

# HIGIENE Y SANIDAD AMBIENTAL

*Hig. San. Amb.* **1**: 1-7 (2001)

## Dirección

Prof. Miguel Espigares García

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada, España. Telf. 958 243 169. Fax. 958 249 958. Email: [mespigar@ugr.es](mailto:mespigar@ugr.es)

## Comité de redacción

Prof. Milagros Fernández-Crehuet Navajas. E-mail: [fcrehuet@ugr.es](mailto:fcrehuet@ugr.es)

Prof. Pablo Lardelli Claret. E-mail: [lardelli@ugr.es](mailto:lardelli@ugr.es)

Prof. Obdulia Moreno Abril. E-mail: [omoreno@ugr.es](mailto:omoreno@ugr.es)

Prof. José Antonio Pérez López. E-mail: [japerez@ugr.es](mailto:japerez@ugr.es)

## Redacción

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada, España. Telf. 958 243 169. Fax. 958 249 958. Email: [mespigar@ugr.es](mailto:mespigar@ugr.es)

---

*Higiene y Sanidad Ambiental* es una revista electrónica en español, de difusión gratuita, que publica trabajos de investigación originales, revisiones y procedimientos técnicos, con un contenido relativo al área científica de Higiene y Sanidad Ambiental: criterios de calidad ambiental; contaminación de agua, aire y suelo; análisis de riesgos y exposición ambiental, industrial y laboral; epidemiología ambiental; técnicas de saneamiento; higiene de los alimentos; higiene hospitalaria; antibióticos, desinfección y esterilización; tratamiento de aguas y residuos sólidos; etc. También podrán ser publicados artículos relativos a la docencia universitaria de estos contenidos.

Los artículos para la publicación en la revista *Higiene y Sanidad Ambiental*, deben ser enviados a la Dirección de la revista en soporte electrónico con formato de Microsoft Word (o compatible), con un estilo editorial internacionalmente aceptado en las publicaciones científicas (título, resumen, palabras clave, introducción, material y métodos, resultados, discusión, bibliografía, etc.).

Las suscripciones a la revista *Higiene y Sanidad Ambiental* son gratuitas y se pueden realizar mediante el envío de un correo electrónico dirigido a la Dirección o Comité de Redacción.

## Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización.

A. Álvarez Alcántara, E. Espigares Rodríguez y R. Gálvez Vargas

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Avenida de Madrid, 11. 18012 Granada, España. Telf. 958 243 543. E-mail: [mespigar@ugr.es](mailto:mespigar@ugr.es)

---

### FUNDAMENTO

Los antisépticos y desinfectantes son sustancias químicas capaces de eliminar los microorganismos patógenos. Para que esta acción sea eficaz se debe desarrollar en un breve periodo de tiempo y su acción debe ser bactericida. Para valorar la actividad de un antiséptico o desinfectante, se determina su concentración mínima bactericida (CMB). Para ello, los procedimientos más utilizados son los tests *in vitro* cuantitativos con microorganismos en suspensión, y entre ellos el método de dilución-neutralización, que se aplica para la valoración de antisépticos y desinfectantes para los que existe un neutralizante. La CMB es la mínima concentración de desinfectante ensayada capaz de reducir en 5 unidades logarítmicas ( $10^{-5}$ ) una suspensión de bacterias en 5 minutos de contacto con el desinfectante a 20 °C (Russel et al., 1999; AFNOR, 1995).

De acuerdo con las técnicas normalizadas (AENOR, 1997; AFNOR, 1995), para el método de dilución-neutralización se parte de una suspensión bacteriana que debe contener entre  $1 \times 10^8$  y  $3 \times 10^8$  bacterias/ml.

Para el ensayo del desinfectante, de acuerdo con los volúmenes que se proponen, la dilución-neutralización se realiza llevando 0.25 ml de solución de desinfectante (con las bacterias) a 2.25 ml de neutralizante, es decir se hace una dilución 1/10. En el ensayo del neutralizante, a 1 ml de neutralizante se añade 1ml de solución de desinfectante, es decir, una dilución 1/2. Por ello, para el ensayo de neutralización se utiliza el desinfectante a concentración 1/5, para que el ensayo de neutralización se realice a la misma concentración que el ensayo del desinfectante ( $1/2 \times 1/5 = 1/10$ ).

Se deben utilizar los volúmenes que mejor se adapten al material de laboratorio disponible, pero siempre respetando las proporciones y concentraciones establecidas.

### REACTIVOS

#### Agua destilada estéril

Repartir en botellas con 100 y 500 ml y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

#### Agar mantenimiento

Peptona tríptica de caseína, 15 g  
Peptona de soja, 5 g  
Cloruro sódico, 5 g  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml

Disolver en ebullición, repartir a 10 ml/tubo y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Al sacar del autoclave, antes de su solidificación poner los tubos inclinados para que queden con lengüeta.

#### Agar recuento

Extracto de levadura, 2.5 g  
Peptona tríptica de caseína, 5 g  
Glucosa, 1 g  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml

Disolver en ebullición, repartir a 15 ml/tubo y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

#### Desinfectante

Se prepara a concentración C/0.9 de la que se quiere ensayar (ya que se añaden 9 ml de solución de desinfectante y 1 ml de suspensión bacteriana). Las diluciones se realizan con agua destilada estéril.

### Neutralizante

Se prepara a doble concentración (ya que cuando se realiza el ensayo del neutralizante sufre una dilución 1/2). Debe ser esterilizado en la forma conveniente, según su composición. Aunque es enorme la diversidad de neutralizantes, así como las variaciones en su composición, a continuación se exponen algunos ejemplos de neutralizantes, a los que para mayor simplicidad se han nombrado con letras (en las TABLAS 1 a 3 se exponen ensayos de estos neutralizantes).

#### Neutralizante A

Se ha ensayado su eficacia para los desinfectantes glutaraldehído (TABLA 1), ácido peracético e hipoclorito sódico.

Su composición a doble concentración ( $\times 2$ ) es la siguiente:

Tween 80, 30 ml (32.25 g)  
Bisulfito sódico al 40%, 6.25 ml  
Tiosulfato sódico-5H<sub>2</sub>O, 3.922 g  
Diluyente (triptona-sal), c.s.p. 250 ml

Poner un vaso de 50 o 100 ml en la balanza y añadir con una pipeta Tween 80 hasta 32.25 g. Disolver en varias alícuotas de diluyente (hasta arrastrar todo el contenido del vaso), que se transvasan a un matraz aforado de 250 ml. Añadir en el matraz diluyente hasta completar 2/3 del volumen aproximadamente. Pesar y añadir el resto de los componentes hasta su disolución, y a continuación, completar con diluyente hasta 250 ml.

Ajustar a pH 7 con una solución de NaOH y esterilizar por filtración (Millipore, 0.45  $\mu$ m). Si se van a utilizar pequeñas cantidades la filtración se puede hacer en alícuotas de 10-20 ml.

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añade igual volumen de diluyente (no de agua destilada).

#### Neutralizante B

Se ha ensayado su eficacia para el desinfectante merbromina (TABLA 2).

Su composición a doble concentración ( $\times 2$ ) es la siguiente:

Tween 80, 30 ml (32.25 g)  
Bisulfito sódico al 40%, 6.25 ml  
Tiosulfato sódico-5H<sub>2</sub>O, 3.922 g  
Tioglicolato sódico, 2.5 g  
L-cisteína, 0.75 g  
Diluyente (triptona-sal), c.s.p. 250 ml

Poner un vaso de 50 o 100 ml en la balanza y añadir con una pipeta Tween 80 hasta 32.25 g. Disolver en varias alícuotas de diluyente (hasta arrastrar todo el contenido del vaso), que se transvasan a un matraz aforado de 250 ml. Añadir en el matraz diluyente hasta completar 2/3 del volumen aproximadamente. Pesar y añadir el resto de los componentes hasta su disolución, y a continuación, completar con diluyente hasta 250 ml.

Ajustar a pH 7 con una solución de NaOH y esterilizar por filtración (Millipore, 0.45  $\mu$ m). Si se van a

utilizar pequeñas cantidades la filtración se puede hacer en alícuotas de 10-20 ml.

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añade igual volumen de diluyente (no de agua destilada).

#### Neutralizante C

Se ha ensayado su eficacia para el desinfectante clorhexidina (TABLA 3).

Su composición a doble concentración ( $\times 2$ ) es la siguiente:

Tween 80, 30 ml (32.25 g)  
Bisulfito sódico al 40%, 6.25 ml  
Tiosulfato sódico-5H<sub>2</sub>O, 3.922 g  
Lecitina, 1 g  
Diluyente (triptona-sal), c.s.p. 250 ml

La lecitina forma una suspensión coloidal que no puede ser esterilizada por filtración. Por ello se prepara el neutralizante sin la lecitina, que se añade finalmente.

Poner un vaso de 50 o 100 ml en la balanza y añadir con una pipeta Tween 80 hasta 32.25 g. Disolver en varias alícuotas de diluyente (hasta arrastrar todo el contenido del vaso), que se transvasan a un matraz aforado de 250 ml. Añadir en el matraz diluyente hasta completar 2/3 del volumen aproximadamente. Pesar y añadir el resto de los componentes (excepto la lecitina) hasta su disolución, y a continuación, completar con diluyente hasta 250 ml.

Ajustar a pH 7 con una solución de NaOH y esterilizar por filtración (Millipore, 0.45  $\mu$ m).

En condiciones de esterilidad pesar 1 g de lecitina y añadirlo a la solución estéril previamente preparada, agitando hasta su disolución (se puede utilizar un agitador magnético, introduciendo una varilla magnética estéril).

Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añade igual volumen de diluyente (no de agua destilada).

#### Diluyente (triptona-sal)

Peptona de caseína, 1 g  
Cloruro sódico, 8.5 g  
Agua destilada, 1000 ml

Disolver en ebullición, ajustar el pH a 7.2 y esterilizar en autoclave 20 minutos a 121°C.

## PROCEDIMIENTO

### Suspensiones bacterianas

- 1) Las cepas que van a ser utilizadas se siembran en la superficie de un tubo de *agar mantenimiento*, y se incuban a 37 °C. A las cepas se le dan 3 pases de cultivo en *agar mantenimiento*, es decir, la operación descrita se realiza otras dos veces con intervalos de 18-24 horas. En las cepas de crecimiento más lento, como por ejemplo

*Enterococcus faecium* y *Mycobacterium smegmatis*, los intervalos para los pases serán de 42-48 horas.

- 2) Fundir en ebullición 2 tubos de *agar recuento* para cada cepa y mantener el medio de cultivo en sobrefusión en baño termostatzado a 50 °C.
- 3) Poner en un tubo estéril 10 ml de *diluyente*. Arrastrar con el asa el cultivo anteriormente obtenido y ponerlo en el diluyente, agitando hasta obtener una suspensión bacteriana homogénea.
- 4) Ajustar la suspensión bacteriana midiendo en el espectrofotómetro a 620 nm hasta obtener los siguientes valores de absorbancia:
  - 0.2 - 0.3 Bacilos Gram negativos
  - 0.3 - 0.4 Cocos Gram positivos
  - 0.4 - 0.5 Micobacterias

Estos valores de absorbancia corresponden a cubetas con 1cm de paso de luz (algunos espectrofotómetros permiten la lectura de absorbancia en los tubos de cultivo directamente, lo

cual simplifica la operación, aunque es necesario tener en cuenta que si el paso de luz es mayor a 1 cm habrá que disminuir los valores de absorbancia anteriormente indicados).

Estas *suspensiones de ensayo* así ajustadas deben contener  $1-3 \times 10^8$  bacterias/ml.

- 5) A partir de estas suspensiones bacterianas de ensayo, utilizando *diluyente* y tubos estériles, se preparan diluciones seriadas. Los volúmenes se han ajustado para el uso de micropipetas de volumen regulable de 1 ml y de 5 ml. Cada dilución se prepara tomando la cantidad señalada de la dilución anterior y se pone en la cantidad de diluyente indicada, agitándose vigorosamente durante 5-10 segundos. Para las micropipetas mencionadas se utilizan los volúmenes que se indican en la siguiente tabla:

Nº de tubo	1	2	3	4	5	6
Dilución de la concentración anterior	1/10	1/10	1/10	1/10	1/5	1/20
Suspensión bacteriana en diluyente (ml)	0.4 en 3.6	0.4 en 3.6	0.4 en 3.6	0.4 en 3.6	0.8 en 3.2	0.2 en 3.8
Concentración bacteriana (bacterias/ml)				$1-3 \times 10^4$	$2-6 \times 10^3$	$1-3 \times 10^2$

La suspensión de ensayo (que contiene  $1-3 \times 10^8$  bacterias/ml) y los tubos nº 5 y 6 se conservan en baño termostatzado a 20 °C, y el resto de los tubos se desechan.

- 6) Tomar 1 ml de la dilución nº 6 ( $1-3 \times 10^2$  bacterias/ml), ponerlo en un tubo de *agar recuento* en sobrefusión a 50 °C, vertiendo rápidamente el contenido del tubo en una placa petri. Mezclar bien antes de la solidificación, con movimiento circular y sin que el agar alcance la tapa de la placa petri. Repetir la operación para obtener dos placas de recuento. Dejar solidificar, invertir las placas e incubar al menos 48 horas a 37 °C (según las cepas). Transcurrido este tiempo, se realiza el recuento de colonias en las placas, y se obtiene el valor medio de las dos placas (R).

#### Ensayo del neutralizante

1. Fundir al bañomaría 6 tubos de *agar recuento* para cada neutralizante/desinfectante, y mantener en sobrefusión en baño termostatzado a 50 °C.
2. Para cada neutralizante y/o cepa bacteriana se preparan 2 tubos que continen cada uno:
  - Tubo A: 1 ml de agua destilada estéril.
  - Tubo B: 1 ml de desinfectante a concentración 1/5 de la máxima de ensayo.

En las siguientes operaciones es muy importante controlar el tiempo, por lo que se utilizará un cronómetro y se realizarán las operaciones en los tubos siempre en el mismo orden. Es fácil trabajar simultáneamente con 10 tubos, separando 20 segundos la misma operación en cada tubo.

3. Añadir en cada uno de los tubos anteriores 1 ml de neutralizante a doble concentración. Agitar y mantener durante 10 minutos a 20 °C.
4. Transcurrido este tiempo, añadir en cada tubo 0.1 ml de la dilución bacteriana nº 5 ( $2-6 \times 10^3$  bacterias/ml). Agitar y mantener durante 5 minutos a 20 °C.
5. A continuación, tomar de cada tubo dos alícuotas de 1 ml y proceder al recuento en placa, como se ha descrito anteriormente (se obtienen 2 placas del tubo A y otras 2 placas del tubo B). Incubar al menos 48 horas a 37 °C (según las cepas).
6. Transcurrido este tiempo, se realiza el recuento de colonias en las placas. Se obtiene el valor medio de las dos placas controles en las que se adicionó agua destilada (C), y el valor medio de las dos placas con desinfectante (n). Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50 % de las células bacterianas sean protegidas, es decir, que  $n \geq 0.5 C$ .

#### Ensayo del desinfectante

1. Fundir al bañomaría el número necesario de tubos de *agar recuento* y mantener en sobrefusión en baño termostatzado a 50 °C.
2. Preparar tubos con 2.25 ml de *neutralizante a concentración simple*.
3. Preparar tubos con 0.9 ml de cada concentración de *desinfectante*.

En las siguientes operaciones es muy importante controlar el tiempo, por lo que se utilizará un cronómetro y se realizarán las operaciones en los

tubos siempre en el mismo orden. Como se ha señalado anteriormente, es fácil trabajar simultáneamente con 10 tubos, distanciando 20 segundos la misma operación en cada tubo.

4. Añadir 0.1 ml de la *suspensión de ensayo* ( $1-3 \times 10^8$  bacterias/ml) a cada tubo de desinfectante. Agitar y mantener durante 5 minutos a 20 °C.
5. Transcurrido este tiempo, tomar 0.25 ml de cada tubo y añadirlo a un tubo con neutralizante (2.25 ml a concentración simple). Agitar y mantener durante 10 minutos a 20 °C.
6. A continuación, tomar de cada uno de estos tubos dos alícuotas de 1 ml y proceder al recuento en placa, como se ha descrito anteriormente (se obtienen 2 placas por cada concentración de desinfectante utilizada). Incubar al menos 48 horas a 37 °C (según las cepas).
7. Transcurrido este tiempo, se realiza el recuento de colonias en las placas. Se obtiene el valor medio de las dos placas de cada concentración de desinfectante (d).

Para que una concentración de desinfectante sea bactericida se tiene que producir una reducción de  $10^5$  en el número de células bacterianas, es decir,

$$d \leq (C/10)$$

Para calcular la reducción logarítmica es necesario tener en cuenta lo siguiente: Se parte de los datos obtenidos en el recuento de la suspensión bacteriana (que hacemos mediante diluciones sucesivas hasta un total de  $10^{-6}$ ). Por tanto, el valor inicial de la suspensión es  $C \times 10^6$ , que sufre una dilución 1/10 en el desinfectante, y otra dilución 1/10 en el neutralizante, con lo que quedaría  $C \times 10^4$ . La reducción logarítmica se calculará de la siguiente forma:

$$\log (C \times 10^4) - \log d$$

**TABLA 1. Ensayo del neutralizante A frente al glutaraldehído.**

**Neutralizante A:** Tween 80, 6 %; bisulfito sódico, 0.5 %; tiosulfato sódico, 0.5 %; triptona-sal, c.s.p. 100 ml.

**Desinfectante:** Glutaraldehído al 1 % (Instrunet. Lote N-27). Para el ensayo se utiliza una dilución 1/5, es decir, al 0.2 %.

**Cepa bacteriana:** *Salmonella london* HFG 21-2

**Recuentos en placa:**

	Placa 1*	Placa 2*	Media*
R	289	310	300
C	292	378	335
n	281	279	280

\* Ufc/ml. R: recuento de la suspensión madre (dilución  $10^{-6}$ ); C: 5 minutos de contacto de los gérmenes con el neutralizante; n: 10 minutos de contacto entre desinfectante y neutralizante, y después 5 minutos en contacto con los gérmenes.

Criterios de validez del neutralizante:

$$R \cong C ; n \geq 0,5 C$$

**Interpretación:** Neutralizante efectivo.

**TABLA 2. Ensayo del neutralizante B frente a merbromina.**

**Neutralizante B:** Tween 80, 6 %; bisulfito sódico, 0.5 %; tiosulfato sódico, 0.5 %; tioglicolato sódico, 0.5 %; L-cisteína, 0.15 %; triptona-sal, c.s.p. 100 ml.

**Desinfectante:** Merbromina al 2% (Mercurocromo Pérez Jiménez. Lote P-8). Para el ensayo se utiliza una dilución 1/5.

**Cepa bacteriana:** *Salmonella hadar* HFG 55-1

**Recuentos en placa:**

	Placa 1*	Placa 2*	Media*
R	290	257	273
C	165	185	175
n	190	230	210

\* Ufc/ml. R: recuento de la suspensión madre (dilución  $10^{-6}$ ); C: 5 minutos de contacto de los gérmenes con el neutralizante; n: 10 minutos de contacto entre desinfectante y neutralizante, y después 5 minutos en contacto con los gérmenes.

Criterios de validez del neutralizante:

$$R \cong C ; n \geq 0,5 C$$

**Interpretación:** Neutralizante efectivo.

**TABLA 3. Ensayo del neutralizante C frente a clorhexidina.**

**Neutralizante C:** Tween 80, 6 %; bisulfito sódico, 0.5 %; tiosulfato sódico, 0.5 %; lecitina, 0.4 %; triptona-sal, c.s.p. 100 ml.

**Desinfectante:** Digluconato de clorhexidina 0.5 %  
(Laboratorios Grifols, S.A. Lote R-06).

Criterios de validez del neutralizante:  
 $R \cong C$  ;  $n \geq 0,5 C$

**Cepa bacteriana:** *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22

**Interpretación:** Neutralizante efectivo.

**Recuentos en placa:**

	Placa 1 *	Placa 2 *	Media *
R	119	139	129
C	122	134	128
n	76	82	79

\* Ufc/ml. R: recuento de la suspensión madre (dilución  $10^{-6}$ ); C: 5 minutos de contacto de los gérmenes con el neutralizante; n: 10 minutos de contacto entre desinfectante y neutralizante, y después 5 minutos en contacto con los gérmenes.

**BIBLIOGRAFÍA**

- AENOR (1997): *Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos.* UNE-EN 1040. AENOR. Madrid.
- AFNOR (1995): *Antiseptiques et désinfectants.* NF T 72-150. 3ª ed. AFNOR. París.
- Russel, A.D., Hugo, W.B. y Ayliffe, G.A.J. (1999): *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.* 3ª ed. Blackwell Science Ltd. Oxford.

## Determinación de cloro residual. Método del DPD.

M. Fernández-Crehuet Navajas, O. Moreno Abril y J. A. Pérez López

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada, España. Telf. 958 243 169. Fax. 958 249 958. E-mail: [japerez@ugr.es](mailto:japerez@ugr.es)

### FUNDAMENTO

La cloración del agua constituye una práctica sanitaria imprescindible, tanto a nivel de los servicios de abastecimiento público de aguas, como en la práctica de la cloración a otras escalas, incluida la hospitalaria, en la que actualmente ha adquirido una gran importancia como consecuencia de la aparición de brotes de legionelosis.

Cualquier técnica que se utilice para medir cloro residual en el agua debe ser capaz de diferenciar entre cloro residual libre (CRL) y cloro residual combinado (CRC). Cuando se realiza la cloración, sólo en las aguas que presentan CRL se ha satisfecho su demanda de cloro, y existen garantías de una adecuada desinfección.

Habitualmente la determinación de cloro residual en las aguas se realiza mediante O-tolidina, o bien, mediante dietil-p-fenilén diamina (DPD ó DFD). La primera de ellas se realiza de forma sencilla, pero presenta el grave inconveniente de que no permite una buena diferenciación entre CRL y CRC. La O-tolidina presenta una reacción rápida con el CRL, pero a partir de los 5 segundos comienza a reaccionar con el CRC. Esto hace que no se pueda cuantificar el CRL, ya que es prácticamente imposible comparar con una escala de color en tan breve período de tiempo, además de que se puede cometer el error de que un agua mal clorada, es decir, sin CRL pueda ser considerada correctamente clorada al confundir la coloración del CRC con CRL.

La técnica más recomendable es la del DPD, ya que podemos valorar exactamente el contenido en CRL del agua, separadamente del contenido en CRC.

El DPD, a pH= 6.2-6.5, da una coloración roja, proporcional a la concentración de CRL, que puede valorarse volumétricamente con una solución de sulfato ferroso amoniacal, o semicuantitativamente por comparación con una escala de color.

Se realizan dos valoraciones, en la primera de ellas se determina el CRL, mientras que la segunda, tras la adición de yoduro potásico en exceso para liberar el cloro combinado, nos mide el contenido en cloraminas (CRC) transformadas en cloro libre.

Las principales interferencias que pueden aparecer con esta técnica se deben a la presencia de manganeso oxidado, cobre (controlado por el EDTA hasta una concentración de 10 mg/L), halógenos libres (que pueden reaccionar con el DPD e interpretarse como CRL) y, como todas las pruebas basadas en cambios de coloración, la presencia de color, turbidez y elevadas concentraciones de materia orgánica en el agua problema.

### REACTIVOS

#### *Solución de DPD al 0.1%*

Sulfato de DPD pentahidrato*,	1.5 g
(ó 1.1 g de sulfato de DPD anhidro)	
Acido sulfúrico ¼	8 mL
EDTA disódico dihidrato al 0.8 %	25 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Conservar en recipiente de vidrio color topacio y eliminar el reactivo si se colorea. Permanece estable durante un mes.

\* Este reactivo es tóxico, debe manipularse con precaución.

#### *Tampón fosfato*

Fosfato monopotásico (PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K) anhidro	23 g
Fosfato disódico (PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> ) anhidro	12 g
EDTA disódico dihidrato al 0.8 %	50 mL
Agua destilada c.s.p.	500 mL
Cloruro de mercurio (conservante)	10 mg

Nota: el EDTA elimina las interferencias debidas al cobre hasta valores de 10 mg/L.

#### *Solución de sulfato ferroso amoniacal*

Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.106 g  
Acido sulfurico ¼ 1 mL  
Agua destilada c.s.p. 1000 mL

1 mL de esta solución corresponde a  
0.1 mg de cloro. Se conserva durante  
un mes.

#### *Ioduro de potasio exento de iodato*

### PROCEDIMIENTO

La determinación de CRL y CRC se realiza mediante valoración, para lo cual se requiere una bureta de 10 a 25 mL con divisiones de 0.1 mL y un matraz erlenmeyer de 250 mL de capacidad. La bureta se rellena con la solución de sulfato ferroso amoniacal por encima de la marca superior, y a continuación se abre la llave de paso hasta eliminar la burbuja de aire que pudiese estar en la punta de la bureta y el nivel del líquido quede en la marca de enrase. Si se dispone de un agitador magnético, se coloca debajo de la bureta, introduciendo una pequeña varilla magnética en el interior del matraz, y colocando éste sobre el agitador para hacer la valoración en agitación.

Los reactivos se deben añadir en el orden en que se indica, es decir, en primer lugar el tampón fosfato, a continuación el DPD, y finalmente el agua.

#### Medida de cloro residual libre

- 1) Colocar en un matraz de 250 mL, 5 mL de tampón fosfato y 5 mL de solución de DPD.
- 2) Añadir 100 mL del agua problema. Esperar 2 minutos hasta que el color se desarrolle totalmente. Si el agua tiene CRL se observará la aparición de una coloración rosada.
- 3) Colocar el matraz sobre el agitador magnético, en agitación hasta el final de la determinación.
- 4) Titular rápidamente con la solución de sulfato ferroso amoniacal hasta la decoloración. Anotar la cantidad gastada de sulfato ferroso amoniacal.

$$N_1 = n^\circ \text{ de mL gastados.}$$

#### Medida de cloraminas

- 5) Sin quitar el matraz del agitador magnético, y en agitación, añadir en el interior

aproximadamente 1 g de ioduro de potasio. Mantener en agitación hasta su disolución.

- 6) Esperar 2 minutos en reposo. Si el agua contiene cloraminas aparecerá nuevamente una coloración rosada.
- 7) Sin enrasar la bureta, continuar la titulación con sulfato ferroso amoniacal hasta la decoloración.
- 8) En presencia de cantidades elevadas de cloraminas puede revirar la coloración, después de decolorada, por lo que conviene esperar 2 minutos por si esto ocurre, en cuyo caso se completaría la titulación. Anotar la lectura de la bureta.

$$N_2 = n^\circ \text{ total de mL gastados desde el comienzo de la titulación.}$$

### EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

1 mL de la solución de sulfato ferroso amoniacal utilizada en la valoración equivale a 0.1 mg de cloro. Por tanto, multiplicando el número de mililitros gastados por 0.1 obtendríamos el número de miligramos de cloro contenidos en los 100 mL de agua utilizados para la valoración. Para expresar los resultados por litro tendríamos que multiplicar por 10 (100 mL × 10 = 1 L), o lo que es igual, cada mililitro de sulfato ferroso amoniacal gastado equivale a 1 mg/L de cloro (0.1 mg × 10 = 1 mg).

Por tanto, el contenido en cloro del agua, expresado en mg/L (ppm) se obtendrá directamente de las lecturas de la bureta, de la siguiente forma:

$$N_1: \text{ cloro residual libre (ppm)}$$

$$N_2: \text{ cloro residual total (ppm)}$$

$$N_2 - N_1: \text{ cloro residual combinado (ppm)}$$

### BIBLIOGRAFÍA

APHA, AWWA y WPCF (1992): *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. 17ª Edición. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid.

Rodier, J. (1978): *L'analyse de l'eau*. Ed. Dunod. París.