** Bromoformo pureza mayor a 98% (CHBr<sub>3</sub>);**D.17.5.5.** Bromodiclorometano pureza mayor a 97% (CHBrCl<sub>2</sub>);**D.17.5.6.** Dibromoclorometano pureza mayor a 98% (CHBr<sub>2</sub>Cl);**D.17.5.7.** Cloroformo pureza mínimo del 99.8% (CHCl<sub>3</sub>);**D.17.5.8.** Helio grado cromatográfico;**D.17.5.9.** Argón con 5% de metano grado cromatográfico;**D.17.5.10.** Agua libre de THM;

**D.17.5.11.** Preparar pasando agua desionizada a través de un filtro conteniendo carbón activado o hirviendo agua y purgándola con un gas inerte por una 1 h manteniendo la temperatura a 90°C. Conservar en frascos con tapa de rosca con el interior recubierto de PTFE;

**D.17.5.12.** Soluciones madre de THM individuales;

**D.17.5.13.** Colocar 9.8 mL de metanol en un matraz volumétrico de 10 mL. Dejar en reposo aproximadamente 10 min o hasta que todas las paredes humedecidas con el alcohol estén secas. Pesar con una precisión de 0.1 mg. Utilizando una jeringa de 100 µL, adicionar inmediatamente de 2–3 gotas del trihalometano y volver a pesar, y

**D.17.5.14.** Asegurarse que el trihalometano cae directamente en el alcohol sin tener contacto con el cuello del matraz. Diluir al volumen y mezclar. Transferir la solución madre a un recipiente de 15 mL con tapón de rosca y recubierto en su interior con PTFE. Efectuar la misma operación con los cuatro THM en forma individual. Calcular la concentración en µg/mL a partir de la diferencia de peso registrada. Las soluciones son estables durante 4 semanas almacenadas a 4°C.

Precaución: Los THM son tóxicos, preparar las soluciones en una campana de extracción y utilizar mascarilla apropiada.

**D.17.6. Procedimiento.****D.17.6.1. Preparación de las curvas de calibración.**

**D.17.6.1.1.** De acuerdo con la concentración calculada para cada solución madre de THM, preparar tres diluciones de cada uno, de tal forma que cubran el intervalo de concentración de las muestras.

**D.17.6.2. Extracción de THM.**

**D.17.6.2.1.** Quitar los émbolos de las jeringas hipodérmicas y sujetar a una válvula tipo Luer.

**D.17.6.2.2.** Abrir la botella que contiene la muestra. Si ningún agente reductor ha sido adicionado, colocar directamente 1 mg del mismo en el matraz de extracción.

**D.17.6.2.3.** Verter la muestra al depósito de la jeringa. Colocar el émbolo y comprimir la muestra. Abrir la válvula de la jeringa y ventilar algún residuo de aire mientras se ajusta el volumen de muestra a 10 mL. Cerrar la válvula.

**D.17.6.2.4.** Medir 2 mL de pentano en otro matraz de extracción e inyectar con mucho cuidado la muestra contenida en la jeringa. Tapar y agitar vigorosamente durante 1 min. Dejar separar las fases. Centrifugar si es necesario.

**D.17.6.2.5.** Inyectar la fase orgánica al cromatógrafo.

**D.17.6.3. Acondicionamiento del equipo.**

**D.17.6.3.1.** Fijar los parámetros cromatográficos indicados (véase tabla D.17.1.) de acuerdo con el manual de operación y al tipo de columna utilizada:

**Tabla D.17.1.- Condiciones Cromatográficas**

Columna	Parámetros
---------	------------

	Gas acarreador	Flujo del gas acarreador	Temperatura del horno de la columna
1	Argón con 5% de metano	60 mL/min	50°C
2	Argón con 5% de metano	25 mL/min	67°C
3	Argón con 5% de metano	25 mL/min	45°C por 12 min y 1°C/min a 70°C
4	Helio	75 mL/min	5°C por 2 min y 5°C/min a 200°C

**D.17 6.3.2.** Asimismo fijar los parámetros correspondientes (temperatura y voltaje) para el detector de captura de electrones.

**D.17.7. Acondicionamiento del método.**

**D.17.7.1.** Inyectar 3 µL para columna de vidrio y 1 µL para columna capilar de cada solución patrón de THM de menor a mayor concentración.

**D.17.7.2.** Obtener los cromatogramas correspondientes.

**D.17.7.3.** Elaborar una curva de calibración para cada trihalometano, graficando el área obtenida del pico para cada solución patrón en función de su concentración (µg de THM/L).

**D.17.7.4** Ajustar la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Calcular la pendiente, el coeficiente de correlación y la ordenada al origen. Obtener la ecuación de la recta.

**D.17.7.5.** Inyectar del mismo modo 3 o 1 µL de muestra y blanco de muestras. Obtener los cromatogramas, identificar los picos correspondientes a cada THM en función de su tiempo de retención. Calcular el área del pico.

**D.17.7.6.** En caso de ser necesario diluir las muestras con pentanol, para llevar al intervalo de trabajo (factor de dilución).

**D.17.7.7.** Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente en los cuales sólo es necesario leer los patrones y marcar su concentración teórica.

**D.17.8. Expresión de los resultados.**

**D.17.8.1 Cálculos.**

De la ecuación de la recta obtenida:

$$y = mx + b$$

En donde:

$y$  es el área del pico correspondiente a cada THM;

$m$  es la pendiente;

$x$  es la concentración en µg de cada THM/L de la muestra, y

$b$  es la ordenada al origen.

Despejar  $x$ , para obtener directamente la concentración de µg de THM/L en la muestra. Multiplicar por el factor de dilución utilizado. Sumar la concentración de los THM detectados.

En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida es directamente la concentración del compuesto en µg/L

La suma de la concentración de µg de THM/L, considerando la dilución, son los THM totales.

**D.18. Método para la determinación de formaldehído total por cromatografía de líquidos**

**D.18.1. Fundamento.**

El formaldehído presente en la muestra es derivatizado con 2,4-dinitrofenilhidracina en medio ácido y extraído con cloroformo. Después que el solvente es intercambiado por metanol, el producto es separado y cuantificado usando fase reversa y detección UV a 365 nm.

**D.18.2. Equipo.**

- D.18.2.1.** Sistema de cromatógrafo de líquidos;
- D.18.2.2.** Sistema desgasificador por Helio, membrana de vacío o ultrasonido;
- D.18.2.3.** Sistema de bombas capaz de desarrollar un flujo de 1 mL/min;
- D.18.2.4.** Inyector tipo jeringa (intervalo de 1-25 µL) o loop de 25 µL;
- D.18.2.5** Detector de arreglo de diodos o UV-Visible capaz de medir a 365 nm;
- D.18.2.6.** Sistema de datos: graficador, integrador o computadora compatible con la salida de voltaje del detector;
- D.18.2.7.** Columna Octadecilsilanos (C<sub>18</sub> u ODS), dimensiones de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 7 µm, y

**D.18.2.8.** Evaporador rotatorio.

**D.18.3. Material.**

**D.18.3.1.** Material común de laboratorio (probetas, vasos de precipitados, matraces y pipetas).

**D.18.4. Reactivos y soluciones.**

**D.18.4.1.** Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>);

**D.18.4.2.** Metanol grado CLAR (CH<sub>4</sub>O);

**D.18.4.3.** Agua grado CLAR (H<sub>2</sub>O);

**D.18.4.4.** Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>);

**D.18.4.5.** HCl;

**D.18.4.6.** 2,4–Dinitrofenilhidracina (DNPH);

**D.18.4.7.** Formaldehído en solución al 37% (CH<sub>2</sub>O);

**D.18.4.8.** Indicador de timolftaleína grado ACS. Intervalo de viraje de pH 9.0 a 9.5 (incoloro–azul);

**D.18.4.9.** Sulfito de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>);

**D.18.4.10.** HCl 0.100 N, 1 N, 2 N y 12 N, y

**D.18.4.11.** Determinar la concentración exacta del HCl 0.100 N usando procedimiento de titulación.

**D.18.4.12. Solución de 2,4–Dinitrofenilhidracina (DNPH).**

Saturar 1 L de HCl 2 N con DNPH (solubilidad aproximada de 300 mg/L).

**D.18.4.13. Solución stock de formaldehído aproximadamente de 4 mg/L.**

**D.18.4.13.1.** Medir 5 mL de formaldehído al 37% en un matraz volumétrico de 500 mL y llevar al volumen con agua. Calentar la solución a aproximadamente 30°C para disolver completamente la formalina y enfriar a temperatura ambiente.

**D.18.4.13.2. Valoración de la solución.**

**D.18.4.13.2.1.** Medir 125 mL de solución de sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) 1 M en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 3 gotas del indicador de timolftaleína. La solución debe ser de un color azul pálido. Añadir HCl 0.1 N gota a gota hasta que la solución se vuelve incolora (usualmente se requieren de 2–5 gotas). Adicionar exactamente 25 mL de solución stock de formaldehído a la solución acidificada de sulfito de sodio. Titular con HCl 0.1 N hasta la desaparición de la coloración que persista 3 min.

**D.18.4.13.2.2.** Efectuar 3 titulaciones y calcular el valor promedio.

**D.18.4.13.2.3.** Calcular la concentración exacta de formaldehído aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{mg CH}_2\text{O/mL} = \frac{\{[\text{mL gastados de HCl } 0.1 \text{ N} \times \text{HCl } N \times 30.03]\}}{25 \text{ mL}}$$

**D.18.4.14. Solución de sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)1 M.**

Disolver 63.02 g de sulfito de sodio en 500 mL de agua.

**D.18.4.15. Solución indicadora.**

**D.18.4.15.1.** Disolver 40 mg de indicador de timolftaleína en 40 mL de etanol.

**D.18.4.15.2.** Solución patrón derivatizada de formaldehído de 50 mg/L.

**D.18.4.15.3.** De acuerdo con la concentración calculada de la solución stock, medir un volumen equivalente a 2.5 mg de formaldehído

**D.18.5. Procedimiento.****D.18.5.1. Preparación de la curva patrón.**

Medir los siguientes volúmenes de solución patrón de formaldehído (véase tabla D.18.1.) en matraces volumétricos de 50 mL. Llevar al volumen con metanol. Filtrar a través de un filtro de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

**Tabla D.18.1.-Curva de calibración de Formaldehído.**

Volumen de solución patrón de formaldehído (mL)	Concentración (mg de $\text{CH}_2\text{O/L}$ )	Volumen de aforo con metanol (mL)
0.00	Blanco	50
0.25	0.25	50
0.50	0.50	50
1.00	1.00	50
2.50	2.50	50
5.00	5.00	50

**D.18.5.2. Preparación de las muestras.**

**D.18.5.2.1.** Medir 60 mL de muestra y agua destilada (blanco de muestras) en un embudo de separación. Adicionar 165 mL de HCl 12 N y 300 mg de dinitrofenilhidracina (DNPH). Agitar por varios minutos.

**D.18.5.2.2.** Extraer dos veces con porciones de 50 mL de cloroformo. Dejar separar las fases y descartar la fase acuosa.

**D.18.5.2.3.** Lavar la fase clorofórmica, dos veces con porciones de 50 mL de HCl 1 N y una vez con 100 mL de agua. Descartar la fase acuosa.

**D.18.5.2.4.** Evaporar el cloroformo casi a sequedad. Diluir el residuo a un volumen de 25 mL con metanol. Filtrar a través de filtro con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

**D.18.5.3. Acondicionamiento del equipo.**

**D.18.5.3.1.** Fijar los siguientes parámetros cromatográficos de acuerdo con el manual de operación:

**D.18.5.3.1.1.** Flujo: 1 mL/min.

**D.18.5.3.1.2.** Fase móvil: Metanol 70% Agua 30%.

**D.18.5.3.1.3.** Longitud de onda: UV a 365 nm.

**D.18.5.3.1.4.** Velocidad del integrador o software en sistemas automatizados.

**D.18.5.3.1.5.** Bombear fase móvil a través del sistema del cromatógrafo hasta la obtención de una línea base estable.

**D.18.5.4. Acondicionamiento del método.**

**D.18.5.4.1.** Inyectar 25  $\mu\text{L}$  de cada solución patrón de menor a mayor concentración.

**D.18.5.4.2.** Obtener los cromatogramas correspondientes. El pico que corresponde al formaldehído derivatizado eluye a un tiempo aproximado de 8 min bajo las condiciones de este método.

**D.18.5.4.3.** Elaborar una curva de calibración, graficando el área obtenida del pico para cada solución patrón en función de su concentración (mg de  $\text{CH}_2\text{O/L}$ ).

**D.18.5.4.4.** Ajustar la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Calcular la pendiente, el coeficiente de correlación y la ordenada al origen. Obtener la ecuación de la recta.

**D.18.5.4.5.** Inyectar del mismo modo que se inyectó la solución patrón, para 25 µL de muestra y blanco de muestras. Obtener los cromatogramas, identificar el pico correspondiente al formaldehído derivatizado en función de su tiempo de retención. Calcular el área del pico.

**D.18.5.4.6.** En caso de ser necesario diluir las muestras con metanol, para llevar al intervalo de trabajo (factor de dilución).

**D.18.5.4.7.** Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente en los cuales sólo es necesario leer los patrones y marcar su concentración teórica.

#### **D.18.6. Expresión de los resultados.**

##### **D.18.6.1. Cálculos.**

De la ecuación de la recta obtenida:

$$y = mx + b$$

En donde:

$y$  es el área del pico correspondiente al formaldehído derivatizado en la muestra;

$m$  es la pendiente;

$x$  es la concentración, mg de formaldehído /L en la muestra, y

$b$  es la ordenada al origen.

Despejar  $x$  para obtener la concentración, mg de formaldehído/L en la muestra.

$$\text{mg de CH}_2\text{O /L} = (A - B) \times F.D.$$

En donde:

$A$  es la concentración, mg de CH<sub>2</sub>O/L en la muestra;

$B$  es la concentración, mg de CH<sub>2</sub>O/L en el blanco de muestras, y

F.D. es el Factor de dilución.

#### **D.18.7. Informe de prueba.**

**D.18.7.1.** Informar como:

mg de formaldehído/L.

#### **D.19. Método potenciométrico para la determinación de Fluoruros.**

##### **D.19.1. Principio.**

El ion fluoruro es determinado potenciométricamente usando un electrodo de ion selectivo para fluoruros, en combinación con un electrodo de referencia o combinado.

##### **D.19.2. Equipo.**

**D.19.2.1.** Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg calibrada y verificada;

**D.19.2.2.** Potenciómetro con escala expandida en milivoltios o analizador de ion específico o bien un electrodo combinado;

**D.19.2.3.** Electrodo específico de flúor (combinado o simple);

**D.19.2.4.** Electrodo de referencia (cuando no se cuenta con electrodo de flúor combinado), y

**D.19.2.5.** Agitador magnético.

##### **D.19.3. Material.**

Se recomienda que el material sea de Nalgene;

**D.19.3.1.** Vasos de precipitados de 25 o 50 mL;

**D.19.3.2.** Vasos de precipitados de 1000 mL;

**D.19.3.3.** Matrazes volumétricos de 100, 500 y 1000 mL;

**D.19.3.4.** Bureta de 50 mL graduada en 0.1 mL;

**D.19.3.5.** Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 20 mL, y

**D.19.3.6.** Barra magnética.

**D.19.4. Reactivos y soluciones.**

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

**D.19.4.1.** Ácido acético glacial ( $C_2H_4O_2$ );

**D.19.4.2.** Ácido 1,2 ciclohexilendiaminotetracético (CDTA);

**D.19.4.3.** Hidróxido de sodio (NaOH) 6 N;

**D.19.4.4.** Disolver 120 g de hidróxido de sodio en agua y llevar a un volumen de 500 mL;

**D.19.4.5.** Cloruro de sodio (NaCl), y

**D.19.4.6.** Fluoruro de sodio anhidro (NaF).

**D.19.4.7. Solución madre de fluoruros de 100 mg de  $F^-/L$ .**

Disolver 221.0 mg de NaF en agua destilada y llevar a un volumen de 1 L.

**D.19.4.8. Solución patrón de fluoruros de 10 mg de  $F^-/L$ .**

Medir 10 mL de solución madre y llevar a un volumen de 100 mL.

**D.19.4.9. Solución amortiguadora (TISAB II)**

Colocar aproximadamente 500 mL de agua en un vaso de 1 L. Añadir 57 mL de ácido acético glacial, 58 g de NaCl y 4.0 g de CDTA. Agitar para disolver. Colocar el vaso en baño de agua fría y ajustar el pH de la solución entre 5.0 y 5.5 adicionando lentamente NaOH 6N (aproximadamente 125 mL) con agitación. Trasvasar a un matraz volumétrico de 1 L y llevar al volumen con agua. Puede obtenerse preparado comercialmente.

**D.19.5. Procedimiento.**

**D.19.5.1. Preparación de la curva de calibración.**

Medir los siguientes volúmenes de solución patrón de fluoruros (10 mg  $F^-/L$ ) midiendo con bureta de (Véase tabla D.19.1.) en matraces volumétricos de 100 mL y llevar al volumen con agua.

**Tabla D.19.1. Curva de calibración de Fluoruro**

Volumen de solución patrón de fluoruros de 10 mg de $F^-/L$ (mL)	Concentración (mg de $F^-/L$ )	Volumen de aforo (mL)
0.1	0.01	100
1.0	0.10	100
10.0	1.0	100
50.0	5.0	100
100.0	10.0	100

**D.19.5.2.** Calibrar el potenciómetro de acuerdo al manual de operación y ajustar la temperatura, de preferencia a temperatura ambiente. En el caso de tomar lecturas en RMV, calibrar el aparato con solución de 1  $\mu$ g de flúor (sin solución amortiguadora y registrar en el aparato una lectura de 100 RMV).

**D.19.5.3.** Tomar 10 mL (con pipeta volumétrica) de cada una de las concentraciones de la curva y colocarlas en vasos de precipitados de 30 mL (nalgene), y adicionar a cada uno 10 mL de la solución amortiguadora.

**D.19.5.4.** Mezclar cada solución con agitador magnético. Sumergir los electrodos y dejar que se estabilicen por lo menos 3 min, o esperar la indicación del aparato, antes de efectuar la lectura en RMV o mg/kg. Mantener la agitación durante la lectura.

**D.19.5.5.** Aplicar el mismo procedimiento para las muestras.

**D.19.6. Cálculos.**

1) Cuando se utiliza un potenciómetro con escala en milivolts.

$$\text{mg de F}^{-}/\text{L es el antilogaritmo } (mx + b);$$
$$\text{mg de F}^{-}/\text{L es el antilogaritmo } [m(\text{RMV}) + b];$$

En donde:

Antilogaritmo base 10;

m y b son constantes obtenidas en el ajuste con mínimos cuadrados, y

RMV son los milivolts relativos (para muestras y patrones de la curva).

**D.19.7. Informe de prueba.**

Informar como: mg de F<sup>-</sup> /L.

**D.20. Método de Flujo Segmentado mediante digestión UV y destilación para la determinación de Cianuros.**

**D.20.1. Medidas precautorias en el manejo de cianuros.**

**D.20.1.1.** Las sales de cianuro se descomponen en contacto con agua, humedad, carbonatos alcalinos y ácidos produciendo cianuro de hidrógeno.

**D.20.1.2.** La mezcla de cianuros metálicos con cloratos, percloratos, nitratos o nitritos metálicos, causa explosiones violentas.

**D.20.1.3.** Riesgos:

**D.20.1.4.** En presencia de agua, CO<sub>2</sub> y disoluciones ácidas, se genera HCN el cual es inflamable.

**D.20.1.5.** El HCN es tóxico y puede ser fatal si se absorbe a través de la piel, se ingiere o se inhala.

**D.20.1.6.** La absorción de 50 a 100 mg de cianuros en una sola dosis puede causar un colapso inmediato, cesando la respiración.

**D.20.1.7.** Realizar la determinación en área específica con campana extractora de gases.

**D.20.1.8.** Utilizar un respirador con filtro o mascarilla con filtro adecuado.

**D.20.1.9.** Utilizar guantes y protectores de mangas.

**D.20.1.10.** Lentes de seguridad ajustados y careta.

**D.20.1.11.** Traje de protección y zapatos cerrados.

**D.20.1.12.** En caso de derrames o fugas:

**D.20.1.13.** Regadera de seguridad y lavaojos.

**D.20.1.14.** Traje de protección completo incluyendo equipo autónomo de respiración.

**D.20.1.15.** Evacuar la zona de peligro. Limpiar la sustancia derramada e introducirla en un recipiente hermético y confinar en un lugar seguro. NUNCA poner en contacto directo con el agua.

**D.20.1.16.** En caso de incendio y explosión:

**D.20.1.17.** Utilizar polvo químico alcalino. No utilizar agua, espuma y CO<sub>2</sub>.

**D.20.2. Fundamento.**

Los cianuros son liberados como HCN, por reflujo de la muestra con un ácido fuerte. El HCN se absorbe en una disolución de NaOH. El ión cianuro en la disolución absorbente se hace reaccionar con cloramina T a un pH menor de 8, para formar el cloruro de cianógeno. Después de que la reacción termine, se adiciona el reactivo de ácido piridin barbitúrico formando un compuesto colorido que es medido espectrométricamente a una longitud de onda de 570 nm. La determinación se realiza mediante destilación por digestión UV y análisis por flujo segmentado.

**D.20.3. Interferencias.**

**D.20.3.1.** La mayoría de las interferencias se reducen o eliminan por destilación antes de la formación de color.

**D.20.3.2.** Los tiocianatos se descomponen a cianuro por radiación UV produciendo una interferencia positiva.

**D.20.3.3.** Se deben eliminar de la muestra sulfuros y agentes oxidantes.

**D.20.4. Equipo.**

**D.20.4.1.** Equipo para análisis por flujo segmentado. (Véase figura D.20.1.);

**D.20.4.2.** Bomba peristáltica multicanal;

**D.20.4.3.** Automuestreador acceso directo o aleatorio;

**D.20.4.4.** Detector con longitud de onda a 570 nm;

**D.20.4.5.** Digestor UV;

**D.20.4.6.** Cartucho de destilación para cianuros en línea;

**D.20.4.7.** Cartucho reactor específico para prueba de cianuros;

**D.20.4.8.** Baño criogénico con bomba de recirculación;

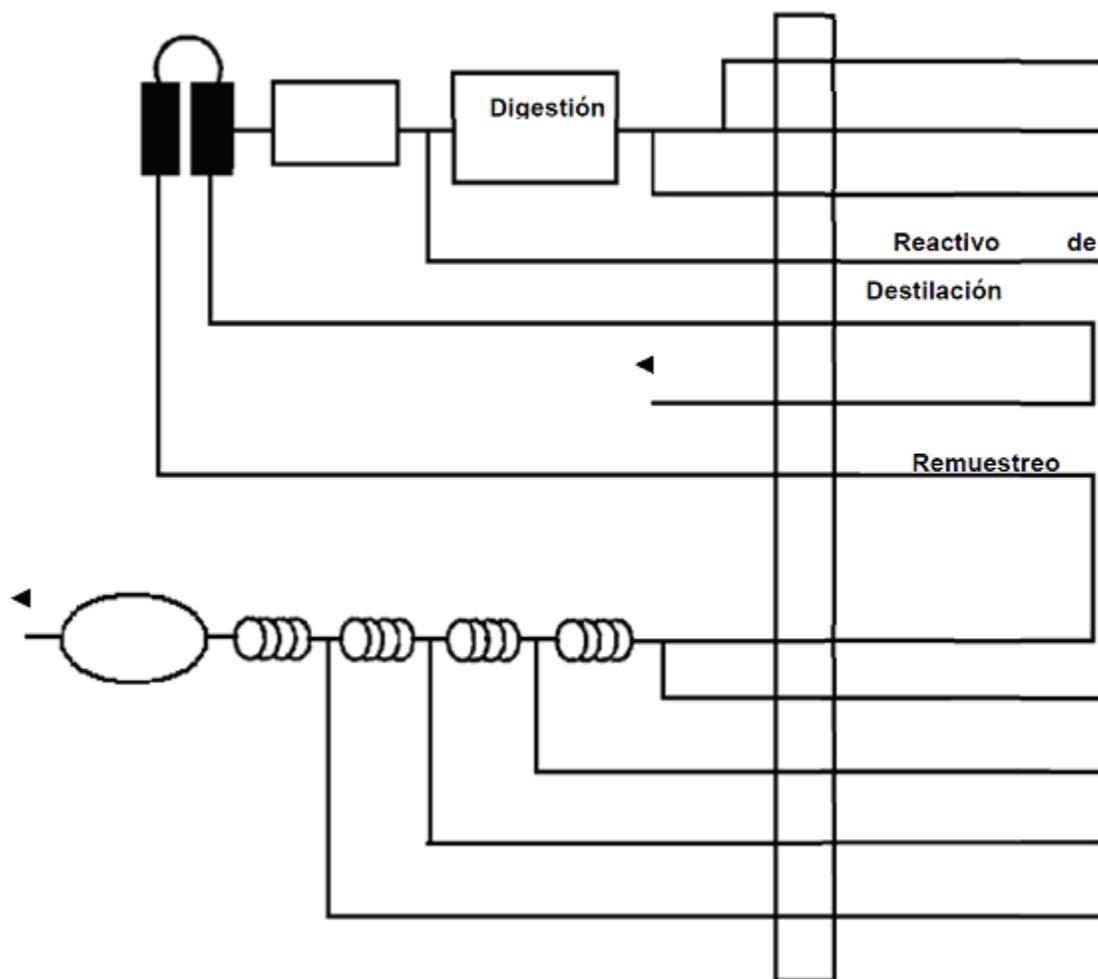
**D.20.4.9.** Equipo de muestras, bote de muestra frascos ámbar con PTFE;

**D.20.4.10.** Balanza analítica con precisión de 0.1 mg, calibrada y verificada;

**D.20.4.11.** Balanza granataria con precisión de 0.1 g, calibrada y/o verificada;

**D.20.4.12.** Potenciómetro verificado

**D.20.4.13.** Agitador tipo vórtex;

**Figura D.20.1. Módulo de Destilación.**

El material debe lavarse con detergente y agua, enjuagarse 2 veces con agua desionizada y secarse entre 110 a 150°C durante 1 h.

No someter a secado térmico el material volumétrico.

**D.20.4.14.** Tubos vial de teflón para automuestreador;

**D.20.4.15.** Gradillas para tubos;

**D.20.4.16.** Papel filtro No. 41, de 185 mm de diámetro;

**D.20.4.17.** Papel filtro No. 1, de 185 mm de diámetro;

**D.20.4.18.** Vasos de precipitado de 1000 mL de plástico;

**D.20.4.19.** Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 500 mL;

**D.20.4.20.** Perillas;

**D.20.4.21.** Pipetas Pasteur;

**D.20.4.22.** Micro bureta de 10 mL graduada en 0.1 mL;

**D.20.4.23.** Matraces Erlenmeyer de 500, 1000, 2000 y 3000 mL;

**D.20.4.24.** Matraces volumétricos de 100 mL, 500 mL, 1000 mL;

**D.20.4.25.** Contenedores de plástico;

**D.20.4.26.** Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 20 mL o micropipeta automática calibrada y/o verificada;

**D.20.4.27.** Barra magnética recubierta con teflón, y

**D.20.4.28.** Papel adsorbente.

**D.20.5. Reactivos y soluciones.**

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación.

Filtrar y desgasificar todos los reactivos antes de su uso.

**D.20.5.1.** Ácido barbitúrico ( $C_4H_4N_2O_3$ ).

**D.20.5.2.** Cloramina T trihidratada ( $C_7H_7SO_2NNaCl \cdot 3H_2O$ ).

**D.20.5.3.** Agua desionizada (Tipo I).

**D.20.5.4.** Dowfax 2AI.

**D.20.5.5.** HCl.

**D.20.5.6.** Ácido hipofosfórico 50% p/v ( $H_3PO_2$ ).

**D.20.5.7.** Ácido fosfórico concentrado ( $H_3PO_4$ ).

**D.20.5.8.** Cianuro de potasio (KCN), o disolución patrón de cianuro trazable a patrones nacionales o internacionales.

**D.20.5.9.** Fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ ).

**D.20.5.10.** Piridina ( $C_5H_5N$ ).

**D.20.5.11.** Hidróxido de sodio (NaOH).

**D.20.5.12.** Fosfato dibásico de sodio ( $Na_2HPO_4$ ).

**D.20.5.13.** p-dimetilamino benzal rodanina ( $C_{12}H_{12}N_2OS_2$ ).

**D.20.5.14.** Acetona ( $C_3H_6O$ ).

**D.20.5.15.** Agua.

**D.20.5.15.1** Desgasificar y desionizar el agua por una de las siguientes formas:

**D.20.5.15.2.** Coloque agua desionizada a vacío con agitación magnética o por sonicación en un periodo de 15 a 20 min.

**D.20.5.15.3.** Purgar el agua desionizada con una corriente de nitrógeno (u otro gas inerte) a través de un contenedor de vidrio por aproximadamente 5 min.

**D.20.5.15.4.** Hervir el agua desionizada en un matraz Erlenmeyer por 15 a 20 min. Quitar el matraz de la fuente de calor y tapar con otro matraz en posición invertida y permitir enfriar a temperatura ambiente.

**D.20.5.15.5.** Preparar el agua al momento de su uso o almacenarla en un contenedor perfectamente tapado y sellado o bajo ligero vacío para protegerla de la reabsorción de gases atmosféricos.

**D.20.5.16. Disolución de arranque.**

**D.20.5.16.1.** Adicionar 2 mL de disolución DOWFAX 2AI en aproximadamente 800 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 1 L. Llevar al volumen con agua desionizada y mezclar perfectamente.

**D.20.5.17. Reactivos de destilación.**

**D.20.5.17.1.** Agregar 125 mL de ácido fosfórico y 25 mL de ácido hipofosforoso en aproximadamente 250 mL de agua en un matraz volumétrico de 500 mL.

**D.20.5.17.2.** Enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua desionizada y mezclar perfectamente. Preparar esta disolución semanalmente.

**D.20.5.18. Buffer de fosfatos pH 5.2.**

Disolver 13.6 g de fosfato monobásico de potasio y 0.28 g de fosfato dibásico de sodio en aproximadamente 800 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 1.0 L. Llevar al volumen con agua desionizada y mezclar, almacenarla en refrigeración.

**D.20.5.19. Buffer de fosfatos disolución de trabajo.**

Agregar 1 mL de DOWFAX 2AI a 500 mL de la disolución buffer de fosfatos pH 5.2 y mezclar perfectamente. Preparar esta disolución diariamente.

**D.20.5.20. Reactivo de cloramina T.**

**D.20.5.20.1.** Disolver 2.0 g de cloramina T trihidratada en aproximadamente 400 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 500 mL.

**D.20.5.20.2.** Llevar al volumen de aforo con agua desionizada y mezclar perfectamente. Preparar esta disolución diariamente.

**D.20.5.21. Reactivo piridina-ácido barbitúrico.**

**D.20.5.21.1.** Pesar 7.5 g de ácido barbitúrico y transferir a un vaso de precipitado de 500 mL, enjuagar las paredes del vaso con 50 mL de agua desionizada.

**D.20.5.21.2.** Con agitación agregar 37.5 mL de piridina y 7.5 mL de HCl.

**D.20.5.21.3.** Agregar 300 mL de agua desionizada y agitar hasta que el ácido barbitúrico este completamente disuelto.

**D.20.5.21.4.** Transferir el contenido del vaso cuantitativamente a un matraz volumétrico de 500 mL, llevar al volumen con agua desionizada y mezclar.

**D.20.5.21.5.** Filtrar la disolución a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m.

**D.20.5.21.6.** Preparar esta disolución semanalmente.

**D.20.5.22. Hidróxido de sodio 1 N.**

Pesar aproximadamente 40.0 g de hidróxido de sodio, disolver y llevar a un volumen de 1 L con agua desionizada, mezclar.

**D.20.5.23. Hidróxido de sodio 0.1 N.**

Medir 100 mL de la disolución de hidróxido de sodio 1 N, transferir a un matraz volumétrico de 1 L y llevar al volumen con agua desionizada, mezclar.

**D.20.5.24. Disolución indicadora de rodanina al 0.02%.**

Disolver 20 mg de p-dimetilamino benzal rodanina en 100 mL de acetona. Mantener esta disolución almacenada en frasco ámbar y en refrigeración.

**D.20.5.25. Disolución patrón de cloruro de sodio 0.0141 N.**

Disolver 0.8241 g de NaCl (previamente secado a 140°C durante 2 h), en agua destilada y llevar a 1000 mL en un matraz volumétrico. Bajo estas condiciones 1.00 mL equivale a 500  $\mu$ g del ion  $\text{Cl}^-$ . Ajustar esta equivalencia al peso registrado.

**D.20.5.26. Disolución de cromato de potasio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) al 5%.**

Disolver 50 g de cromato de potasio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) en aproximadamente 100 mL de agua. Añadir disolución de  $\text{AgNO}_3$  0.1 N hasta la formación de un precipitado color rojo. Dejar reposar 12 h; filtrar y diluir a 1 L con agua.

**D.20.5.27. Disolución patrón de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.02 N.**

**D.20.5.27.1.** Disolver 3.27 g de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en agua y llevar a un volumen de 1 L. Guardar la disolución en frasco color ámbar y en refrigeración.

**D.20.5.27.2.** Si se utiliza una disolución comercial de nitrato de plata 0.1 N, diluir 200 mL de ésta a un volumen de 1000 mL con agua.

**D.20.5.28. Valoración de la disolución.**

**D.20.5.28.1.** Tomar por triplicado una alícuota de 10 mL de la disolución de NaCl con material volumétrico y transferir a matraces Erlenmeyer de 250 mL llevar a un volumen aproximado de 100 mL con agua. Adicionar 1 mL de disolución de cromato de potasio y titular con la disolución patrón de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.02 N hasta la aparición de la coloración amarillo—rojizo permanente.

**D.20.5.28.2.** Preparar un blanco de reactivos utilizando 100 mL de agua conteniendo 1 mL de disolución de cromato de potasio.

**D.20.5.28.3.** Calcular la normalidad de la disolución aplicando la siguiente ecuación:

$$N_{\text{AgNO}_3} = \frac{(N \text{ de NaCl } X V)}{(A - B)}$$

Solución patrón de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.02 N.

En donde:

N es la Normalidad;

V es la alícuota tomada de la disolución patrón (10 mL);

A son los mL gastados de  $\text{AgNO}_3$  0.02 N en la valoración del patrón;

B son los mL gastados de  $\text{AgNO}_3$  0.02 N en la valoración del blanco;

Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso.

#### **D.20.5.29. Disolución patrón de cianuro de 100 mg/L.**

**D.20.5.29.1.** Disolver 2 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 900 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 1.0 L.

**D.20.5.29.2.** Agregar 0.2505 g de cianuro de potasio (KCN) y agitar hasta que se disuelva.

**D.20.5.29.3.** Llevar al volumen de 1000 mL con agua desionizada y mezclar perfectamente.

**D.20.5.29.4.** Almacenar en recipiente ámbar y refrigerar. Si se almacena adecuadamente este reactivo es estable hasta por 4 semanas.

#### **D.20.5.30. Valoración de la disolución.**

**D.20.5.30.1.** Medir 25 mL de esta disolución y diluir a 100 mL con disolución de NaOH 0.1 N, añadir aproximadamente 0.5 mL del indicador de rodanina. Titular con disolución valorada de  $\text{AgNO}_3$  0.02 N, hasta el primer cambio de color amarillo canario a salmón.

**D.20.5.30.2.** 1 mL de solución de  $\text{AgNO}_3$  0.02 N equivale a 1.00 mg de  $\text{CN}^-$

**D.20.5.30.3.** Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso.

#### **D.20.5.31. Disolución de trabajo de cianuro de 10 mg/L.**

Con una pipeta volumétrica agregar 10 mL de disolución patrón de cianuro (100 mg/L) en aproximadamente 80 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen de 100 mL con agua desionizada y mezclar perfectamente. Preparar previamente a su uso y mantener en una botella de vidrio cerrada.

#### **D.20.5.32. Disolución intermedia de cianuro 1.0 mg/L (100 mL).**

**D.20.5.32.1.** Con una pipeta volumétrica agregar 10 mL de disolución de trabajo de cianuro (10 mg/L) en aproximadamente 80 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen de 100 mL con agua desionizada y mezclar perfectamente. Preparar previamente a su uso y mantener en una botella de vidrio cerrada.

**D.20.5.32.2.** Puede utilizarse una disolución patrón comercial de 1 mg/mL trazable a patrones nacionales o internacionales la cual ya no requiere valoración.

#### **D.20.6. Procedimiento.**

##### **D.20.6.1. Preparación de la curva de calibración.**

Medir los siguientes volúmenes de disolución patrón de cianuros (Véase tabla D.20.1.) en matraces volumétricos de 100 mL. Adicionar 1.0 mL de hidróxido de sodio 1 N, llevar al volumen de 100 mL cada disolución con agua desionizada y mezclar perfectamente. Preparar la curva de calibración diariamente.

**Tabla D.20.1.- Curva de calibración de Cianuros**

Volumen de disolución de trabajo 10.0 mg de CN <sup>-</sup> /L (mL)	Volumen de disolución intermedia 1.0 mg de CN <sup>-</sup> /L (mL)	Concentración del ion cianuro (mg/L)
0.0	0.0	Blanco
0.0	0.5	0.005
0.0	1.0	0.010
0.0	5.0	0.050
1.0	0.0	0.100
5.0	0.0	0.500
10.0	0.0	1.000

**D.20.6.1.2.** Analizar cada punto de la curva de calibración en orden creciente de concentración.

**D.20.6.2. Acondicionamiento del equipo para Análisis por Flujo Segmentado.**

**D.20.6.2.1.** Conecte las mangueras de reactivos de la bomba al contenedor con la disolución de inicio.

**D.20.6.2.2.** Establezca la velocidad de la bomba al 40% para permitir que fluya la disolución de inicio a través de todo el sistema.

**D.20.6.2.3.** Verifique que la celda del detector esté libre de burbujas y el flujo sea constante con la disolución de inicio hasta la obtención de una línea base estable a 570 nm.

**D.20.6.3. Manejo del instrumento.**

**D.20.6.3.1.** Instale el cartucho como se muestra en el diagrama de flujo.

**D.20.6.3.2.** Encienda el equipo excepto la bomba y el digestor UV.

**D.20.6.3.3.** Encienda la bombilla de condensación y enfriamiento.

**D.20.6.3.4.** Programe la temperatura de destilación del calentador con el controlador del módulo a 160°C.

**D.20.6.3.5.** Verifique que el módulo de destilación del cianuro esté encendido y configurado como ilustra el diagrama de flujo.

**D.20.6.3.6.** Conecte la línea de los reactivos de destilación, al contenedor de agua desionizada, así como el buffer de fosfatos, piridina ácido barbitúrico y cloramina T.

**D.20.6.3.7.** Cuando la temperatura del calentador del módulo de destilación alcance aproximadamente 150°C encender la bomba y hacer fluir los reactivos a través del sistema. Encender el digestor UV.

**D.20.6.3.8.** Una vez que la temperatura se ha estabilizado aproximadamente a 160°C verifique que:

**D.20.6.3.9.** No haya líquido acumulado de reflujo en la bombilla de la cabeza de destilación.

**D.20.6.3.10.** El líquido de condensación de la columna tenga una apariencia homogénea y brillante en la pared interna.

**D.20.6.3.11.** Permita estabilizar la línea base.

**D.20.6.3.12.** Analizar la curva de calibración, blancos, muestras y muestras control.

**D.20.6.3.13.** Una vez finalizado el análisis apagar el módulo de calentamiento y permita a la columna de vidrio regresar a temperatura ambiente. Purgue con disolución de inicio en todo el sistema al menos de 10 a 15 min, detenga la bomba, libere la tensión en todas las mangueras y apague el equipo.

**D.20.6.3.14.** Notas de operación.

**D.20.6.3.15.** Adicione hidróxido de sodio al contenedor del desecho para asegurar que no se desprenda gas de HCN.

**D.20.6.3.16.** Periódicamente (una o dos veces a la semana) enjuague con hidróxido de sodio 1N durante 10-15 min a temperatura ambiente la cabeza de destilación y reflujo para prevenir la acumulación de depósitos, posteriormente enjuague con grandes cantidades de agua desionizada.

**D.20.6.3.17.** Advertencia: Nunca ensamble la disolución de hidróxido de sodio 1N a través del sistema de destilación.

**D.20.6.3.18.** No bombee líquidos que contengan surfactantes a través del sistema de destilación en caliente.

**D.20.6.3.19.** En el módulo de destilación utilizar una manguera prehumedecida de polietileno para reducir daños o rupturas por lo caliente.

**D.20.6.3.20.** Si se acumula el líquido en la bombilla de reflujo de la cabeza de destilación:

**D.20.6.3.21.** Desconecte la manguera ácida del desecho no volátil y permita que se drene el líquido.

**D.20.6.3.22.** Reconecte la manguera y verifique que el baño de destilación esté funcionando adecuadamente, asegúrese que la bobina de destilación esté situada adecuadamente sobre él así como el calentador y que la cabeza de destilación esté purgada con la bobina del calentador.

**D.20.6.3.23.** Si persisten los problemas apague el baño del calentador del destilador y espere a que el vidrio regrese a temperatura ambiente. Purgue el sistema con NaOH 1N, enjuague con agua desionizada y seque con acetona.

**D.20.6.3.23.** Si el problema aún continua, eleve la temperatura en 5.0°C hasta que la destilación se realice de manera suave. No incremente la temperatura por encima de 180°C.

#### **D.20.7. Expresión de los resultados.**

**D.20.7.1.** Obtener el resultado en mg de  $\text{CN}^-/\text{L}$  directamente de la curva de calibración.

**D.20.7.2.** En caso de que alguna de las muestras rebasa el intervalo de trabajo hacer una dilución de la muestra y considerar este factor en el cálculo final.

#### **D.20.8. Informe de prueba.**

Informar como: mg de  $\text{CN}^-/\text{L}$ .

#### **D.21. Método Espectrométrico para la determinación de Cianuros.**

##### **D.21.1. Fundamento.**

Los cianuros son liberados como HCN por reflujo de la muestra con un ácido fuerte. El HCN se absorbe en una disolución de NaOH. El ion cianuro en la disolución absorbente se hace reaccionar con cloramina-T a un pH menor de 8 para formar el cloruro de cianógeno; (CNCl) este forma un color rojo-azul al reaccionar con la disolución de ácido piridina-barbitúrico. La absorbancia máxima del color en disolución acuosa se encuentra entre 575 nm y 582 nm, la cual es proporcional a la concentración del ion cianuro.

Precaución el HCN y el CNCl son tóxicos; evitar su inhalación.

##### **D.21.2. Interferencias.**

**D.21.2.1.** Los agentes oxidantes como el cloro pueden destruir la mayoría de los cianuros durante el almacenamiento y la manipulación, por lo cual esta interferencia debe ser eliminada al momento del muestreo.

**D.21.2.2.** Una elevada concentración de carbonato puede afectar la destilación causando gasificación excesiva cuando se añade el ácido. El dióxido de carbono liberado puede reducir significativamente el contenido de NaOH del absorbedor.

**D.21.2.3.** El ácido sulfhídrico o sulfuros metálicos.

**D.21.2.4.** La presencia de nitratos y/o nitritos pueden interferir en los resultados.

##### **D.21.3. Equipo.**

**D.21.3.1.** Balanza analítica con precisión de 0.1 mg, calibrada y verificada;

**D.21.3.2.** Balanza granataria con precisión de 0.1 g, calibrada y/o verificada;

**D.21.3.3.** Mantilla o parrilla de calentamiento;

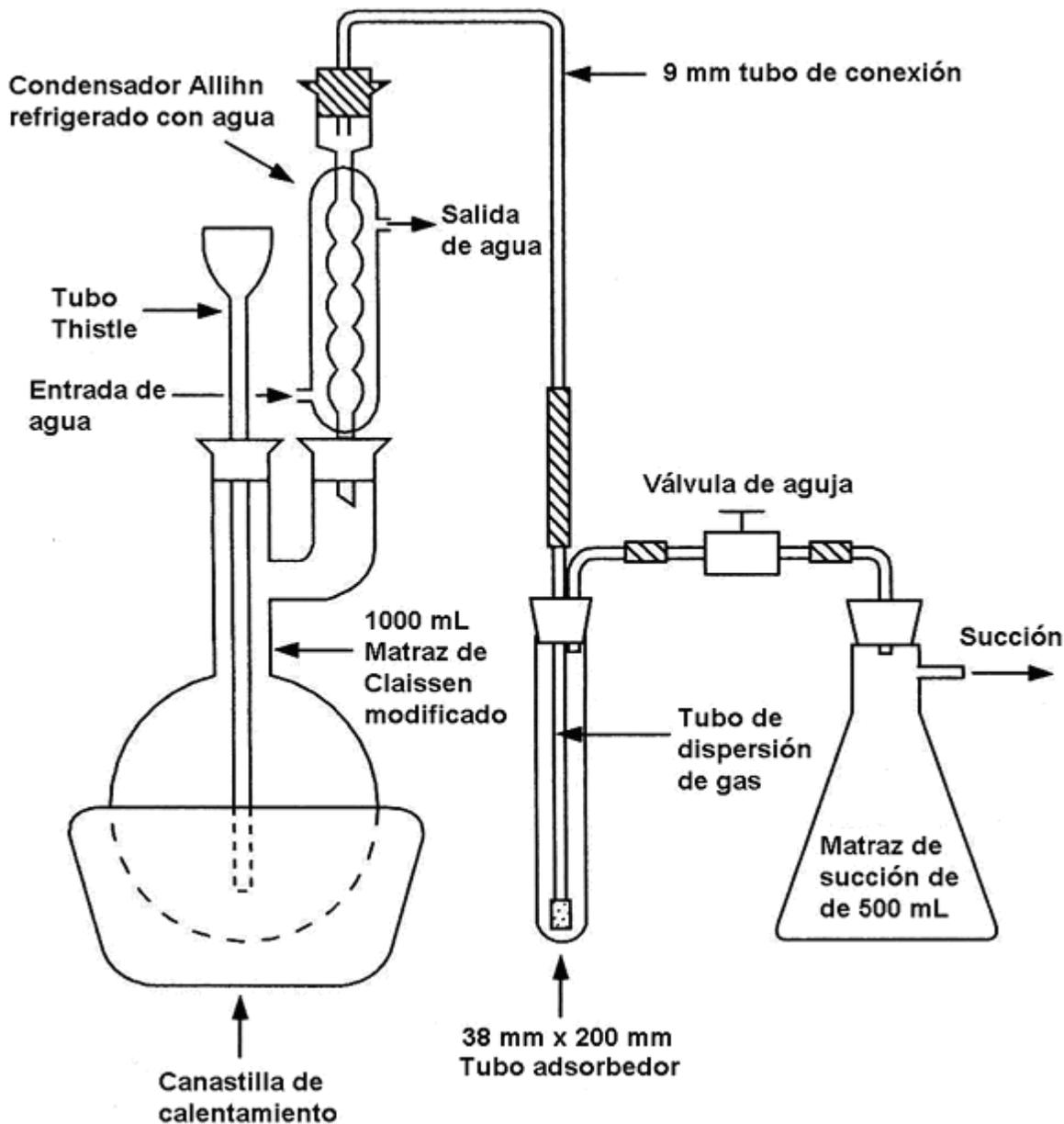
**D.21.3.4.** Potenciómetro verificado;

**D.21.3.5.** Aparato de destilación. El matraz de destilación Claisen modificado debe ser de 1 L de capacidad con un tubo de entrada y un condensador. El absorbedor de gas puede ser un frasco lavador de gases tipo Fisher- Milligan. (Véase figura D.21.1);

**D.21.3.6.** Equipo de vacío para el arrastre de gases en el destilador durante el pretratamiento de la muestra, y

**D.21.3.7.** Espectrómetro calibrado y verificado disponible para utilizarse a 578 nm con celdas de 1 cm de paso óptico.

Figura D.21.1. Aparato para destilación de cianuros

**D.21.4. Material.**

Todo el material volumétrico utilizado debe ser clase A verificado.

**D.21.4.1.** Vasos de precipitados de 25 o 50 mL;

**D.21.4.2.** Vasos de precipitados de 1000 mL;

**D.21.4.3.** Matraces volumétricos de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL;

**D.21.4.4.** Bureta de 50 mL graduada en 0.1 mL;

**D.21.4.5.** Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 20 mL o micropipeta calibrada y/o verificada, y

**D.21.4.6.** Barra magnética con cubierta de teflón.

**D.21.5. Reactivos.**

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

**D.21.5.1.** Cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ );

**D.21.5.2.** Cianuro de potasio (KCN) o disolución patrón de cianuro trazable a patrones nacionales o internacionales. Reactivo altamente tóxico, evitar el contacto o su inhalación;

**D.21.5.3.** Acido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ );

**D.21.5.4.** Acido sulfámico ( $H_2NSO_3H$ );

**D.21.5.5.** Cloruro de magnesio hexahidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ );

**D.21.5.6.** Hidróxido de sodio (NaOH);

**D.21.5.7.** Nitrato de bismuto [ $(Bi)NO_3$ ]<sub>3</sub>;

**D.21.5.8.** Cloruro de sodio (NaCl). Con una pureza mayor de 99.95% o avalado por la DGN;

**D.21.5.9.** Nitrato de plata ( $AgNO_3$ );

**D.21.5.10.** p-dimetilamino benzal rodanina ( $C_{12}H_{12}N_2OS_2$ );

**D.21.5.11.** Acetona ( $C_3H_6O$ );

**D.21.5.12.** Cloramina-T trihidratada ( $C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$ );

**D.21.5.13.** Ácido Barbitúrico ( $C_4H_4N_2O_3$ );

**D.21.5.14.** HCl;

**D.21.5.15.** Acetato de sodio trihidratado ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ );

**D.21.5.16.** Tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3$ );

**D.21.5.17.** Carbonato de plomo ( $PbCO_3$ );

**D.21.5.18.** Almidón;

**D.21.5.19.** Yoduro de potasio (KI);

**D.21.5.20.** Ácido acético glacial ( $CH_3COOH$ );

**D.21.5.21.** Acetato de plomo [ $Pb(CH_3COO)_2$ ];

**D.21.5.22.** Papel indicador de acetato de plomo comercial;

**D.21.5.23.** Piridina ( $C_5H_5N$ );

**D.21.5.24.** Disolución indicadora de rodanina al 0.02%;

Disolver 20 mg de p-dimetilamino benzal rodanina ( $C_{12}H_{12}N_2OS_2$ ) en 100 mL de acetona. Mantener esta disolución almacenada en frasco ámbar y en refrigeración;

**D.21.5.25.** Disolución concentrada de hidróxido de sodio;

Pesar aproximadamente 40.0 g de hidróxido de sodio, disolver y llevar a un volumen de 1 L con agua previamente hervida y enfriada para eliminar la presencia de dióxido de carbono ( $CO_2$ ).

**D.21.5.26.** Disolución diluida de hidróxido de sodio;

Diluir 40 mL de la disolución concentrada de hidróxido de sodio y llevar a un volumen de 1 L en un matraz volumétrico con agua libre de dióxido de carbono ( $CO_2$ ).

**D.21.5.27.** Disolución patrón de cloruro de sodio 0.0141 N;

Disolver 0.8241 g de cloruro de sodio (NaCl) (previamente secado a 140°C durante 2 h), en agua destilada y llevar a 1000 mL en un matraz volumétrico. Bajo estas condiciones 1.00 mL equivale a 500 µg del ion  $Cl^-$ . Ajustar esta equivalencia al peso registrado.

**D.21.5.28.** Disolución de cromato de potasio al 5%;

Disolver 50 g de cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ) en aproximadamente 100 mL de agua. Añadir disolución de  $AgNO_3$  0.1 N hasta la formación de un precipitado color rojo. Dejar reposar 12 h; filtrar y diluir a 1 L con agua.

**D.21.5.29.** Disolución patrón de nitrato de plata 0.02 N;

**D.21.5.29.1.** Disolver 3.27 g de  $AgNO_3$  en agua y llevar a un volumen de 1L. Guardar la disolución en frasco color ámbar y en refrigeración, y

**D.21.5.29.2.** Si se utiliza una disolución comercial de nitrato de plata 0.1 N, diluir 200 mL de ésta a un volumen de 1000 mL con agua.

**D.21.5.30. Valoración.**

**D.21.5.30.1.** Tomar por triplicado una alícuota de 10 mL de la disolución de NaCl con material volumétrico y transferir a matraces Erlenmeyer de 250 mL llevar a un volumen aproximado de 100 mL con agua. Adicionar 1 mL de disolución de cromato de potasio y titular con la disolución patrón de (AgNO<sub>3</sub>) 0.02 N hasta la aparición de la coloración amarillo- rojizo permanente;

**D.21.5.30.2.** Preparar un blanco de reactivos utilizando 100 mL de agua conteniendo 1 mL de disolución de cromato de potasio, y

**D.21.5.30.3.** Calcular la normalidad de la disolución aplicando la siguiente ecuación:

$$N_{AgNO_3} = \frac{(N \text{ de NaCl} \times V)}{(A - B)}$$

En donde:

*N* es la normalidad;

*V* es la alícuota tomada de la disolución patrón (10 mL);

*A* es el volumen (mL) gastados de AgNO<sub>3</sub> 0.02 N en la valoración del patrón, y

*B* es el volumen (mL) gastados de AgNO<sub>3</sub> 0.02 N en la valoración del blanco;

Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso.

**D.21.5.31.** Disolución madre de 1 mg de CN<sup>-</sup>/mL.

Disolver 1.6 g de NaOH y 2.51 g de cianuro de potasio (KCN) en un matraz volumétrico de 1 L. Llevar al volumen con agua.

**D.21.5.32.** Valoración de la disolución.

**D.21.5.32.1.** Medir 25 mL de esta disolución y diluir a 100 mL con disolución diluida de NaOH añadir aproximadamente 0.5 mL del indicador de rodanina. Titular con disolución valorada de AgNO<sub>3</sub> 0.02 N, hasta el primer cambio de color amarillo canario a salmón;

**D.21.5.32.2.** 1 mL de solución de AgNO<sub>3</sub> 0.02N equivale a 1.00 mg de CN<sup>-</sup>;

**D.21.5.32.3.** Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso, y

**D.21.5.32.4.** Puede utilizarse una disolución patrón comercial de 1 mg/mL trazable a patrones nacionales o internacionales la cual ya no requiere valoración.

**D.21.5.33.** Disolución de nitrato de bismuto [(Bi)NO<sub>3</sub>]<sub>3</sub>.

Pesar aproximadamente 30.0 g de nitrato de bismuto, disolver en 100 mL de agua, manteniéndose en agitación, adicionar 250 mL de ácido acético glacial. Agitar hasta que se disuelva el nitrato de bismuto y llevar a un volumen de 1 L con agua.

**D.21.5.34.** Disolución de ácido sulfámico (H<sub>2</sub>NSO<sub>3</sub>H).

Pesar aproximadamente 40.0 g de ácido sulfámico, disolver en 500 mL de agua y llevar a un volumen de 1 L.

**D.21.5.35.** Ácido sulfúrico 1:1.

Añadir lentamente 500 mL de ácido sulfúrico concentrado a 500 mL de agua.

**D.21.5.36.** Disolución de cloruro de magnesio.

Pesar aproximadamente 510.0 g de Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O), disolver y aforar a 1 L con agua.

**D.21.5.37.** Disolución de cloramina T.

Pesar aproximadamente 1.0 g de cloramina T y llevar a un volumen de 100 mL con agua. Almacenar en refrigeración. Preparar semanalmente.

**D.21.5.38.** Disolución intermedia de cianuros de 10 mg CN<sup>-</sup>/L.

Basado en la concentración para la disolución madre de cianuros, calcular el volumen requerido (aproximadamente 10 mL) y llevar a 1 L con disolución diluida de NaOH.

**D.21.5.39.** Disolución patrón de cianuros de 1 mg CN<sup>-</sup>/L.

Medir 10 mL de la disolución intermedia de cianuros y llevar a un volumen de 100 mL con disolución diluida de NaOH. Preparar previamente a su uso y mantener en una botella de vidrio cerrada.

**D.21.5.40.** Disolución de ácido piridina-barbitúrico.

Pesar aproximadamente 15.0 g de ácido barbitúrico, colocar en un matraz volumétrico de 250 mL, lavar las paredes del matraz con máximo 5 mL de agua. Adicionar 75 mL de piridina y mezclar. Adicionar 15 mL de HCl concentrado, mezclar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Diluir al volumen con agua y mezclar hasta que el ácido barbitúrico se disuelva. Almacenar en frasco ámbar y en refrigeración. Desechar si presenta precipitación.

**D.21.5.41.** Disolución amortiguadora de acetato de sodio.

Pesar aproximadamente 410.0 g de acetato de sodio, disolver y llevar a un volumen de 500 mL con agua. Ajustar a un pH de 4.5 con ácido acético glacial.

**D.21.6. Procedimiento.****D.21.6.1. Preparación de la curva de calibración de cianuros.**

Medir los siguientes volúmenes de disolución patrón de cianuros (véase Tabla D.21.1.) en matraces volumétricos de 50 mL. Diluir con 40 mL de disolución diluida de NaOH y desarrollar el color como se indica en el apartado de desarrollo de color.

**Tabla D.21.1. Curva de calibración de cianuros**

Volumen de disolución patrón de KCN (mL)	Concentración de la solución (mg de CN <sup>-</sup> /L)	Volumen de disolución diluida de NaOH (mL)	Volumen de aforo (mL)
0.0	Blanco	40	50
1.0	0.02	40	50
2.5	0.05	40	50
5.0	0.10	40	50
7.5	0.15	40	50
10.0	0.20	40	50

**D.21.6.1.1.** Leer las soluciones patrón de menor a mayor concentración y registrar al menos tres réplicas de la lectura de cada uno.

**D.21.6.1.2.** Elaborar una curva de calibración, graficando el promedio de la lectura de absorbancia en función de su concentración en mg de CN<sup>-</sup>/L de cada uno de los puntos de la curva patrón.

**D.21.6.1.3.** Ajustar la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Calcular la pendiente, el coeficiente de correlación y la ordenada al origen. Obtener la ecuación de la recta.

**D.21.6.2. Destilación de la muestra.**

**D.21.6.2.1.** Medir 500 mL de muestra, conteniendo no más de 10 mg de CN<sup>-</sup>/L en el matraz de destilación de 1 L.

**D.21.6.2.2.** Medir una alícuota de 10 mL de la disolución concentrada de NaOH, colocarla dentro del tubo de adsorción, añadir agua hasta que la espiral esté cubierta. No utilizar un volumen total de disolución de adsorción mayor a 225 mL. Conectar el matraz de ebullición, el condensador, el absorbedor y la trampa, tal como se muestra en la Figura D.21.1.

**D.21.6.2.3.** Ajustar la bomba de vacío, empezar con un flujo de aire lento que entre por el matraz tipo Claissen y dejar que se estabilice entre dos o tres burbujas de aire por segundo desde el tubo de entrada.

**D.21.6.2.4.** Utilizar papel de acetato de plomo para verificar que la muestra no contenga sulfuros. Si el papel se torna negro, la prueba es positiva; en este caso, tratar la muestra por adición de 50 mL de la disolución de nitrato de bismuto a través del tubo de entrada de aire después de que la tasa de entrada de aire esté estable.

Mezclar por 3 min antes de la adición de ácido sulfúrico. Otra forma de eliminar los sulfuros es adicionar 50 mg de PbCO<sub>3</sub> a la disolución de adsorción antes de la destilación. Filtrar el destilado antes del desarrollo del color.

**D.21.6.2.5.** Para eliminar la interferencia de nitratos y/o nitritos adicionar 50 mL de disolución de ácido sulfámico a la muestra a través del tubo de entrada de aire y lavar con agua; mezclar por 3 min antes de la adición de ácido sulfúrico.

**D.21.6.2.6.** Lentamente añadir ácido sulfúrico 1:1 a través del tubo de entrada de aire y lavar con agua, permitir que el flujo de aire mezcle el contenido del matraz por 3 min. Adicionar 20 mL de la disolución de cloruro de magnesio dentro del tubo de entrada de aire y lavar con agua.

**D.21.6.2.7.** Calentar la disolución hasta ebullición. Dejar en reflujo por lo menos 1 h. Al cabo de este tiempo apagar la fuente de calor y continuar con el flujo de aire por lo menos durante 15 min más. Al finalizar enfriar el matraz de ebullición, desconectar el adsorbedor y cerrar la bomba de vacío.

**D.21.6.2.8.** Drenar la disolución del adsorbedor dentro de un matraz volumétrico de 250 mL. Lavar el tubo conector y el adsorbedor con agua, colectando en el mismo matraz. Llevar al volumen con agua. Esta disolución es estable durante 24 h.

**D.21.6.2.9.** Destilar una muestra de agua de forma simultánea como blanco de reactivos.

#### **D.21.6.3. Desarrollo de color.**

**D.21.6.3.1.** Medir una alícuota de 40 mL de la disolución obtenida en la destilación de la muestra y del blanco de reactivos en matraces volumétricos de 50 mL.

**D.21.6.3.2.** A cada uno de los matraces adicionar 1 mL de disolución amortiguadora de acetato de sodio y 2 mL de la disolución de cloramina T, mezclar. Dejar estabilizar durante 2 min.

**D.21.6.3.3.** Adicionar 5 mL del reactivo de ácido piridín barbitúrico y llevar al volumen con disolución diluida de NaOH. Mezclar y dejar que la muestra se estabilice durante 8 min pero no más de 15 min.

**D.21.6.3.4.** Leer la absorbancia a una longitud de onda de 578 nm y registrar al menos tres réplicas de la lectura de cada uno.

**D.21.6.3.5.** Si la lectura de alguna de las muestras rebasa el intervalo de trabajo tomar una alícuota menor de muestra, llevar a 500 mL con disolución diluida de NaOH y destilar nuevamente.

#### **D.21.7. Expresión de los resultados.**

Obtener los mg de  $CN^-$  en la muestra y en el blanco de reactivos con la siguiente ecuación:

$$X = \frac{y - b}{m}$$

En donde:

X es la concentración de mg de  $CN^-/L$ ;

y es la lectura en absorbancia;

b es la ordenada al origen, y

m es la pendiente.

Calcular la concentración de mg de  $CN^-/L$  con la siguiente ecuación:

$$mg \text{ de } CN^-/L = \frac{[(A - B)(250)(50)]}{[(C)(40)]}$$

En donde:

A es la concentración (mg de  $CN^-/L$ ) en la muestra calculados con la ecuación de la recta;

B es la concentración (mg de  $CN^-/L$ ) en el blanco de reactivos calculados con la ecuación de la recta;

250 es el volumen total del destilado en mL;

50 es el volumen de aforo de la alícuota del destilado en mL;

C es el volumen original de la muestra utilizada para la destilación en mL;

40 es el volumen de la alícuota del destilado en mL;

#### **D.21.8. Informe de prueba.**

Informar como:

mg de  $\text{CN}^-/\text{L}$ .

### Apéndice E Informativo.

#### Guías de calidad del agua para uso y consumo humano.

##### Tabla E.1. Inorgánicos.

PARÁMETRO	Unidad	Límite máximo permisible
Cianuros Totales	mg/L	0,07
Dureza Total como $\text{CaCO}_3$	mg/L	500
Nitrógeno de Nitratos	mg/L	10,0
Nitrógeno de Nitritos	mg/L	0,06

##### Tabla E.2. Metales y metaloides.

PARÁMETROS	Unidades	Límite máximo permisible
Aluminio	mg/L	0,20
Antimonio	mg/L	0,02
Bario	mg/L	0,70
Cadmio	mg/L	0,003
Cobre	mg/L	2,00
Cromo	mg/L	0,05
Fierro	mg/L	0,030
Manganeso	mg/L	0,015
Níquel	mg/L	0,02
Selenio	mg/L	0,01

##### Tabla E.3. Compuestos orgánicos sintéticos.

PARÁMETROS	Unidades	Límite máximo permisible
Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos	$\mu\text{g}/\text{L}$	0,50
Compuestos orgánicos no halogenados	$\mu\text{g}/\text{L}$	10
Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables	$\mu\text{g}/\text{L}$	1,0
Carbono Orgánico Purgable	$\mu\text{g}/\text{L}$	10

Cuando se sobrepase alguno de los límites máximos permisibles de los grupos de compuestos orgánicos sintéticos, se deberá implementar los tratamientos adecuados para su remoción.