

### ANEXO III

El presente Anexo recoge la descripción de las técnicas analíticas que van a aplicarse como referencia en la determinación de los parámetros que definen el término cualitativo:

#### **DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO**

##### **MÉTODO**

508 C. Método Reflujo cerrado. Determinación colorimétrica. Standard Methods for the examination of water and wastewater.

##### **PRINCIPIO**

La materia orgánica oxidable reacciona con el dicromato potásico en medio sulfúrico, en presencia de sulfato de plata y de sulfato mercuríco.

La reacción se lleva a cabo en un tubo herméticamente cerrado, calentado a 150° durante 2 horas.

La determinación se realiza por colorimetría.

##### **APARATOS**

- Bloque digestor que opere a  $150 \pm 2^\circ$  C.
- Colorímetro o espectrofotómetro VIS.

##### **REACTIVOS**

- Pueden prepararse según se señala en el método 508 C.
- Será válido el uso de test rápidos comerciales.
- Patrón de potasio hidrógeno ftalato.

##### **PROCEDIMIENTO**

a) Medir exactamente un volumen de muestra y de reactivo dentro de un tubo con cierre hermético. Agitar por volteo varias veces.

Introducir el tubo en el bloque digestor a 150°C durante 2 horas.

A continuación dejar enfriar y leer en el espectro fotómetro a 600 mm frente a un blanco tratado en las mismas condiciones.

La determinación se realiza por interpolación con una recta de calibrado, construida con concentraciones adecuadas del patrón.

b) Seguir las instrucciones de cada fabricante, asegurando mediante la introducción de patrones la calidad de los resultados analíticos.

##### **INTERFERENCIAS**

La presencia de concentraciones elevadas de cloruro interfiere en la determinación, por lo que su concentración deberá ser tenida en cuenta a la hora de seleccionar los volúmenes de digestión.

#### **SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN**

##### **MÉTODO**

209 C. Sólidos en suspensión totales a 105°C. Standard Methods for the examination of water and wastewater.

##### **PRINCIPIO**

La muestra a  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$  se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio previamente tarado. El residuo se seca a 105°C hasta peso constante. El aumento de peso del filtro representa los sólidos en suspensión totales.

##### **APARATOS**

- Sistema de filtración a vacío.
- Bomba de vacío.

##### **ELECCIÓN DEL FILTRO**

Los filtros adecuados para esta determinación son:  
Millipore AP40, Whatman 934AH, Gelman A/E.

##### **PROCEDIMIENTO**

Si la muestra presenta sólidos gruesos, eliminarlos mediante un tamiz. Una alícuota de la muestra homogeneizada se ajusta a  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$ . El volumen se elige de tal manera que no produzca más de 200 mg. de residuo.

El filtro, que previamente ha sido lavado y secado a  $105^{\circ}\text{C}$  y enfriado en desecador, se pesa exactamente.

Se coloca sobre el sistema de filtración, se añade la alícuota y se filtra a vacío. Posteriormente, el filtro se lava con agua desionizada. Se seca en estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durante, al menos 1 hora. Se enfría en desecador y se pesa.

El resultado se expresa en mg/l.

## **DETERMINACIÓN DE MATERIAS INHIBIDORAS**

### **MÉTODO**

Determinación del efecto inhibitor del agua residual sobre la emisión de bioluminiscencia de las bacterias *Photobacterium phosphoreum*. Ensayo de agua residual con fotobacterias empleando bacterias conservadas DIN 38 412 - L34.

### **PRINCIPIO**

La inhibición de la emisión de bioluminiscencia se determina mediante un ensayo estadístico. Para esto, se combinan, en una cubeta, volúmenes de finidos del producto de ensayo con la suspensión de fotobacterias.

El criterio de ensayo lo constituye la reducción de bioluminiscencia medida tras un tiempo de contacto de 30 min. en comparación con un preparado de control.

El efecto inhibitor del agua residual se determina por medio de una serie de diluciones.

Como resultado se indica el valor GI (es el grado de dilución más pequeño de la preparación de ensayo, en la que bajo las condiciones de este método la emisión de bioluminiscencia se inhibe en  $< 20\%$ ).

### **APARATOS**

- Armario congelador para guardar las bacterias conservadas.
- Termostato con unidad térmica para la temperación de las preparaciones de ensayo a  $15 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .
- Medido de bioluminiscencia, celda de medición termostaticada a  $15 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  con cubetas de vidrio apropiadas.
- pH-metro.
- Sistema de filtración a vacío.
- Pipetas automáticas de 500 a 1000 ml.

### **REACTIVOS**

- Bacterias marinas *Photobacterium phosphoreum*: las fotobacterias conservadas se pueden adquirir en establecimientos comerciales y guardar en el frigorífico a entre  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Una vez se les añade agua las bacterias comienzan a emitir luz inmediatamente y ya se pueden aplicar directamente en el ensayo.
- Disolución salina al 2% en CINA.
- Disolución de NaOH 1M para ajuste del pH.
- Disolución de ClH 1M para ajuste del pH.

### **PROCEDIMIENTO**

Preparación de la muestra:

Una alícuota de la muestra perfectamente homogeneizada se filtra a vacío.

El filtrado se ajusta  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$ , añadiendo la disolución de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico.

A continuación se procede al salado del agua residual mediante adición de cloruro sódico hasta una concentración del 2%.

Preparar una serie de diluciones de la muestra según el grado de inhibición esperado, al menos contemplando las siguientes (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16), utilizando la disolución salina al 2% en cloruro sódico. Se sitúan en el bloque termostático a  $15^{\circ}\text{C}$ .

### **Preparación de la suspensión de bacterias:**

Reconstituir las bacterias siguiendo la técnica recomendada por el fabricante de equipo de incubación.

Pipetar 0,5 ml de la suspensión de bacterias a cada una de las cubetas necesarias para llevar a cabo el ensayo y esperar el tiempo recomendado. Las cubetas se sitúan en el bloque termostático a 15°C. Se realizan dos ensayos paralelos.

### **Realización del ensayo:**

Una vez transcurrido un tiempo de adecuación, se mide la emisión luminiscente inicial de las soluciones paralelas de bacterias (I<sub>0</sub>).

Inmediatamente después de la medición de una suspensión de ensayo, añadir 0,5 ml de la dilución correspondiente de la muestra y agitar. Proceder de esta manera hasta finalizar las diluciones previstas.

Determinar de nuevo las intensidades de la bioluminiscencia transcurridos 30 min. (I<sub>30</sub>).

Debido a que el tiempo de contacto de todos los preparados de ensayo tiene que ser de la misma duración, medir las intensidades de bioluminiscencia a intervalos de tiempo iguales.

Inicialmente, se realiza un ensayo control que supone sustituir la adición de la dilución de la muestra por el mismo volumen de la disolución de cloruro sódico al 2%, midiéndose I<sub>co</sub> e I<sub>c30</sub>.

### **CÁLCULOS**

Factor de corrección (FC).

Una vez efectuadas las mediciones I<sub>co</sub> e I<sub>c30</sub> se calculará el factor de corrección (FC) debido a la variación en la emisión de luz de las bacterias durante el período de incubación (30 min) a partir de las lecturas efectuadas sobre el ensayo control.

$$FC = I_{c30}/I_{co}$$

Emisión teórica a los 30 minutos (IT<sub>30</sub>).

Para cada dilución de la muestra se calculan los valores teóricos de emisión después de 30 min. sin exposición al tóxico.

$$IT_{30} = I_0 * FC$$

Porcentaje de inhibición (% H<sub>30</sub>).

Para cada dilución se calculan los porcentajes de inhibición:

$$\% H_{30} = [(IT_{30} - I_{30}) / IT_{30}]$$

### **Cálculo de GL**

Como valor de la GL se dará la dilución menor que produce una inhibición inferior al 20%.

Cálculo de las materias inhibidoras (MI).

El valor de MI coincidirá con el valor numérico de GL.

### **CRITERIOS DE VALIDEZ**

El ensayo será válido si:

. El valor FC se encuentra entre 0,6 y 1,3.

. La desviación de las determinaciones paralelas, de su valor medio, tanto en el preparado de control como en los preparados de ensayo, será inferior al 3%.

#### **ANEXO IV. ARQUETAS TIPO 1 Y 2 DE CONEXION AL COLECTOR**

Arqueta Tipo 1.

1. Armario de control.
2. Registro homologado.
3. Tubo PVC.
4. Solera.
5. Dimensiones aproximadas.

Arqueta Tipo 2

1. Armario de control.
2. Registro homologado.
3. Forjado resistente.
4. Altura variable mínimo 1,80.
5. Canal 50 x 40 aprox.
6. Registro 200 x 70.
7. Solera H-200.”