

ANEXO I. METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS



***Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas
de los Ríos Limay, Neuquén y Negro***

SECRETARÍA DE GESTIÓN AMBIENTAL

METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS

CIPOLLETTI, Noviembre 2023

METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS

APLICABLE A MUESTRAS DE AGUA Y SEDIMENTOS OBTENIDAS EN MONITOREOS DE AMBIENTES LÉNTICOS Y LÓTICOS DE LAS CUENCAS DE LOS RÍOS LIMAY, NEUQUÉN Y NEGRO

A continuación se detallan las técnicas y metodologías analíticas recomendadas por la AIC para la determinación de variables de calidad en muestras de agua y sedimentos. Las mismas, se basan en estándares internacionales y están ajustadas a las condiciones particulares de los ambientes monitoreados en la Cuenca. El objetivo es garantizar la calidad en los resultados analíticos obtenidos y así validar los datos que conforman la base de datos de la AIC, permitiendo realizar análisis comparativos entre los distintos cuerpos de agua (embalses, lagos y ríos) y determinar tendencias en el tiempo.

A. NUTRIENTES Y CLOROFILA

Nitrógeno Total – Método de oxidación básica (persulfato de potasio) (4500-N C Persulfate Method) y reducción de nitratos a nitritos en columna de cadmio (4500-NO₃ E Cadmium Reduction Method) método espectrofotométrico (SM 23° edición 2017).

Nitrógeno Total – Digestión (Grasshoff et al., 1983), similar a método 4500-N C (APHA, 1995). Método de oxidación básica (persulfato de potasio) (K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling. “Methods of Seawater Analysis”, 1983) y reducción de nitratos a nitritos en columna de cadmio (espectrofotométrico, 4500-NO E, SM 23° edición 2017).

Nitratos y nitritos – por reducción en columna de cadmio y diazotización (SM 23° edición 2017).

Amonio – método del azul-indofenol (Mackereth et al., 1978).

Fósforo Total – Método del ácido ascórbico (espectrofotométrico) (4500-P E Ascorbic Acid Method; APHA, 2017). Previa digestión con ácido sulfúrico y persulfato de potasio (4500-P B.5 Persulfate Digestion Method) (SM 23° edición 2017).

Fósforo Reactivo Soluble: Reducción del complejo fosfomolibdico con ácido ascórbico (Golterman et al., 1978).

Clorofila *a* y feopigmentos – método espectrofotométrico con corrección por feopigmentos, (10200H Chlorophyll Method; APHA, 2017) (SM 23° edición 2017).

B. MATERIA ORGÁNICA DISUELTA COLOREADA

Materia Orgánica Disuelta Coloreada – método espectrofotométrico para medición de sustancias disueltas orgánicas de color (CDOM). Protocolo GESAP (ADENDA 1) según Protocolo de la NASA, *Mitchell, B.G., M. Kahru, J. Wieland, and M. Stramska. (2003) Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved materials and phytoplankton for discrete water samples, in: Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 4, Inherent optical properties: instruments, characterization, field measurements and data analysis protocols, edited by: Mueller J. L., Fargion, G. S. and McClain, C. R., NASA Tech. Rep., Greenbelt, Maryland, 9: 39–64.*

C. BACTERIOLÓGICOS.

Escherichia coli – Método Armonizado *Escherichia coli* (INTI – AIC, 2017). Técnica del Número más Probable (NMP/100 mL), correspondiente al método 9221F, Procedimiento del sustrato fluorogénico (procedure using fluorogenic substrate), SM 23° edición 2017.

Escherichia coli – Colilert, método 9223B, prueba del sustrato enzimático (Enzyme Substrate Test) SM 23° edición 2017. Descripto también en la Norma ISO 9308-2:2012.

Coliformes Totales - método 9221B y C, técnica estándar de fermentación de coliformes totales (Standard total coliform fermentation technique), SM 23° edición 2017.

Enterococos – técnica ISO 7899-2/2000 Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci.

D. FÍSICO-QUÍMICOS

DBO – Test de DBO-5, incubación 5 días, métodos 5210 y 5210 B (SM 23° edición, 2017).

Turbidez – método APHA 2130-B, límite de cuantificación 1.0 NTU (SM 23° edición, 2017).

Iones Principales:

Cloruros: método cromatografía iónica, 4110B–4500-Cl⁻F; o método Titulación argentométrica (4500-Cl- B) (SM 23° edición, 2017).

Sulfatos: método cromatografía iónica, 4110B-4500-SO₄ B; o método turbidimétrico, 4500-SO₄⁻²-E (SM 23° edición, 2017).

Sodio: método absorción atómica de llama 3500-B (SM 23° edición, 2017); o método ASTM D1191-91.

Potasio: método absorción atómica de llama, 3500-B (SM 23° edición, 2017); o método ASTM 4192-93.

Calcio: método titulométrico EDTA, 3500-Ca⁺²-B (SM 23° edición, 2017); o método ASTM D511-93.

Magnesio: método de cálculo, 3500-Mg⁺²-B (SM 23° edición, 2017); o método ASTM D511-93.

Sílice: método espectrofotométrico UV-Vis, 4500-SiO₂ (SM 23° edición, 2017).

Dureza total: método titulométrico EDTA, 2340-C (SM 23° edición, 2017), o método Ca+Mg, 2340 B.

Alcalinidad total: método titulométrico, 2320-B (SM 23° edición, 2017), o método ASTM D1067.

Sólidos Disueltos Totales: método por secado a 180 °C, 2540 C (SM 23° edición, 2017), o método ASTM D1888.

Sólidos Suspendidos Totales: método por secado a 103-105 °C, 2540-D (SM 23° edición, 2017), o método ASTM D1888.

E. FITOPLANCTON.

Densidad algal y Análisis Taxonómico – Recuento de fitoplancton según técnica descrita por Utermöhl (1958), empleando cámaras de sedimentación de volumen conocido. El reconocimiento y determinación de los organismos presentes en cada muestra, se realiza aplicando claves dicotómicas disponibles en trabajos bibliográficos específicos para grupo de géneros y/o especies: Lund, J. W. G. *et al.*, 1958; *The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiol*, 11 (2):143-170.

Toxinas algales, MICROCISTINA-LR – por metodología ELISA – Microcystins – Abraxis. Límite de detección 0,1 µg/L.

F. METALES, METALOIDES (SEMIMETALES) Y CIANUROS.

Arsénico – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,25 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Cadmio – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,40 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Cromo – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,36 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Cobre – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,08 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Plomo – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,16 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Níquel – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,31 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Plata – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,10 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Selenio – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,51 µg/L. Método 3125 SM 23° edición, 2017.

Cinc – cuantificación mediante espectrometría de masas con plasma inductivo (ICP-MS), límite de cuantificación de 0,34 µg/L. Método 3125, SM 23° edición, 2017.

Mercurio – cuantificación mediante espectrometría de absorción atómica por vapor frío, límite de detección del método es de 0,03 µg/L. Norma EPA 245.1 (Environmental Protection Agency).

Cianuros – técnica de la determinación por potenciometría con electrodo selectivo de cianuros, aplicando un algoritmo matemático luego de adición estándar. Límite de detección de 5,0 µg/L.

G. HIDROCARBUROS TOTALES, BTEX E HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS.

Hidrocarburos totales del petróleo (fracción GRO y DRO) – método EPA 5021A: COV por “Equilibrium headspace analysis”. – EPA 3510C: separación de compuestos orgánicos por extracción Líquido-Líquido en ampolla de separación. – EPA 8015C: GC/FID. El límite de cuantificación es de 500 µg/L.

Benceno, Tolueno, Etilbenceno, m. p-Xileno y o-Xileno (BTEX) – Norma EPA 5021A/8015C: CG/FID. El límite de cuantificación es de 10 µg/L.

Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares – Norma EPA 3535A: Extracción en fase sólida EPA 8310: HPLC-detección por fluorescencia y UV. El límite de cuantificación es de 10 µg/L.

H. AGROQUÍMICOS.

Organoclorados, extracción con hexano sobre 1 L de muestra, concentración a un volumen final de 0,50 mL bajo corriente de nitrógeno, cuantificación del extracto por cromatografía gaseosa (CG) con detector de captura de Electrones (ECD) y confirmación mediante inyección del extracto en una segunda columna de diferente polaridad, utilizando detector ECD.

Organofosforados, extracción en fase sólida (Método EPA 3535A modificado) sobre 1 L de muestra y concentración a un volumen final de 0,25 mL bajo corriente de nitrógeno, cuantificación por CG con detector de Nitrógeno-Fósforo (CG-NPD) y confirmación por espectrometría de masas (GC MS).

Antiescaldantes (difenilamina, etoxiquina), extracción en fase sólida (Método EPA 3535A modificado) sobre 2 L de muestra, concentración a un volumen final de 0,5 mL, cuantificación por CG-NPD y confirmación por GC-MS.

Fungicidas (captan, carbendazim, metiltiofanato y tiabendazol), extracción en fase sólida (Método EPA 3535A modificado) sobre 2 L de muestra, concentración a un volumen final de 0,5 mL y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

NOTA: los límites de detección se encuentran en la Adenda 2.

I. SEDIMENTOS

Granulometría

Metodología: Ingram, R., 1971. Sieve Analysis. Procedures in Sedimentary Petrology. Ed. Wiley, London: 49- 68. Galehouse, J., 1971. Sedimentation Analysis, Ed. Wiley, London: 69-94

Descripción: Secado de sedimentos en estufa (60° C). Tamizar una fracción, de masa conocida, por una batería de tamices de 2 mm (Newark, ASTM N° 10 U.S.A. Standard Series Sieves), 1mm (Newark, ASTM N° 18 U.S.A. Standard Series Sieves) y 0,25 mm (Newark, ASTM N° 60 U.S.A. Standard Series Sieves) (o similares). Cada fracción retenida en el tamiz es pesada y se calcula el porcentaje de las siguientes fracciones: Arena gruesa (> 2 mm); Arena media (2-1 mm); Arena fina (1-0.25 mm) y Arena muy fina (0.25-0.05 mm). Las fracciones de Limo (0,05-0,002 mm) y Arcilla (< 0,002 mm) se determinan, sobre la fracción de sedimento remanente después de haber pasado por la batería de tamices mencionada, por el método del densímetro (Ingram, 1971; Forsythe, 1985).

Fósforo Total

Metodología: Carter, M.R., 1993. Soil Sampling and Methods of Analysis. Canadian Society of Soil Science, Cap. 23 : 213-229. Kuo, S., 1996. Phosphorus. Cap. 12. Methods of Soil Analysis; Part 3 Chemical Methods. SSSA Book Series Nº 5.

Descripción: Digestión a 440 °C con ácido sulfúrico (SO₄H₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30%. Posterior determinación del contenido de fósforo reactivo soluble (PRS) según Murphy y Riley (1962), método 4500-P E (SM 23° edición, 2017).

Nitrógeno Total

Metodología: mediante analizador automático Thermo FlashEA 1112. Alternativamente al uso del analizador automático, se pueden utilizar la siguiente metodología.

Nitrógeno Total (Ntk): Método alternativo de Kjeldahl (método semi-micro Kjeldahl Nº 4500 Norg C; SM, 2017). Este método determina las fracciones orgánica y amoniacal del nitrógeno y no las correspondientes a los nitratos y nitritos. De acuerdo con Golterman (2004), en la mayoría de los sedimentos el nitrógeno se encuentra en forma orgánica siendo la fracción amoniacal la forma principal de liberación de N desde los sedimentos, mientras que los nitratos y nitritos suelen aparecer solo en el agua intersticial. El límite de detección del método es < 0,1 mg/g (0,01 %).

Fraccionamiento de Fósforo

Metodología: Hieltjes, A. & Lijklema, L., 1980. Fractionation of Inorganic Phosphates in Calcareous Sediments. Journal of Environmental Quality (3): 405-407.

Descripción: Esquema de fraccionamiento secuencial propuesto por Hieltjes & Lijklema (1980). La fracción lábil (P-lábil) se extrae con CINH₄ 1 M, la fracción unida al hierro y al aluminio (P-Fe/Al) se extrae con NaOH 0.1 M, y la fracción unida al calcio (P-Ca) se extrae con HCl 0.5 M. La fracción de fósforo unida a la materia orgánica (P-MO) se calcula a partir de la diferencia entre el PT y la suma de las fracciones anteriores.

Isotermas de fijación de Fósforo

Metodología: Langmuir, D. 1997.- Aqueous environmental geochemistry. Pearson, Prentice Hall. pp. 601.

Descripción: Una fracción de sedimentos se seca en estufa y tamiza por tamiz de 500 μm de poro, luego se incubación con soluciones estándar de diferentes concentraciones de fósforo (0, 1700, 2700, 3700, 4500, 5500, 24 8500, 10000, 15000 y 20000 $\mu\text{g P/L}$) durante 48 horas, en oscuridad y a una temperatura constante (20°C). Posteriormente se determina el fósforo reactivo soluble (PRS) en solución según método 4500-P E (SM 23° edición, 2017).

Agua Intersticial

El agua intersticial se colecta a partir de la centrifugación de una masa de sedimento colectada sacatestigos tipo Uwitec (corer) o similar, extrayendo los primeros 5 cm de sedimentos. Al extracto obtenido se le realizan las determinaciones de PT y PRS de acuerdo a las metodologías descritas precedentemente para muestras de agua.

NOTA: SM, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA; AWWA, WEF 23° edition 2017, o en caso de ediciones anteriores: 18ª (1992), 19ª (1995), 20ª (1998), 21ª (2005) y 22ª (2012).

ADENDA 1

Protocolo GESAP: Medición de Sustancias Disueltas Orgánicas de Color (CDOM) con Espectrofotómetro.

MEDICIÓN DE SUSTANCIAS DISUELTAS ORGÁNICAS DE COLOR (CDOM) CON ESPECTROFOTÓMETRO

Resumen de método siguiendo protocolos de la NASA (Mitchell et al., 2003)



Insumos y equipamiento:

Aparato de filtrado, (preferentemente vidrio), filtros GF/F (fibra de vidrio) y filtros de 0.22 μm (membranas de: policarbonato tipo Whatman, Nucleopore o de fluoruro de polivinilideno, PVDF), agua de alta pureza Milli-Q o similar, cubetas de cuarzo (paso óptico dependiente del ambiente, 1cm a 10 cm paso óptico), espectrofotometro doble haz.



Detalle Metodología:

La absorción por CDOM en muestras de agua discretas se caracteriza por escaneos espectrofotométricos UV-visible realizados en agua de lago filtrada a través de filtros GF/F y posteriormente el filtrado es nuevamente filtrado por membranas de 0.22 μm en un sistema de filtración de vidrio.

La densidad óptica DO (absorbancia) del CDOM se mide en un espectrofotómetro de doble haz equipado con una celda de cuarzo de 1 a 10 cm de paso óptico (dependiendo la concentración de sustancias disueltas). La absorbancia se debe registrar entre los 250 y 750 nm a intervalos de 1 nm. La referencia o blanco de la medición debe ser agua de alta calidad tipo Milli-Q. Los coeficientes de absorción del CDOM, en m^{-1} , se calculan de la siguiente manera:

$$a_{\text{cdom}}(\lambda) = 2.303 \cdot DO_s(\lambda)/l$$

Donde l es la longitud de paso óptico de la cubeta expresada en metros y $DO_s(\lambda)$ es la densidad óptica del filtrado en relación con el agua purificada.

Debe tenerse en cuenta que la DO es una cantidad adimensional. El uso de logaritmos de base 10 en este contexto es un remanente de la práctica común en la espectroscopia química y es el resultado típico de los espectrofotómetros comerciales que se utilizan de forma rutinaria para estos métodos. Por lo tanto, es necesario convertir las medidas descritas en este capítulo a la representación base-e de la absorbancia, es decir, multiplicar por 2.303, para cumplir con la convención utilizada en todos los protocolos de hidrología óptica. Los espectros de CDOM se corrigen por la dispersión residual de partículas de tamaño fino, microburbujas de aire o diferencias en el índice de refracción entre la muestra y la referencia restando el valor promedio de DO entre 650 y 750 nm a todo el espectro (Mitchell et al., 2003).



Tips de la Metodología

- Los materiales de vidrio deben limpiarse previamente con ácido diluido y posteriormente lavado con agua de alta pureza reiteradamente antes del uso.
- Los filtros GF/F deben ser previamente combustionados a 450 °C. Filtros y membranas deben ser humedecidos con agua de alta pureza antes del uso.
- Es importante que las muestras de agua no estén en contacto con la luz solar dado que el CDOM es muy fotosensible.
- Las muestras ya filtradas se reservan en botellas de vidrio, previamente combustionadas o lavadas con ácido, en la heladera. Pueden almacenarse de 1 a 2 semanas en estas condiciones.
- Las muestras filtradas y el agua de referencia deben estar a una temperatura similar para evitar valores negativos en el espectro. Para esto se pueden poner en un baño a temperatura ambiente antes de realizar la medición.
- La medición en el espectrofotómetro se realiza poniendo primero las dos cubetas (muestra y referencia) con agua Milli-Q o similar. Se realiza el blanco de medición. Luego sin cambiar nada se puede realizar una medición para tener un registro de la calidad del blanco. Por último, se coloca la muestra en la celda correspondiente y se realiza la medición. La medición se puede efectuar varias veces para tener un espectro promedio.
- Es importante que el paso óptico de las cubetas esté muy limpio, sobre todo cuando hay poca señal.
- Los espectros de CDOM no suelen presentar picos y valles muy marcados, siendo representados por una función exponencial negativa (ver figura 1).

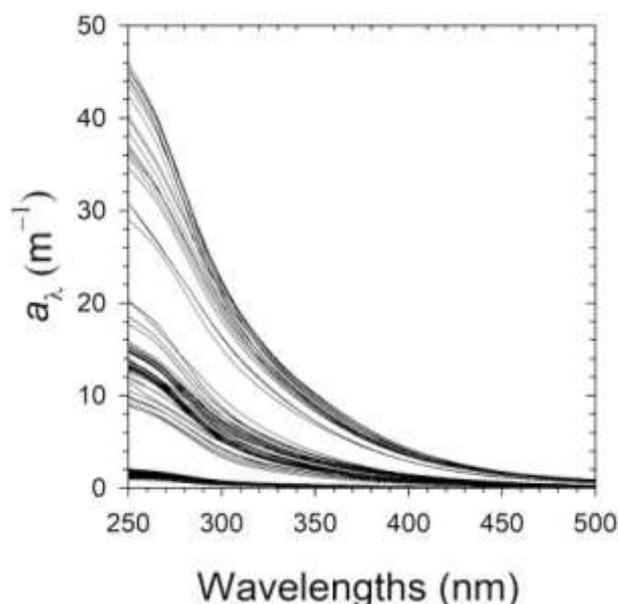


Figura 1: Espectros lagos profundos y someros Parque Nacional Nahuel Huapi.

Bibliografía

Mitchell, B.G., M. Kahru, J. Wieland, and M. Stramska (2003). *Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved materials and phytoplankton for discrete water samples*, in: Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 4, Inherent optical properties: instruments, characterization, field measurements and data analysis protocols, edited by: Mueller J. L., Fargion, G. S. and McClain, C. R., NASA Tech. Rep., Greenbelt, Maryland, 9 : 39–64.

ADENDA 2

Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los métodos aplicados para el análisis de los plaguicidas.

Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los métodos aplicados para el análisis de plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, fungicidas y antiescaldantes, incluidos en los planes de monitoreos correspondientes al convenio AIC-FaIN-UNCo.

ORGANOCOLORADOS		
Compuesto	LD (µg/L)	LC (µg/L)
α- HCH	0,0003	0,001
β – HCH	0,0003	0,001
γ – HCH	0,0003	0,001
δ - HCH	0,0003	0,001
Aldrin	0,0009	0,003
Endrin	0,002	0,008
Endrin aldehido	0,002	0,008
Dieldrin	0,0003	0,001
Heptacloro	0,0009	0,003
Heptacloro Epoxido	0,002	0,006
op' DDT	0,0003	0,001
pp' DDT	0,002	0,006
op' DDD	0,0003	0,001
pp' DDD	0,0003	0,001
op' DDE	0,0003	0,001
pp' DDE	0,0003	0,001
Endosulfan I	0,0003	0,001
Endosulfan II	0,0003	0,001
Endosulfan sulfato	0,0003	0,001
Metoxicloro	0,0003	0,001
α -Clordane	0,002	0,006
λ- Clordane	0,002	0,006

ORGANOFOSFORADOS		
Compuesto	LD (µg/L)	LC (µg/L)
Propoxur	0,020	0,060
Dimetoato	0,020	0,060
Diazinon	0,020	0,060
Metilparation	0,020	0,060
Fenitroton	0,020	0,060
Malation	0,020	0,060
Fention	0,020	0,060
Metilclorpirifos	0,020	0,060
Clorpirifos	0,010	0,050
Paration	0,020	0,060
Clorfenvinfos	0,020	0,060
Metidation	0,010	0,030
Fenamifos	0,020	0,060
Triazofos	0,020	0,060
Fosmet	0,020	0,060
Metilazinfos	0,020	0,060
Etilazinfos	0,020	0,060

CARBAMATOS		
Compuesto	LC (µg/L)	LC (µg/L)
Carbofuran	0,030	0,110
Pirimicarb	0,030	0,110
Carbaril	0,030	0,110

PIRETROIDES		
Compuesto	LD (µg/L)	LC (µg/L)
Bifentrin	0,010	0,030
Lamdacialotrina	0,010	0,030
Cipermetrina	0,010	0,030
Fenvalerato	0,010	0,030
Deltametrina	0,010	0,030

FUNGICIDAS		
Compuesto	LD (µg/L)	LC (µg/L)
Metiltiofanato	0,200	0,280
Carbendazim	0,180	0,230
Tiabendazol	0,190	0,240

ANTIESCALDANTES		
Compuesto	LD (µg/L)	LC (µg/L)
Difenilamina	0,050	0,150
Etoxiquina	0,050	0,150