

Master en Ingeniería y Gestión Medioambiental 2007/2008

Módulo: Contaminación Atmosférica

TÉCNICAS ANALÍTICAS

AUTOR: PABLO JOSÉ MOROS GARCÍA

Índice

1. INTRODUCCIÓN	3
2. TIPOS DE TÉCNICAS. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	4
3. PARÁMETROS DE CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO.....	7
4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICO.....	9
5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	29
6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS TOXICOLÓGICO	33
7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS BIOLÓGICO.....	37
8. BIBLIOGRAFÍA	40



1. INTRODUCCIÓN.

Podría afirmarse que una de las principales características del estudio de la Contaminación Ambiental es su interdisciplinaridad. Se trata de un terreno en el que casi todas las ciencias, tanto naturales como sociales, se interrelacionan y complementan contribuyendo a su desarrollo conceptual y metodológico. Dentro de los métodos de estudio, las técnicas de análisis de los contaminantes, y de sus efectos, desempeñan un importante papel.

Descubrir los diferentes elementos que afectan a un sistema contaminado (lo que correspondería al concepto clásico de “análisis” tan propio de las ciencias químicas), establecer la forma en que tales componentes interactúan, y conocer el modo en que el sistema responde ante la alteración (cuestiones más características de la visión “sistémica” de las ciencias biológicas), son puntos clave para abordar los problemas de contaminación ambiental, tanto en lo relativo a la prevención como al diagnóstico, la corrección y la remediación.

El gran desarrollo técnico de las últimas décadas ha suministrado herramientas cada vez más poderosas de análisis, y predicción. Gracias a ellas podemos detectar compuestos xenobióticos en concentraciones de partes por trillón, contar partículas de apenas unos micrómetros de tamaño, o identificar cepas microbianas con rapidez y fiabilidad. Ahora bien, es necesario distinguir entre aquellas técnicas empleadas en la investigación científica, y aquellas otras que, de forma cotidiana, son utilizadas en los laboratorios medioambientales para controlar la contaminación. En esta distinción entran en juego dos poderosos factores estrechamente ligados: los normativos y los económicos.

En los últimos 25 años los países más desarrollados, y especialmente los pertenecientes a la UE, a través de estamentos legislativos nacionales, y supranacionales, han producido abundante normativa ambiental. Parte de esa normativa ha ido dirigida al control de la contaminación, tanto en los medios receptores como en las fuentes emisoras. Para ello indican, generalmente, una serie de parámetros de control, las técnicas a emplear en su evaluación, y los valores de referencia que se deben considerar aceptables. La forma en que las diferentes normas tratan estos aspectos es muy variable: unas señalan parámetros con valores de referencia, en ocasiones difícilmente alcanzables por las técnicas de análisis descritas, otras proporciona valiosos detalles en cuanto a metodología y parámetros de control de calidad a cumplir, y por último las hay tan abiertas a la libre interpretación que el éxito de su implantación queda en manos de la voluntad de las administraciones locales. La lentitud inherente a todo proceso legislativo, junto con la inercia de permanencia de las normas una vez incorporadas al ordenamiento jurídico, hacen que los avances técnicos en materia de análisis se introduzcan en las leyes, por lo general, de manera muy tardía.

Del lado económico nos encontramos con los intereses empresariales, energéticos, urbanísticos, industriales, e incluso en ocasiones de los propios Gobiernos, que ven con recelo toda normativa ambiental a la que deben someter sus actividades, y a la que suelen considerar un recorte a la libertad de mercado. Esta concepción se traduce, la más de las veces, en destinar a labores de seguimiento y evaluación de contaminantes la menor cantidad de dinero posible, prefiriendo hacer sólo lo imprescindible para no situarse al margen de la ley.

Por tanto nos encontramos de un lado con una evolución sin precedentes en tecnologías de investigación de contaminantes, y por otro con un marco político y económico caracterizado por la lentitud en un caso, y por la primacía de la mínima inversión posible en el control cotidiano de fuentes, medios, y efectos, en el otro. Como consecuencia, el grupo de técnicas para análisis de contaminantes y sus efectos a las que, normativamente, debemos ceñirnos representa tan sólo una parte de la totalidad que nos ofrece el desarrollo científico y técnico.

2. TIPOS DE TÉCNICAS. MÉTODOS Y PROCEDMIENTOS.

Atendiendo a los parámetros de control incluidos en las normas legales actualmente en vigor, las técnicas de de análisis pueden clasificarse en cuatro grupos: Químicas, Microbiológicas, Toxicológicas, y Biológicas.

		TIPOS DE TÉCNICAS			
		Químicas	Microbiológicas	Toxicológicas	Biológicas
Atmósfera	<p>Decreto 833/1975. Protección de ambiente atmosférico.</p> <p>R.D. 1613/1985. Calidad del aire (SO₂ y partículas)</p> <p>R.D. 646/1991. Emisión de contaminantes de grandes instalaciones de combustión.</p> <p>R.D. 1073/2002. Aire ambiente (SO₂, NO_x, partículas, Pb, benceno, CO).</p> <p>R.D. 117/2003. Limitación de COVs.</p> <p>R.D. 653/2003. Incineración de residuos.</p>				
Agua	<p>Directiva 2000/60/CE. Directiva Marco.</p> <p>Decisión 2455/2001/CE. Sustancias prioritarias.</p> <p>R.D. 849/1986. Reglamento del Dominio Público Hidráulico.</p> <p>R.D. 734/1988. Aguas de baño.</p> <p>R.D. 995/2000. Sustancias listas I y II.</p> <p>R.D.140/2003. Aguas de consumo</p> <p>R.D. 865/2003. Legionella.</p> <p>R.D. 606/2003. Vertidos.</p> <p>Orden MAM/1873/2004. Modelos de solicitud de vertidos.</p> <p>Ley 10 CAM, y análogas en otras CCAA. Vertidos a la red.</p>	<p>Directiva 2000/60/CE. Directiva Marco.</p> <p>R.D. 734/1988. Aguas de baño.</p> <p>R.D. 865/2003. Legionella</p>	<p>Ley 10 CAM, y análogas en otras CCAA. Vertidos a la red</p>	<p>Directiva 2000/60/CE. Directiva Marco.</p>	

TIPOS DE TÉCNICAS				
	Químicas	Microbiológicas	Toxicológicas	Biológicas
Suelo	R.D.9/2005. Suelos contaminados.		R.D.9/2005. Suelos contaminados.	
Residuos	Orden 13/10/1989. Caracterización de residuos peligrosos. R.D. 1310/1990. Lodos de depuradora. R.D. 363/1995. Clasificación, etiquetado y envasado de sustancias peligrosas. R.D. 952/1997. Constituyentes de residuos peligrosos. Decisión 2003/33/CE. Aceptación de residuos en vertederos.		Orden 13/10/1989. Caracterización de residuos peligrosos. R.D. 363/1995. Clasificación, etiquetado y envasado de sustancias peligrosas. R.D. 952/1997. Constituyentes de residuos peligrosos.	

A parte de las peculiaridades intrínsecas a cada uno, las principales características de estos grupos son:

- Técnicas químicas:
 - Son los que están más arraigadas, tanto en su implantación práctica como en la legislación, al ser las más antiguos.
 - Es más sencillo evaluar en ellas parámetros de control de calidad (límites de cuantificación, incertidumbres, exactitud, precisión), debido a que no están directamente influenciadas por la variabilidad inherente a la materia viva.
 - Son, en general, las más rápidas para evaluar las características de un efluente o de un medio receptor.
- Técnicas microbiológicas:
 - Se encuentran limitadas a contaminantes biológicos, y a su presencia en efluentes y en medios receptores.
- Técnicas toxicológicas:
 - En especial las llamadas ecotoxicológicas, permiten prever la reacción del componente biótico de los ecosistemas ante la contaminación, si bien suelen restringirse a determinados niveles de organización biológica, a determinados eslabones de las cadenas tróficas, y a reacciones “in Vitro”.
 - Son más lentas, en general, que las químicas.
 - Requieren, en general, de una infraestructura muy diferente a la de las químicas, lo que les hace con frecuencia más costosas

- Técnicas biológicas:
 - Tienen en común con las toxicológicas la lentitud, pero a diferencia de estas establecen la respuesta de los ecosistemas “in vivo”, y abarcan un significativo número de elementos bióticos.
 - Son menos costosas en infraestructuras que las anteriores, pero requieren, en general, de personal con un mayor nivel de cualificación.

Cualquier técnica tiene por objeto la determinación, cuantitativa o cualitativa, de un parámetro (un analito, un organismo, una respuesta biológica), mediante equipos e instrumentos, aprovechando alguna propiedad física, química, o biológica, de la materia. Así, las técnicas espectroscópicas se basan en las interacciones posibles que se dan entre la radiación electromagnética y la materia inerte; las técnicas microbiológicas de cultivo aprovechan la capacidad de muchas bacterias para crecer “in vitro” formando colonias, etc.

La aplicación concreta de las diferentes técnicas se lleva a cabo mediante MÉTODOS DE ENSAYO. El método tiene un carácter menos genérico que la técnica, y especifica la forma en que ésta se aplica para la determinación de un parámetro en una matriz y bajo unas condiciones concretas. Actualmente se dispone de un gran número de métodos de ensayo normalizados, redactados y editados por entidades de reconocida solvencia (United State Environmental Protection Agency (USEPA), International Standardization Organization (ISO); etc). En ellos se indica, entre otros: el ámbito de aplicación del método, la manera en que se debe realizar el ensayo, los medios instrumentales, reactivos y fungibles necesarios, y la forma en que se deben realizar los cálculos y expresar los resultados.

Un laboratorio puede realizar sus ensayos de dos maneras diferentes:

- Adaptándose a un método normalizado, lo que implica asumir y seguir punto por punto lo que indique la norma, sin desviarse de ella.
- Elaborando un PROCEDIMIENTO INTERNO. El procedimiento se confecciona a partir de diversas fuentes: métodos normalizados, bibliografía científica, experiencia propia, etc).

Optar por una u otra opción tiene una gran importancia de cara a **validar** un método de ensayo. Por validación se entiende el proceso que permite demostrar si los resultados obtenidos por un método son fiables, reproducibles y permiten utilizarlos para lograr un objetivo dado. Cuando para poner a punto un ensayo elige por seguir un método normalizado, el trabajo de validación suele ser menor que si se opta por un procedimiento interno, pero también suele limitar el rango de aplicación del ensayo. Con todo, la tendencia actual, marcada por las nuevas legislaciones y por los organismos de acreditación, es la puesta a punto de técnicas mediante la incorporación de una norma en lugar de por procedimiento interno.

3. PARÁMETROS DE CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO.

Los “parámetros de calidad de un método analítico” nos permiten conocer si resulta o no adecuado para la resolución de un problema. Los principales de estos parámetros son:

- La exactitud.
- La precisión.
- La sensibilidad.
- El límite de detección.
- El límite de cuantificación.
- Intervalo de linealidad.
- La incertidumbre.
- La selectividad o especificidad.

La exactitud es el grado de concordancia entre un resultado obtenido experimentalmente y el valor real. Ese resultado puede ser el de una medida individual o el de la media de una serie de medidas realizadas sobre un número n de alícuotas idénticas de una misma muestra.

La exactitud puede cuantificarse mediante el *error absoluto* (E_a) o mediante el *error relativo* (E_r):

$$E_a = (\pm) \mu - x$$

$$E_r = (\pm) E_a/x$$

Dónde μ es la media de las medidas, y X el valor verdadero.

En función del error relativo se pueden considerar tres tipos de métodos de análisis químicos:

Veraz, si $E_r < 1\%$

Moderadamente veraz, si E_r está entre el 1% y el 5%

Poco veraz, si $E_r > 5\%$

La precisión mide el grado de dispersión que presenta una serie de resultados obtenidos con replicados de la misma muestra. Cuanto mayor es la precisión de un método, mayor será su reproducibilidad: cuando se repita el análisis en momentos, e incluso en laboratorios, distintos, se obtendrán siempre resultados similares.

La forma matemática de expresar la precisión es el coeficiente de variación (CV), que es el cociente entre la desviación normal de una serie de medidas (s) y su media (μ) expresado en %:

$$CV (\%) = (s/\mu).100$$

La sensibilidad de un método analítico es la relación entre la variación de la señal analítica medida y la variación de la concentración del analito que la provoca:

$$S = \Delta x / \Delta C$$

Dónde:

Δx es el incremento de la señal

ΔC es el incremento de la concentración del analito

El límite de detección (LD) es la concentración más baja de analito que puede detectarse aunque no cuantificarse con exactitud. Formalmente se define como la cantidad mínima de analito que origina una señal analítica (X_{LD}) estadísticamente distinta a la generada por el blanco (μ_B). Se considera estadísticamente distinta si supera tres veces la desviación estándar de la señal del blanco:

$$X_{LD} = \mu_B + 3s_B$$

El límite de cuantificación (LC) es la concentración más baja de analito que puede cuantificarse con exactitud. Numéricamente es la concentración mínima de analito que origina una señal analítica (X_{LD}) diez veces superior a la generada por el blanco (μ_B). Se considera el límite inferior del rango lineal del método, esto es, del intervalo de concentraciones donde el método es aplicable:

$$X_{LD} = \mu_B + 10s_B$$

El intervalo de linealidad es el rango de concentraciones del analito en el que el método es aplicable, esto es, en el que la relación concentración/señal es ajustable a la ecuación de una recta. El límite inferior de este rango viene dado por el límite de cuantificación.

La incertidumbre del método marca el intervalo de valores dentro del cual se espera encontrar el valor verdadero de la magnitud medida. Se trataría del rango en el que, con una probabilidad determinada, se encuentra el valor real del analito. Por ejemplo, una incertidumbre del 10% en el análisis de partículas en emisión mediante un método gravimétrico nos indica que el resultado real de partículas está entre el 10% por arriba y el 10% por debajo de la pesada obtenida. Así, si el valor de la pesada es de 100 mg/filtro, el valor real de partículas estará comprendido entre 90 mg/filtro y 110 mg/filtro.

La selectividad o especificidad es la capacidad de un método para originar resultados que sólo dependan de la cantidad de analito presente en la muestra. Se encuentra relacionada con las interferencias que puedan producir los diferentes componentes de la matriz de la muestra: cuanto menos influyan en la medida más selectivo será el método.

4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICO.

4.1. Pretratamientos.

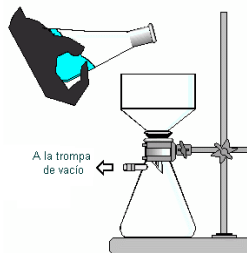
Con frecuencia el analito no se encuentra en la muestra en un estado adecuado para su determinación. La mayoría de las técnicas analíticas necesitan que el analito se encuentre disuelto en un solvente adecuado, y que la concentración de la especie a determinar esté dentro de unos límites; por lo que, en general, la medida no se puede realizar directamente sobre la muestra tal cual. La complejidad y el número de operaciones que se deben realizar en esta parte del proceso de análisis dependen de la naturaleza de la muestra (gas, líquido, o sólido) y del tipo de analito que deseamos medir (inorgánico u orgánico).

En el análisis químico de contaminantes ambientales en el laboratorio, las muestras pueden proceder de muestreos de atmósfera, de agua, de suelo, y de residuos. Las muestras de atmósfera suelen recogerse sobre sustratos captadores (por filtración y por adsorción), y sobre soluciones absorbentes, siendo menos frecuente el muestreo y transporte del gas tal cual hasta el laboratorio (caso de las bolsas tedlar, y recipientes similares). Por ello usualmente nos encontraremos que la matriz de una muestra de atmósfera será líquida o sólida.

Los principales tratamientos a los que se someten las muestras en función de su naturaleza y del tipo de especie química que se quiere analizar se resumen en el cuadro siguiente:

TIPO DE MUESTRAS	TIPO DE ESPECIE QUÍMICA	
	INORGÁNICA	ORGÁNICA
Líquidas y gaseosas	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración • Centrifugación 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción líquido-líquido • Extracción en fase sólida
Sólidas	<ul style="list-style-type: none"> • Lixiviación • Solubilización 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción sólido-sólido • Extracción sólido-líquido

La filtración permite la separación de las partículas sólidas presentes en una muestra líquida o gaseosa. Los sistemas de filtración son dispositivos más o menos complejos que constan de un portafiltro en el que se coloca el filtro sobre el que van a quedar retenidas las partículas. Los filtros pueden ser de muy diferentes formas y materiales, y diámetros de poro muy variables. Los más frecuentes en análisis de contaminantes son los de esteres de celulosa y los de fibra de vidrio, con tamaños de 47 mm de diámetro y porosidad de 0,45 micrómetros.



La centrifugación permite separar las partículas en muestras líquidas. La velocidad y el tiempo de centrifugación dependerán del tamaño de partícula que deseamos separar.



La lixiviación consiste en separar selectivamente algún componente de una muestra sólida mediante una reacción química. Terminada la reacción, los productos resultantes se separan mediante filtración. En química ambiental, el agente lixivante suele ser poco agresivo: agua destilada (caso del método DIN S4) o una disolución de ácido acético diluido (caso del método USEPA), que están en contacto con la muestra durante 24 horas.



La solubilización de una muestra sólida, o de los sólidos presentes en una muestra líquida, puede realizarse de diferentes maneras. Aquí señalaremos cuatro:

- Agitación
- Disolución asistida por ultrasonidos
- Digestión en vaso abierto
- Digestión asistida por microondas

La solubilización mediante agitación trata de lograr la separación del analito de la muestra sólida mediante medios mecánicos. Su variante más sencilla es el empleo de barras agitadoras magnéticas, o de agitadores tipo orbital o de vaivén, en los que se introduce la muestra junto con el disolvente adecuado en un recipiente sometiéndolo a agitación. La solubilización puede acelerarse calentando la mezcla.

La disolución asistida por ultrasonidos, se basa en el empleo de vibraciones sonoras superiores al nivel auditivo humano. Los ultrasonidos agitan la disolución mediante la formación de burbujas microscópicas que se dilatan y contraen. Existe un punto en el que la burbuja se dilata tanto que explota, momento en el que, por un brevísimo instante, se generan, puntualmente, elevadas presiones y temperaturas. Como consecuencia de la agitación de la disolución, y de las pequeñas explosiones, los sólidos de la mezcla se agrietan y fragmenta, facilitándose el paso de los analitos a la disolución. La apli-

cación de ultrasonidos suele hacerse mediante sondas, que se introducen en la disolución, o más usualmente mediante baños relleno con agua en los que se sumerge el recipiente conteniendo la mezcla a tratar.

La digestión en vaso abierto consiste en disolver la muestra sólida con ayuda de soluciones ácidas. El tipo de solución, y su concentración dependerá del analito que deseemos desprender del sólido. El proceso está acompañado de agitación y calefacción.

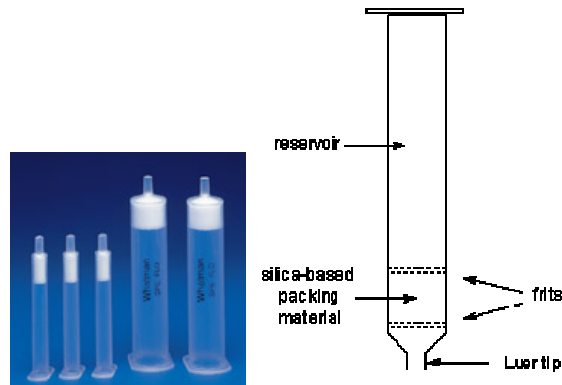
La digestión asistida por microondas aprovecha el efecto que produce este tipo de radiación sobre las disoluciones. Las microondas son ondas electromagnéticas cuya frecuencia esta entre $3 \cdot 10^8$ y $3 \cdot 10^{11}$ Hz. Esta radiación provoca la rotación de las moléculas de agua, la migración de los iones, y el movimiento de los electrones de los metales. Las moléculas de agua ven frenada su rotación al chocar con moléculas circundantes lo que provoca la transformación de esa energía cinética en térmica, calentándose la disolución. Los electrones de los metales ven también frenado su movimiento lo que provoca un rápido calentamiento de los componentes metálicos. La aplicación de esta modalidad de digestión se realiza mediante hornos de microondas dotados de vasos de teflón PFA (perfluoroalkoexitileno), un tipo de teflón con elevado punto de ebullición (306°C). La muestra se introduce en los vasos de teflón, generalmente junto con una mezcla de ácidos adecuada a cada caso. Los vasos van provistos de sensores de temperatura y de presión que detienen la digestión si se superan los valores de seguridad establecidos.



Extracciones. A diferencia de la solubilización, en la que se pasa un analito de un sólido a una disolución circundante; en la extracción lo que se persigue es pasar el analito de una matriz a otra de diferente naturaleza. La extracción suele estar referida a compuestos orgánicos de diferente polaridad a los que se les trata de extraer aprovechando su mayor solubilidad en determinados disolventes.

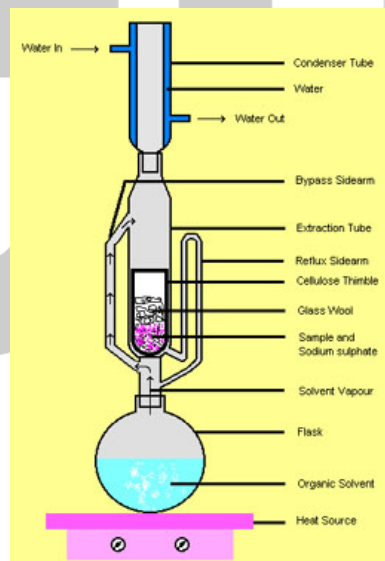
La extracción líquido-líquido consiste en poner en contacto un determinado volumen de muestra líquida con otro de disolvente poco o nada miscible con la muestra pero sí con el analito. La mezcla se agita y posteriormente se deja en reposo hasta que nitidamente aparezcan dos fases fácilmente separables: una polar, correspondiente a la muestra, y otra apolar, que contendrá la especie química que queremos determinar. El dispositivo más empleado para llevarla a cabo es el embudo de decantación.

La extracción en fase sólida (solid phase extraction, o SPE) es un procedimiento que consiste en hacer pasar una porción de muestra líquida, que contiene el analito, a través de un material sorbente (extractante sólido) por el que el analito posee mayor afinidad que por el disolvente en que se encuentra, y sobre el que queda adsorbido. Tras la adsorción, los analitos se eluyen con una pequeña cantidad de otro disolvente extractor con el que interacciona con mayor fuerza que con el sorbente. La SPE no sólo consigue un cambio de matriz, sino que reduce el volumen de la muestra. Se realiza mediante pequeñas columnas abiertas de plástico (entre 3 y 20 ml de capacidad), con una abertura de entrada de mayor diámetro, y otra de salida más pequeña. El sorbente se coloca en el fondo de la columna y suele consistir en sílice modificada con diferentes grupos químicos.



La extracción sólido-sólido consiste en mezclar una pequeña cantidad de muestra sólida con una cantidad similar de extractante, también sólido, y homogeneizar. El homogeneizado se introduce en un cartucho especial por el que se hace pasar un disolvente adecuado a la especie química que queremos determinar, con lo que ésta quedará en disolución.

La extracción sólido-líquido consiste en poner en contacto la muestra sólida con un líquido extractante y someter a la mezcla a una serie de operaciones que permitan que la mayor parte posible del analito a determinar pase de la muestra al disolvente. Entre estas operaciones las más usuales son la agitación mecánica (manual o mediante ultrasonidos) y la extracción con calentamiento mediante dispositivos tipos Soxhlet.



4.2. Tipos de técnicas de análisis químico.

Pueden clasificarse en dos grandes grupos: técnicas *clásicas*, y técnicas *instrumentales*.

- *Las técnicas clásicas* están basadas en reacciones cuantitativas en las que se alcanza el equilibrio químico con la intervención del analito. La propiedad analítica que se mide es la masa o el volumen de analito, de reactivo o del producto de reacción que se consume o genera tras alcanzar el equilibrio químico. La concentración de analito se determina a partir de cálculos estequiométricos. Entre sus principales ventajas está el que pueden aplicarse sin necesidad de un equipamiento ni una cualificación técnica sofisticada. Entre sus desventajas, el que no suelen suministrar límites de cuantificación bajos, y que las incertidumbres asociadas a los métodos de aplicación acostumbran a ser elevadas.
- *Las técnicas instrumentales* están basadas en la medida de una propiedad física de la muestra cuyo valor está relacionado con la concentración de analito, y en la mayoría de los casos con factores ajenos a dicha concentración. Los métodos basados en técnicas instrumentales tienen como principales ventajas, la rapidez de respuesta, la mayor sensibilidad y selectividad, y la posibilidad de automatización. Entre sus desventajas más notables señalar: la influencia del diseño del instrumento, la mayor complejidad, y su mayor coste económico.

4.2.1. Técnicas analíticas clásicas.

En este grupo se encuentran las gravimetrías y las volumetrías.

4.2.1.1. Gravimetrías. Consisten en separar la especie química que se quiere determinar del resto de los componentes de la muestra y proceder a su pesada. A partir de este valor se obtiene la concentración del analito en la muestra inicial.

La instrumentación básica necesaria para el análisis gravimétrico consiste en balanzas analíticas, estufas de secado regulables a las temperaturas que indiquen los métodos de aplicación, y hornos mufla igualmente regulables.



Entre las aplicaciones de estas técnicas en el análisis medioambiental, tenemos:

- La determinación de partículas, procedentes de muestreos atmosféricos.
- La determinación de materia en suspensión, materia disuelta, y materia volátil, presentes en las aguas.
- El análisis de aceites y grasas, en aguas residuales.
- La determinación de sulfatos, en aguas residuales.

4.2.1.2. Volumetrías. En ellas la señal analítica es el volumen de reactivo, de concentración conocida, que se necesita para que reaccione exactamente, de forma directa o indirecta, con la cantidad de analito que queremos determinar. Por ello, tanto el reactivo como la muestra deberán estar en estado líquido. El momento en que se produce el equilibrio de la reacción se conoce gracias a un indicador. El indicador puede ser de muy diferente naturaleza (desprendimiento de calor, cambios en alguna propiedad eléctrica en la disolución, cromogénicos, etc).



La instrumentación básica suele consistir en material de vidrio de uso corriente, buretas (manuales o automáticas), y en ocasiones, según el método de aplicación, algún dispositivo indicador del final de la reacción (electrodos, termómetros, etc).

Las volumetrías, dentro del campo del medio ambiente, se emplean para determinar bastantes parámetros. Algunos de ellos son:

- Óxidos de azufre, en soluciones captadoras procedentes de muestreos atmosféricos.
- Sulfuros, en soluciones captadoras procedentes de muestreos atmosféricos.
- Amoníaco, en soluciones captadoras procedentes de muestreos atmosféricos
- Alcalinidad en matrices líquidas (de atmósfera o de aguas).
- Materia orgánica (tanto en suelos como en residuos y en aguas).

4.2.2. Técnicas analíticas instrumentales.

Dentro del campo de la analítica ambiental, hay tres tipos de técnicas instrumentales muy utilizadas:

- Las técnicas ESPECTROSCÓPICAS.
- Las técnicas SEPARATIVAS O CROMATOGRÁFICAS.
- Las técnicas ELECTROQUÍMICAS.

4.2.2.1. Técnicas ESPECTROSCÓPICAS

Están basadas en las interacciones que se producen entre la materia y la radiación electromagnética. Tales interacciones pueden implicar intercambios de energía, como la absorción o la emisión de radiación. A partir del estudio de esa absorción o de esa emisión se puede determinar la presencia y la cantidad de un analito en la muestra. Las radiaciones electromagnéticas más utilizadas con fines analíticos son la radiación visible (intervalo de longitudes de onda entre los 400 y los 750 nm), la radiación ultravioleta (UV) (intervalo de longitudes de onda entre los 400 y los 200 nm), y la radiación infrarroja (IR) (intervalo de longitudes de onda entre los 750 y los 50 μm).

Todos los átomos o moléculas poseen un número discreto de niveles de energía. En general, a temperatura ambiente, la mayoría de las especies químicas se encuentran en un nivel energético basal o fundamental. Cuando una onda electromagnética alcanza a un átomo o a una molécula, si su energía coincide exactamente con la necesaria para pasar a un nivel energético superior, la radiación es absorbida y la especie química pasa a un estado excitado. La excitación apenas dura unos nanosegundos, al cabo de los cuales la molécula se relaja devolviendo la energía absorbida. Estas transiciones a estados excitados pueden ser de dos clases:

- Electrónicas, cuando se promueve el paso de electrones a orbitales de mayor energía. Se producen como consecuencia de la absorción de radiación visible y UV.
- Vibracionales, asociadas a los modos vibracionales de los enlaces moleculares. Se producen como consecuencia de la absorción de la radiación IR.

Los métodos analíticos basados en la absorción de radiación electromagnética permiten determinar la concentración del analito gracias a la ley de Lambert-Beer, que relaciona absorbancia con concentración a través de la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Donde:

A es la absorbancia de la muestra

ϵ es la absorptividad específica de la especie que estamos estudiando. Depende tanto de la naturaleza química de la especie química como de las condiciones de medida.

b es el espesor de muestra que es atravesado por la radiación

C es la concentración del analito en la muestra

La absorbancia se define como $\log I_0/I$, siendo I_0 la intensidad de la luz incidente e I la intensidad de la luz emergente. Al cociente I/I_0 también se le conoce como TRANSMITANCIA (T), por lo que la absorbancia también puede definirse como:

$$A = -\log T$$

Las técnicas espectroscópicas pueden clasificarse en función de su aplicación a átomos o a moléculas, y en función de que lo medido sea la energía absorbida o emitida. De este modo tendremos:

	Moléculas	Átomos
Absorción	Espectroscopia de absorción molecular en el visible o Colorimetría.	Espectroscopia de absorción atómica (EAA)
	Espectroscopia de absorción molecular en el UV.	
	Espectroscopia IR	
Emisión	Espectroscopia de fluorescencia	Espectroscopia de emisión atómica (EEA)

A continuación revisaremos sucintamente cada una de ellas.

Espectroscopia de absorción MOLECULAR.

El instrumento empleado en las técnicas de espectroscopia de absorción molecular recibe el nombre genérico de espectrofotómetro. Los elementos básicos de un espectrofotómetro son:

- La fuente de radiación
- El monocromador
- Las celdas o cubetas
- Sistema de medida

Estos elementos sufren variaciones según el tipo de espectroscopía de que se trate, si bien la forma en que se ordenan viene a ser siempre la misma.

La **fente de radiación** es el elemento de la radiación que interaccionará con la muestra. Las principales fuentes, según el tipo de espectroscopia, se muestran en el siguiente cuadro:

Radiación	Fuente
Infrarroja	Emisor de incandescencia de Nernst
Visible	Lámparas de incandescencia
Ultravioleta	Lámparas de arco

- El EMISOR DE INCANDESCENCIA DE NERNST consiste en una varilla de unos pocos centímetros de largo y 1 mm de diámetro, de óxido de zirconio. La varilla se calienta con una resistencia eléctrica adyacente hasta alcanzar lo 1800 K, temperatura a la que emite radiación infrarroja. Como a esa temperatura el material de la varilla se hace conductor, se puede mantener la temperatura haciendo pasar una corriente eléctrica. Debido a que el vidrio y el sílice son materiales opacos al IR, no se pueden emplear en la fabricación de fuentes para este tipo de espectroscopia.
- Las LÁMPARAS DE INCANDESCENCIA son lámparas dotadas de un filamento de tungsteno capaz de calentarse hasta 3000° C emitiendo entonces un espectro continuo entre 320 y 750 nm.
- Las LÁMPARAS DE ARCO están formadas por una ampolla hermética rellena de un gas, generalmente Deuterio, y dotadas de dos electrodos conectados a una fuente de energía. Cuando se produce una descarga eléctrica, se excitan las moléculas del gas, y cuando vuelven a su estado fundamental emiten luz ultravioleta en un espectro continuo de 190 a 320 nm.

El **monocromador** es elemento que selecciona una longitud de onda determinada de entre las muchas que parten de la fuente. Para ello está dotado de una serie de lentes, prismas, espejos, y rendijas.

Las **celdas o cubetas** son los dispositivos en los que se coloca la muestra a analizar, y que serán atravesados por la radiación, por lo que deben disponerse perpendicularmente al paso de ésta. Según la clase de radiación se deben usar cubetas de distinta naturaleza:

Radiación	Cubeta
Infrarroja	Cloruro sódico pulimentado
Visible	Plástico, vidrio o cuarzo
Ultravioleta	Cuarzo

El **sistema de medida** es el encargado de detectar la radiación que atraviesa la muestra y transformarla en una corriente eléctrica que se mide una vez amplificada en el circuito electrónico de lectura. Para tal fin suelen emplearse fototubos, y fotodiodos.

Existen dos grandes categorías de espectrofotómetros:

- Espectrofotómetros de haz sencillo
- Espectrofotómetros de doble haz.

En los de haz sencillo el haz de luz sigue una única trayectoria desde la fuente hasta el detector. Estos equipos pueden disponer de una o de dos celdas portamuestras. Cuando tienen una sola celda, hay que realizar primero la medición con la celda con el blanco, y después con la muestra. Cuando existen dos celdas, un sistema mecánico mueve la celda con el blanco después de la medida.

Los espectrofotómetros de doble haz disponen de un sistema óptico, emplazado tras el monocromador, que divide en dos el haz de luz. Ambos haces siguen caminos paralelos y van hasta fotodetectores independientes cuyas señales son integradas y amplificadas, lo que permite medir simultáneamente el blanco y la muestra. Este sistema resulta mucho más estable que el de haz sencillo.

Con frecuencia los equipos de espectrofotometría visible están provistos de fuentes de radiación que les permiten trabajar en el espectro UV.



Las técnicas espectrofotométricas no pueden emplearse en la determinación de cualquier analito, pues la capacidad de absorción de las especies químicas a esas longitudes de onda va a depender de la estructura de la molécula, del tipo de enlaces, y de su absorptividad. Con todo su empleo en química ambiental está muy extendido. Algunas aplicaciones son:

- Determinación de aniones, y de indicadores de contaminación orgánica (DQO, índice de fenoles, detergentes), por espectrofotometría UV-visible. En todos los casos es necesario tratar las muestras con reactivos que permitan un desarrollo del color y una eliminación de las interferencias.
- Determinación de aceites y grasas e hidrocarburos por espectrofotometría de IR.

Espectroscopia de emisión MOLECULAR.

Determinadas moléculas pueden absorber radiación electromagnética excitándose, para luego relajarse emitiendo esa energía en forma de fotones. Este fenómeno también se conoce como FLUORESCENCIA, y la técnica que permite determinar la presencia de un analito fluorescente, ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. Las principales características de la espectroscopia de fluorescencia son:

- Una sensibilidad superior a los métodos de absorción.
- Un mayor intervalo de respuesta lineal que el de los métodos de absorción.
- Una aplicación restringida a un menor número de especies moleculares.
- Un equipamiento más costoso que el de la espectroscopia de absorción.

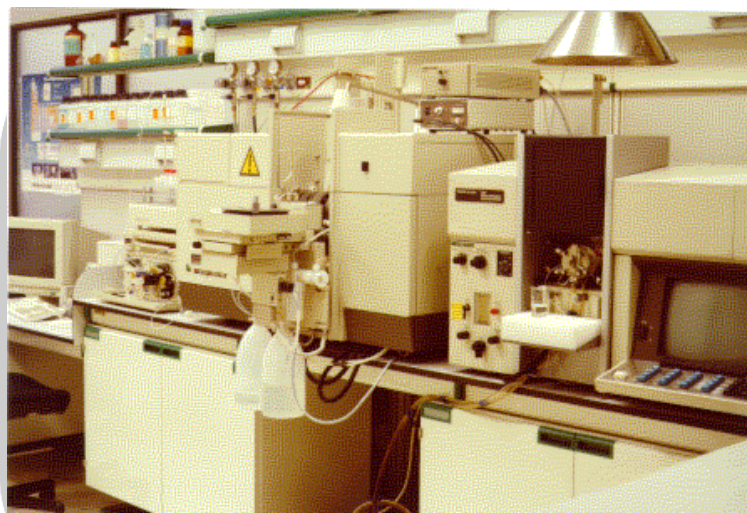
No todas las moléculas fluorescen, porque pueden presentar otras vías de relajación alternativas, por ejemplo las vibracionales. El que una molécula sea o no capaz de fluorescer dependerá en gran medida de su estructura. Así, la mayoría de los compuestos con anillos aromáticos fluorescen, y dentro de éstos lo hacen en mayor cuantía los que presentan estructuras rígidas.

El equipo de medida de fluorescencia, o fluorímetro consta de los siguientes componentes:

- Una fuente de luz,
- Un selector de longitud de onda de entrada
- Una celda, en la que se coloca la muestra
- Un selector de longitud de onda de salida
- Un detector
- Un registrador

Dentro del campo de la química ambiental, la principal aplicación de las técnicas de fluorescencia la encontramos en los detectores de equipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleados en la determinación de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

Espectroscopia de absorción ATÓMICA.



Sus principales características son:

- Se aplica a átomos aislados.
- Sólo se puede llevar a cabo dentro de un medio gaseoso.
- Permite la determinación cuantitativa y cualitativa de 70 elementos químicos.
- Es un método de determinación unielemental.
- En general son rápidos, selectivos y sensibles.

Los componentes de un equipo de absorción atómica son:

- El nebulizador.
- El atomizador.
- La fuente de radiación.
- El monocromador.
- El detector.

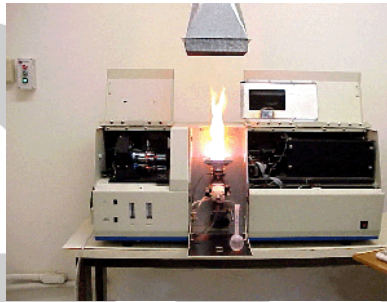
El **nebulizador** es un dispositivo que convierte la muestra líquida en un aerosol que pasa luego al atomizador. Los dos principales tipos de nebulizadores son los *nebulizadores neumáticos* y los *nebulizadores ultrasónicos*.

El *nebulizador neumático* funciona de modo similar a un pulverizador de perfume: una corriente de gas a alta presión choca contra el líquido en la punta de un capilar descomponiéndolo en finas gotas.

El *nebulizador ultrasónico* es un nebulizador neumático en el que las gotas de líquido nebulizado se hacen impactar contra una placa que vibra por efecto de un sistema de ultrasonidos, rompiéndolas en gotas aún más diminutas.

El **atomizador** es el componente encargado de vaporizar la muestra nebulizada. Básicamente se emplean dos tipos: los *atomizadores de llama*, y los *atomizadores electrotérmicos*.

El *atomizador de llama* consiste en un quemador alimentado por una mezcla de combustible y oxidante, capaz de alcanzar temperaturas de entre 1700 y 3100 °C.

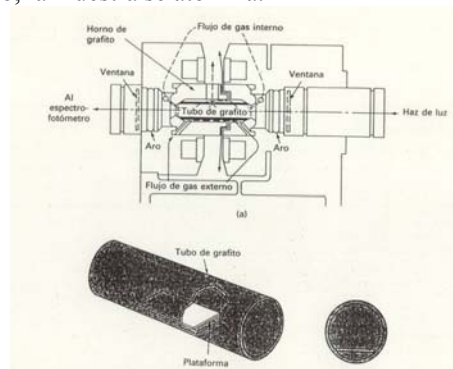


El rango de temperatura a aplicar dependerá de los elementos que se quieran analizar: así los metales pesados necesitan temperaturas de excitación más elevadas que los demás. La temperatura dependerá de la composición de la mezcla de gases que se queman: la mezcla gas natural/aire suministra temperaturas más bajas, y la de acetileno/óxido nítrico las más elevadas.

La muestra nebulizada es inyectada por la base de la llama, en cuyo seno se produce la evaporación de la matriz y la separación y excitación de los átomos de analito.

Puesto que la espectroscopia de absorción sigue la ley de Lambert-Beer, la mayor longitud del paso óptico aumenta la sensibilidad, motivo por el cual se suelen emplear quemadores denominados de ranura o de flujo laminar, que suministran llamas de una gran longitud.

Los *atomizadores electrotérmicos*, también llamados cámaras u hornos de grafito, consisten en pequeños cilindros de grafito (de 1 cm de diámetro), abiertos por los extremos, y con un orificio para la introducción de la muestra. En los extremos del tubo existen unos contactos eléctricos por lo que se suministra durante un corto espacio de tiempo una corriente de alta intensidad. Como consecuencia del calentamiento así inducido, la muestra se atomiza.



La **fente de radiación** proporciona la radiación que atraviesa la muestra atomizada. Se suelen emplear dos tipos de fuentes: las *lámparas de cátodo hueco*, y las *lámparas de descarga sin electrodo*.

Una *lámpara de cátodo hueco* consiste en un cilindro de vidrio, en uno de cuyos extremos se disponen dos alambres de wolframio. Uno de ellos actúa como ánodo, y el otro como cátodo. Este último se une por su extremo a un cilindro hueco de metal, recubierto por el metal que se desea determinar. La lámpara está llena de helio o de argón. Cuando se hace pasar corriente el gas se ioniza, y sus partículas bombardean el cátodo, excitando a los átomos metálicos. Cuando éstos se relajan lo hacen emitiendo radiación en una longitud de onda característica.

Las *lámparas de descarga sin electrodo*, son lámparas de cuarzo llenas de argón y de una sal del elemento que se quiere analizar. La fuente de energía para ionizar el gas no proviene de electrodo alguno, sino de un intenso campo electromagnético de radiofrecuencias o de microondas.

El **monocromador** consiste en un dispositivo que selecciona la longitud de onda del elemento que queremos determinar.

El **detector** es el dispositivo que recoge la radiación seleccionada por el monocromador y la compara con la enviada por la fuente, permitiendo la detección y cuantificación del elemento analizado.

Existen dos variantes de la absorción atómica de interés en química ambiental. Se trata de la absorción atómica de *vapor frío* y de la absorción atómica con *generador de hidruros*.

La técnica de *absorción atómica de vapor frío* se aplica en la determinación de mercurio. Aprovecha la volatilidad que presenta este elemento. Para ello se transforma el mercurio presente en la muestra en sales de mercurio II mediante digestión con ácidos nítrico y sulfúrico. A continuación se pasa el mercurio a estado metálico mediante reducción con hidroxilamina o con sulfato de estaño II. Una vez que el mercurio se encuentra en estado metálico, se bombea a través de disolución de aire que arrastra al mercurio hacia una celda por la que pasa una radiación de 254 nm. Para evitar la presencia de agua, la corriente de aire que porta el mercurio se hace pasar antes por un tubo desecador.

En la *generación de hidruros* se aprovecha el hecho de que los hidruros de algunos elementos (Arsénico, Bismuto, Germanio, Plomo, Antimonio, Selenio, Estaño, Teluro) son más volátiles que el elemento mismo, lo que permite una mejor atomización. La obtención del hidruro correspondiente se logra mezclando borohidruro sódico en medio básico con una disolución ácida del metal.

Espectroscopia de emisión ATÓMICA.



Las principales características de esta técnica son:

- Está basada en que cada elemento presente en una muestra va a emitir, una vez excitado, radiación a una longitud de onda específica.
- El atomizador sustituye a la fuente de radiación.
- Se trata de una técnica multielemental, es decir, puede analizar simultáneamente muchos elementos.
- Puede presentar problemas de interferencia espectral: existen elementos que emiten a longitudes de onda muy próximas (por ejemplo, el Calcio a 423 nm y el Cromo a 425 nm).
- Resulta más rápida y menos costosa que la espectroscopia de absorción atómica.
- Su sensibilidad y selectividad se pueden ver enormemente mejoradas si se acopla a un espectrómetro de masas.

El componente más relevante de un equipo de emisión atómica es el atomizador. Como dispositivos de atomización pueden utilizarse una llama, un arco eléctrico, o más habitualmente, un plasma de inducción.

Un plasma es un gas ionizado. Cuando se induce en un flujo de un gas, generalmente argón, recibe el nombre de “induced coupled plasma” o ICP. Las antorchas de ICP consisten en tubos de cuarzo por los que circula una corriente de argón. El gas se ioniza por efecto de una corriente eléctrica, y los iones generados son obligados a circular por un espacio anular cerrado dentro de un campo magnético de radiofrecuencia. La resistencia a su circulación provoca un calentamiento del gas que da lugar a una nueva ionización, pasando así a estado de plasma, alcanzándose temperaturas de hasta 10000 K. La muestra es introducida dentro del plasma por una corriente de argón, produciéndose en su seno la atomización y consecuente excitación.

4.2.2.2. Técnicas CROMATOGRÁFICAS

Se trata de un conjunto de técnicas que permiten la separación de los componentes presentes en una mezcla en base a su diferente movilidad en un medio poroso cuando son arrastrados por un fluido. El medio poroso recibe el nombre de fase estacionaria, y el fluido (gas o líquido) el de fase móvil. En líneas generales, en todo sistema cromatográfico se distinguen los siguientes componentes:

- **La fase estacionaria**; se trata del material inmóvil sobre el que se produce la separación de los analitos.
- **El soporte**, que es el material sobre el que descansa la fase estacionaria.
- **La fase móvil**, que es el fluido que arrastra a la muestra a través de la fase estacionaria.
- **Detector**, aparato que registra una propiedad físico-química del analito que va saliendo (eluyendo) de la fase estacionaria.
- **Cromatograma**, representación de una propiedad físico-química del eluido en función del tiempo o del volumen de elusión.

Las características de cada uno de estos componentes varían según el tipo de técnica. Existe un gran número de técnicas cromatográficas, de entre ellas las más utilizadas en química del medio ambiente son:

- Cromatografía iónica.
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Cromatografía de gases (GC).

Cromatografía IÓNICA



Se trata de un tipo de cromatografía líquida, una modalidad de separación en la que la fase móvil es un líquido. Sus principales características son:

- La fase estacionaria es una resina, natural o artificial, dotada de cargas en su superficie. Según la carga la resina podrá ser de intercambio aniónico (si está cargada positivamente) o de intercambio catiónico (si la carga es negativa).
- El soporte es una columna en cuyas paredes interiores se encuentra la fase estacionaria.
- La fase móvil es un líquido, generalmente agua destilada. Se puede variar la fuerza iónica de esta fase para lograr la elución de los analitos de la fase estacionaria.
- Detector, en su aplicación más común, la determinación de iones inorgánicos, se suele emplear un detector de conductividad; un sistema que mide la resistencia al paso de la electricidad por una solución acuosa. También pueden emplearse equipos de absorción molecular.
- El cromatograma podrá registrar bien volúmenes de elución frente a conductividad eléctrica, o bien frente a absorbancias a determinadas longitudes de onda.

Como ya se ha señalado, la principal aplicación de esta técnica es la determinación de iones inorgánicos, especialmente aniones. Resulta muy versátil en el análisis de estos componentes en muestras líquidas (soluciones absorbentes procedentes de muestreos atmosféricos, o en muestras de agua).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)



Se trata de una variante de cromatografía líquida (LC) en la que la fase móvil y la muestra se hacen pasar a través de la columna mediante una bomba de alta presión, y en los que la muestra se inyecta de modo tal que el flujo no se ve interrumpido. Todo ello para lograr que los analitos de la muestra interaccionen con una fase estacionaria formada por partículas altamente empaquetadas, lo que proporciona una mayor eficiencia del proceso cromatográfico.

Los principales componentes de un cromatógrafo HPLC son:

- La bomba de impulsión.
- El sistema de inyección.
- La columna.
- Detector.

La bomba de impulsión debe ser capaz de suministrar una presión de varias atmósferas. Las modalidades más utilizadas son las *bombas de desplazamiento positivo*, o de jeringa; y las *bombas de pistón con movimiento de vaivén*. Las primeras deben ser rellenadas cada vez que se vacían, mientras que las segundas pueden mantener el flujo por tiempo indefinido.

El sistema de inyección introduce la muestra en la corriente de fase móvil que fluye de la bomba a la columna, sin producir una interrupción del flujo ni alterar la presión. Puede ser manual o automático.

La columna en HPLC consiste en un cilindro de acero de 10 a 25 cm de largo y 4 a 5 mm de diámetro interno, y contienen la fase estacionaria dividida en partículas de 2 a 10 micras. Suelen tener filtros a la entrada para evitar la entrada de partículas que pudiesen existir en la muestra.

Los detectores más usuales en HPLC son el de *absorción UV-VIS*, y el de *fluorescencia*. Entre los detectores de UV-VIS los más frecuentes son los de longitud de onda variable, y los de diodo array. En los primeros se selecciona la longitud de onda a la que se desea medir mediante una red de difracción. En los segundos, el detector suministra el espectro de absorción de UV-VIS del material eluido.

Entre las aplicaciones de la HPLC en el campo de la determinación de contaminantes ambientales destacan el análisis de los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAHs), Trazianas, y cianotoxinas como las microcistinas.

Cromatografía de GASES (GC)



En la GC los analitos, en estado gaseoso, se reparten entre una fase móvil gaseosa, y una fase estacionaria sólida o líquida.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases son:

- Depósito de gas portador.
- Regulador de flujo.
- Inyectores.
- Columnas.
- Detectores.

El depósito de gas portador suele consistir en una bala de gas comprimido. Su misión es doble, por un lado desplazar a los analitos por el interior de la columna, y por otro suministrar una matriz adecuada al detector. Para ello debe cumplir tres requisitos: ser inerte, poder obtenerse con una elevada pureza, y no representar un gasto económico importante. Como gases portadores suelen utilizarse el nitrógeno, el helio, el hidrógeno, y el argón.

El regulador del flujo del gas, consiste en un dispositivo electrónico que permite controlar la velocidad de la fase móvil.

Los inyectoros, son las partes del sistema por donde se introduce la muestra, mediante microjeringas; bien manualmente, o preferiblemente, por medio de un inyector automático. Además de ser el punto de entrada en la columna cromatográfica, es el sitio donde se produce la volatilización y mezcla de las sustancias a determinar, por lo que la temperatura de esta parte del equipo tiene que estar muy bien controlada.

Las columnas, que contienen la fase estacionaria, pueden ser de dos clases: empaquetadas y capilares. Ambas se diferencian en su longitud, diámetro interior, y naturaleza. Las empaquetadas tienen entre 1 y 2 m de largo, su diámetro interior es de 1 a 2 mm, y están fabricadas en acero inoxidable. Las capilares alcanzan los 10 m de longitud, y están hechas de sílice fundida. Las columnas se alojan en el interior de un horno dotado de un sistema de calefacción eléctrico, un ventilador y un dispositivo de apertura, todos ellos controlados por un microprocesador. El control de la temperatura en la columna es crucial para una buena separación cromatográfica: debe ser lo suficientemente alta como para permitir la volatilización de los componentes de la muestra pero no tan elevada como para descomponerlos.

Los detectores más empleados en GC son: de conductividad térmica (TCD), de ionización a la llama (FID), de captura electrónica (ECD), de fósforo-nitrógeno (NPD), fotométrico de llama (FPD), y el espectrómetro de masas (MS). De entre todos ellos, los más habituales en química de contaminantes ambientales son el FID, el ECD, y el MS. En el cuadro adjunto se muestran las aplicaciones más corrientes para cada tipo de detector:

ANALITOS	TÉCNICA CG
Compuestos Orgánicos Volátiles no halogenados	Detección mediante FID
Compuestos Orgánico Volátiles halogenados	Detección mediante espectroscopia de masas
Bifenil policlorados/Plaguicidas organoclorados	Detección mediante ECD

4.2.2.3. Técnicas ELECTROANALÍTICAS

Están basadas en la interacción entre un campo electromagnético y la disolución del analito que se quiere determinar. Como señal analítica pueden utilizar la conductividad de la disolución, la diferencia de potencial entre dos puntos de la misma y la corriente o carga que circula en ella.

Los procesos electroquímicos en que se basa tienen lugar en las llamadas celdas electroquímicas. Estos dispositivos están formados por:

- Una cuba electrolítica, formada de material inerte y que va a contener la disolución objeto de análisis.
- Dos o tres conductores eléctricos, los electrodos.
- Un circuito externo responsable de generar el campo eléctrico entre los electrodos

Las técnicas electroanalíticas pueden clasificarse en dos grupos:

* Técnicas interfaciales, basadas en los fenómenos que ocurren en las interfases electrodo disolución. Las más habituales en el campo medioambiental son las *potenciometrías*.

* Técnicas no interfaciales, basadas en fenómenos que ocurren en el seno de la disolución. La más habitual en el estudio de muestras ambientales es la *conductimetría*.

Potenciometrías.



Cuando en la disolución no hay paso de corriente, o éste es despreciable, su composición permanece inalterada. En estas circunstancias, el potencial del electrodo se puede relacionar con la actividad de la especie química objeto de estudio a través de la ecuación de Nerst:

$$E = E^{\circ} - (0,05916/n)\log Q$$

Donde:

E es el potencial del electrodo.

E° es el potencial en condiciones estándar.

n es el número de electrones transferidos en la reacción de reducción de la especie iónica.

Q es el cociente entre las concentraciones de las formas reducida y oxidada de la especie.

La instrumentación básica para el análisis potenciométrico consiste en la celda electrolítica, dos electrodos, y un sistema de medida. Uno de los electrodos es el indicador, y el otro es el de referencia. El primero es el que tiene un potencial sensible a la concentración del ión que queremos analizar, y el segundo dispone de un potencial constante.

Los electrodos indicadores más ampliamente utilizados son los de membrana. Están dotados de una membrana permeable a un solo tipo de ión, por lo que también se les llama selectivos. El interior del electrodo suele estar relleno de una solución interna de referencia atravesada por un hilo conductor. Como electrodo de referencia, el más ampliamente utilizado es el de plata/cloruro de plata: esta formado por un hilo de plata en contacto con una disolución de cloruro potásico a través de un depósito de cloruro de plata.

Las principales aplicaciones medioambientales de la técnicas potenciométricas las encontramos en la medición del pH, la determinación de amonio, y el análisis de una amplia gama de aniones, especialmente fluoruros, cloruros, sulfuros, y cianuros.

Conductimetría.



Tiene como fundamento la medida de la resistencia de una disolución al paso de la corriente eléctrica. De acuerdo con la ley de Ohm:

$$I = E/R$$

Dónde I es la intensidad de corriente que atraviesa, E es la diferencia de potencial, y R es la resistencia al paso de la corriente. Se define la CONDUCTANCIA como la inversa de R, y se mide en ohms^{-1} o también mhos o siemenes. Cuanto mayor sea el paso de corriente, menor será el valor de R y por tanto mayor será la conductancia de la disolución. Ello se cumple en disoluciones con un elevado contenido en sales disueltas. Este hecho convierte a la medida de la conductividad en un parámetro de gran interés a la hora de evaluar rápidamente el contenido en sales de una masa de agua, por lo que se le incluyen en numerosas normativas relacionadas con el control de este medio.

5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

De una manera un tanto arcaica, se entienden por microorganismos o microbios todos aquellos seres vivos que no pueden observarse a simple vista: virus, bacterias, protozoos, y un gran número de taxones de hongos y de algas. El objeto de estas técnicas es el aislamiento, la identificación y la cuantificación de microorganismos. Para lograrlo existen dos vías principales:

-Aislando el grupo que queremos investigar a través de promover su crecimiento selectivo bajo condiciones de laboratorio, y luego identificarlo en función de sus características fenotípicas. Esta es la modalidad clásica, basada en el uso de medios de cultivo e identificaciones por pruebas bioquímicas y/o serológicas.

-Aislando y amplificando selectivamente su material genético; modalidad más moderna basada en el empleo de las técnicas de biología molecular.

En la actualidad, y ciñéndonos a lo que la normativa medioambiental establece para el control de parámetros microbiológicos, la modalidad más extendida en los laboratorios de medio ambiente es la clásica. La única matriz ambiental en la que se encuentra legislada la determinación de microorganismos es el agua, y los principales microorganismos sujetos a norma son bacterias. Dentro de estas normas se encuentran las de caracterización de aguas continentales superficiales destinadas a la producción de agua potable, y la de baño en aguas no tratadas. Además, existen dos normativas que, aunque sanitarias, están en realidad a caballo entre la sanidad y el medio ambiente: la legislación sobre aguas de consumo, y la de control de la legionelosis. En cuanto a las bacterias a investigar, su tipología es bastante limitada, pudiendo distinguirse entre dos categorías:

- Grupos de bacterias con características comunes pero sin categoría taxonómica alguna: por ejemplo, los gérmenes aerobios a 22°C, o los coliformes totales.
- Taxones específicos: caso de *Escherichia coli*, *Salmonella*, o *Legionella pneumophilla*

En líneas generales, los métodos clásicos de análisis microbiológico de aguas, constan de tres partes:

- Concentración de la muestra.
- Siembra.
- Incubación.
- Identificación

Concentración de la muestra. Este paso depende del tipo de agua que se desea estudiar y del tipo de microorganismo que se pretende aislar. Cuando se sospecha que la presencia de las bacterias objeto de estudio es muy elevada se obvia o incluso se reemplaza por la dilución de la muestra. Sería el caso de la investigación de *E.coli* en aguas residuales domésticas. El método más habitual de concentración es la filtración de un volumen importante de muestra (de 1 a 5 litros) a través de filtros de membrana estériles de no más de 0,45 micrómetros de poro. Para la filtración se emplean dispositivos esterilizables dotados de una bomba de vacío o peristáltica.



Siembra. Se realiza en medios de cultivo, esto es, sustratos que contienen una serie de nutrientes que permiten el crecimiento de las bacterias. Estos medios pueden ser líquidos (caldos de cultivo) o sólidos (agares). En el caso de los primeros, la siembra se realiza por incorporación de determinados volúmenes de muestra al caldo; en el caso de los segundos la siembra puede efectuarse, básicamente, mediante tres formas:

- Filtración. En cuyo caso la concentración ya serviría como procedimiento de siembra. En ocasiones lo que se filtra va a ser un volumen conocido de la muestra diluida con solución salina estéril o con un medio de cultivo líquido estéril. La dilución de la muestra con agua destilada puede dañar las células debido a fenómenos de choque osmótico. Una vez filtrada la muestra, el filtro se deposita, con ayuda de unas pinzas estériles, sobre un medio sólido de cultivo adecuado.



- Inoculación en superficie. A partir de la muestra bruta, de una dilución de la misma, o de la suspensión del filtro de concentración, se siembra en un medio sólido apropiado depositando en superficie un pequeño volumen (generalmente entre 100 y 500 microlitros), y extendiéndolo uniformemente con la ayuda de un asa de siembra.

- Inoculación en profundidad. En el interior de una placa de Petri vacía se coloca un determinado volumen de la muestra y a continuación se vierte sobre él medio de cultivo licuado, se homogeneiza, y se espera a que el conjunto solidifique. La temperatura del medio licuado debe ser tal que le permita estar fundido pero que no sea tan elevada como para destruir a las células.

Incubación. Una vez inoculados, los medios se incuban a temperaturas específicas para cada tipo de microorganismo, en incubadores capaces de regular la temperatura en rangos bajos (el intervalo de trabajo suele estar entre los 22°C y los 44°C), y durante tiempos que pueden ir de 24 horas para los coliformes a los 15 días para *Legionella*. Esta incubación puede realizarse bajo dos tipos de condiciones:

- Aeróbicas; cuando el metabolismo de la bacteria que deseamos aislar requiera la presencia de oxígeno. En estos casos no el incubador no necesita dispositivo adicional alguno.
- Anaeróbicas; si para el metabolismo del microorganismo objeto de estudio el oxígeno resulta tóxico (caso del *Clostridium perfringens*, un indicador de la calidad de agua de consumo). En este caso las placas conteniendo el medio de cultivo inoculado se introducen en jarras de anaerobiosis, unos dispositivos con cierre hermético dotados de un reactivo químico que elimina el oxígeno del interior de la jarra, y de un indicador coloreado que señala la ausencia de oxígeno.

Identificación. La identificación puede realizarse directamente a partir de la siembra en medios selectivos, esto es, medios de cultivo cuya composición inhibe el crecimiento de una posible flora acompañante. Los medios selectivos en general constan de:

- Nutrientes específicos para el microorganismo que deseamos aislar.
- Inhibidores de flora acompañante (antibióticos, sales biliares, sales minerales).
- Indicadores cromogénicos, sustancias químicas que cambian de color cuando, como consecuencia del metabolismo de la bacteria objeto de estudio, se modifica el pH del medio.

Según el microorganismo se puede utilizar un solo medio selectivo (caso de los enterococos) o varios (como ocurre con Salmonella).

En cualquier caso, una vez aisladas las colonias suele requerirse una identificación más exacta, lo que se logra mediante tests bioquímicos, pruebas serológicas, o microscopía de epifluorescencia.

Los tests bioquímicos están estandarizados bajo la forma de galerías de identificación. Las galerías se acompañan de claves numéricas y programas de ordenador que permiten una rápida identificación de las colonias a nivel de género y de especie.



Entre los serológicos los más populares son los de aglutinación, que se basan en reacciones antígeno-anticuerpo.



La microscopía de fluorescencia es un tipo de microscopía óptica que requiere la reacción de las colonias con un reactivo fluorescente a través de reacciones tipo antígeno-anticuerpo. En el campo que nos ocupa se suele emplear sólo para la identificación de *Legionella pneumophilla*.



eoi

6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS TOXICOLÓGICO.

La toxicología tiene por objeto el estudio de los efectos de las sustancias químicas con los seres vivos en sus circunstancias particulares. De sus diferentes ramas, la que aquí resulta de interés es la toxicología ambiental o ecotoxicología cuyo ámbito de aplicación son los contaminantes ambientales y su influencia sobre los ecosistemas. Para abordar este estudio se puede partir de dos enfoques relacionados con diferentes niveles de organización biológica:

- El nivel de los organismos individuales; en cuyo caso se evalúan los efectos sobre individuos aislados, extrapolándose los efectos a especies de similares características.
- El nivel de los ecosistemas; en dónde se pretende evaluar el impacto de los tóxicos sobre las biocenosis a partir de los diferentes niveles tróficos.

El primer enfoque se enraíza con la toxicología clásica, y el segundo se identifica con la ecotoxicología propiamente dicha.

6.1. Técnicas clásicas.

Dentro de este apartado debemos señalar dos grupos:

- Técnicas *in vivo*.
- Técnicas *in vitro* o alternativas.

Las primeras se definirían, de forma tradicional, como aquellas que emplean como animales de experimentación, a los mamíferos, debido a que los resultados se suponen extrapolables a la especie humana. Las segundas. Las técnica *in vitro* emplean organismos llamados inferiores (hongos, bacterias, algas), órganos profundidos, cultivos celulares y de tejidos, etc. Algunas pruebas pueden sustituir a los ensayos *in vivo* y otras servir de cribado previo, con lo que se reduce el empleo de animales de laboratorio.

Tanto unas como otras fundamentan el estudio de la toxicidad en observar la respuesta biológica de un organismo de experimentación frente a diferentes dosis de tóxico, en un intervalo dado de tiempo, suministrado a través de una vía concreta de administración.

Diferentes individuos de una misma especie presenta distinta sensibilidad a un mismo tóxico. Ello se debe, en general, a que los mecanismos de detoxificación están mediados por proteínas específicas (citocromo P450, alcoholdehidrogenasas, receptores, metalotioneínas) muchas de ellas sujetas a variabilidad genética, en ocasiones ligada al sexo. Con el fin de paliar este efecto y de lograr una mayor significación estadística, los ensayos no se realizan sobre un único individuo, sino sobre un conjunto de ellos de diferente sexo (entre 5 y 10 especímenes por género).

Tradicionalmente, la respuesta biológica que se evalúa es la muerte del individuo. Ello da lugar al concepto de “Concentración Letal 50” o LC₅₀, definido como la concentración de sustancia tóxica que produce la muerte del 50% de la población de estudio en unas condiciones de experimentación dadas. Cuando la respuesta biológica no es la muerte, sino, por ejemplo, la aparición de eritema, o lo cambios en una determinada actividad enzimática, la LC es reemplazada por la EC o “concentración efectiva”.

Generalmente se distinguen dos formas de toxicidad en función del tiempo de exposición: aguda y crónica. La primera corresponde a tiempos cortos (48 ó 96 horas), y la segunda a tiempos más prolongados (semanas, meses, o años). Para un estudio completo de la posible toxicidad de un compuesto es necesario realizar ensayos de toxicidad agudos y crónicos, puesto que ciertos efectos biológicos, como la aparición de tumores, sólo pueden apreciarse tras largos periodos de exposición.

La forma en que se administra un tóxico es de gran importancia para evaluar la toxicidad de una sustancia. Así, por ejemplo, el mercurio metálico manifiesta una toxicidad mucho más alta por inhalación que por ingestión. Las principales vías de administración en los ensayos in vivo son:

- Inhalación.
- Ingestión (vía oral).
- Dérmica.
- Ocular.
- Parenteral.

Ensayos in vivo.

A título de ejemplo describiremos someramente los ensayos de toxicidad oral y de toxicidad dérmica.

Toxicidad oral aguda.

Como animales de experimentación suelen emplearse ratas o ratones de laboratorio de una determinada raza y con pedigrí certificado. Deben ser animales sanos, adultos de ambos sexos y en un número por lo general no inferior a 10 (5 machos y 5 hembras), con un peso conocido y similar para todos los componentes de lote. La sustancia problema se les suministra por vía oral, con frecuencia a través de una sonda, en una o varias dosis según el protocolo. A lo largo de varios días se observa el comportamiento de los animales, registrándose el número de muertes. Pasado el tiempo del ensayo se contabilizan los animales muertos, se realizan necropsias en busca de posibles alteraciones anatomopatológicas, y se calcula la LC_{50} . Los supervivientes son sacrificados.

Toxicidad dérmica aguda.

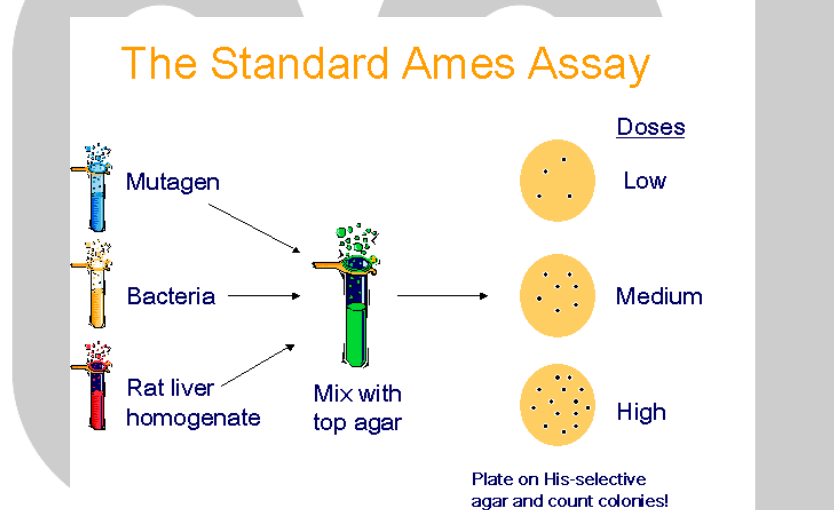
Los animales de experimentación más utilizados suelen ser conejos de una raza concreta, con certificado de pedigrí, y en perfecto estado de salud. El número puede ser inferior que en el caso del ensayo de toxicidad oral, pero como en este ensayo, se deberá conocer su peso que deberá ser lo más homogéneo posible para todo el lote. El lomo de los animales es escrupulosamente rasurado y sobre él se aplica, en forma de pomada y con ayuda de un apósito, la muestra a ensayar. Se observa durante el periodo de prueba la alteración de la piel, anotándose el número de animales afectados, así como las características de la lesión. Terminado el periodo de la prueba se calcula la EC_{50} , y se procede al sacrificio de todos los animales del lote.

En el campo de la contaminación ambiental, este tipo de análisis se realiza para la caracterización de residuos con el fin de poder clasificarlos como tóxicos, y en consecuencia asignarle una o varias características de toxicidad. La normativa a aplicar es el Real Decreto 952/1997 por el que se modifica el reglamento para la ejecución de la ley 20/1986 de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Este R.D. no señala explícitamente que métodos de ensayo se deben aplicar, remitiendo para ello al Real Decreto 363/1995 sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. El 363/1995, en su anexo V parte B contempla diversos métodos para determinar la toxicidad, si bien no indica cuando emplear uno u otro. De estos ensayos los más demandados suelen ser la determinación de la toxicidad oral aguda, y la determinación de la toxicidad aguda vía dérmica.

Ensayos in vitro.

Existe una amplia gama de este tipo de pruebas, pero desde el punto de vista práctico nos limitaremos a describir uno de los métodos más aceptados para establecer la característica H11 “mutagenicidad” descrita por el R.D. 952/1997. Se trata del tests de Ames.

Test de Ames. La mutagenicidad es la capacidad de alterar la estructura del ADN causando una aberración genética o mutación. Algunos productos químicos, o sus derivados metabólicos son sustancias mutagénicas o mutágenos. Para evaluar este potencial, el Dr. Ames, de la Universidad de California, ideó, en los años setenta del pasado siglo, un test que emplea a las bacterias como organismos de experimentación. El ensayo puede utilizar cepas de *Salmonella typhimurium* o de *Escherichia coli*. Se trata de cepas seleccionadas incapaces de crecer en ausencia del aminoácido histidina, debido a que su ADN está mutado para su síntesis. Si las bacterias mutantes (His^-) son expuestas a mutágenos, éstos pueden corregir la mutación en algunas células (reversión), dando lugar a células revertientes (His^+) que si pueden crecer en agar sin histidina formando colonias visibles y cuantificables. La potencia del mutágeno será directamente proporcional al número de colonias revertientes que produzca. Con objeto de que el sistema sea más aplicable a los mamíferos puede añadirse al medio de cultivo enzimas hepáticas en forma de extracto microsomal S-9 proveniente de hígado de rata.



6.2. Técnicas Ecotoxicológicas.

La evaluación del impacto de los tóxicos sobre los ecosistemas mediante ensayos de laboratorio se enfrenta con la dificultad que tiene reproducir in vitro, y de manera controlada, la complejidad de un ecosistema, y la amplia variedad de éstos. Necesariamente se debe acudir a simplificaciones, mucho más factibles en lo que se refiere a ecosistemas dulceacuícolas que a ecosistemas marinos y terrestres. En general el interés de los investigadores se centra sobre organismos abundantes y característicos de cada uno de los principales niveles tróficos. Los ensayos pueden realizarse sobre microcosmos (ecosistemas simplificados y miniaturizados a escala de laboratorio) o sobre poblaciones de organismos de niveles tróficos concretos. Son estos últimos los que mayor aplicación práctica tienen. De ellos pasamos a describir dos, seleccionados por su presencia en las normativas y su difusión comercial. Se trata del ensayo de bioluminiscencia con la bacteria *Vibrio fischeri*; y el de inhibición con el microcrustáceo *Daphnia magna*.

Bioluminiscencia con V.fischeri. El organismo que emplea el ensayo es la bacteria marina bioluminiscente *V.fischeri*. Este microorganismo posee en su metabolismo una cadena respiratoria dotada de un intermediario luminiscente, de manera que, bajo condiciones normales, la bacteria emite luz de manera continua. Si el organismo entra en contacto con una sustancia potencialmente tóxica, su cadena respiratoria puede verse directa o indirectamente bloqueada, disminuyendo o desapareciendo la emisión de luz sin que ello comporte necesariamente la muerte de la bacteria. En el ensayo de bioluminiscencia un pull de bacterias, suspendido en una solución salina adecuada, se pone en contacto con diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo. La emisión de luz se mide y registra con ayuda de un fotoamplificador, a distintos intervalos de tiempo (5, 15 y 30 minutos) y se compara con la emisión de la suspensión sin muestra. A partir de estos datos se calcula la correspondiente EC_{50} .



Inhibición con Daphnia. El microcrustáceo *Daphnia* es un decápodo frecuente en aguas continentales, en las que se desplaza moviendo activamente sus apéndices locomotores. El ensayo de inhibición consiste en poner en contacto, dentro de frascos apropiados conteniendo un agua exenta de contaminantes y de dureza adecuada, al menos 10 individuos jóvenes por frasco con diferentes diluciones de la sustancia problema. Como respuesta biológica se observa la movilidad de los individuos. El ensayo agudo dura 48 horas, al cabo de las cuales se cuentan los individuos inmobilizados y se calcula la correspondiente EC_{50} .



Los ensayos de ecotoxicidad con *Vibrio* y con *Daphnia* están contemplados por normativas de aguas residuales y de caracterización de residuos. Así, a nivel autonómico existen diferentes legislación de control de vertidos industriales a la red integral de saneamiento que exigen la determinación del parámetro "sustancias inhibitoras" mediante uno de los dos ensayos o mediante ambos. En cuanto a los residuos, la Orden de 13 de Octubre de 1989 sobre métodos de caracterización de residuos tóxicos y peligrosos, incluye el ensayo de bioluminiscencia, y el ya señalado Real Decreto 363/1995 contempla en su anexo V, parte C, el ensayo de ecotoxicidad con *Daphnia*.

7. Técnicas de análisis biológico.

Bajo este epígrafe se pretende encuadrar a aquellas técnicas de análisis ambiental vinculadas a la identificación de especies macroscópicas, in situ o en el laboratorio, y a la elaboración de índices cualitativos y cuantitativos que permitan evaluar el impacto de los contaminantes sobre los ecosistemas. Es de todos sabido que la biodiversidad es un parámetro relacionado directamente con la madurez y buena salud de los ecosistemas, y que el conocimiento de las comunidades de organismos de un ecosistema dado nos suministra valiosa información sobre alteraciones pasadas, y presentes, a veces demasiado sutiles como para que queden de manifiesto a través de análisis físico-químicos más o menos puntuales.

Existen muchas técnicas de recogida, identificación, y confección de índices biológicos. En esta apartado sólo nos detendremos en considerar a algunas que se están incorporando a la rutina de laboratorios y gabinetes de estudios con el fin de dar cumplimiento a la Directiva Marco del Agua. Según esta Directiva, antes de 2016 todos los países miembros tienen que haber conseguido el buen estado ecológico de sus masas de agua empleando para ello el estudio de sus comunidades de plantas acuáticas, peces, y macroinvertebrados bentónicos.

7.1. Índice ECOESTRIMED.

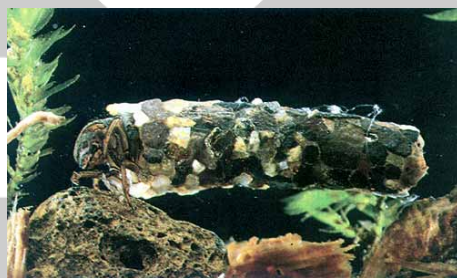
ECOESTRIMED (ECOlogical Status RIVER MEDiterranean) pretende valorar la calidad de todo el ecosistema fluvial en su conjunto. Para ello incluye la ribera además de la calidad de las aguas. Requiere una escasa infraestructura y un tiempo corto de muestreo. Se calcula a partir de dos índices de calidad:

- El de calidad biológica del río (FBILL o IBMWP)
- El de valoración del estado de conservación de la ribera (QBR)

Los índices FBILL y IBMWP están basados en la diversidad y abundancia de los macroinvertebrados bentónicos presentes en el río. Entendemos por macroinvertebrados bentónicos aquellos invertebrados de más de 0,200 mm de tamaño que habitan en el lecho fluvial durante toda su vida (moluscos) o durante parte de su ciclo vital (muchos insectos con una fase adulta terrestre y otra larvaria, acuática).



El índice FBILL está indicado para zonas con piedras y corriente. Consiste en muestrear el lecho fluvial con la ayuda de una red de 250 micrómetros de malla, en varios puntos de tramos predefinidos que cumplen una serie de características (anchura, longitud, situación respecto a puentes y pasarelas). Los ejemplares recogidos se guardan en frascos y se conservan con etanol al 70% o formol al 4% para su posterior identificación en el laboratorio con la ayuda de lupas binoculares y claves taxonómicas. En función de las familias identificadas, y de la abundancia de cada una de ellas, se busca en unas tablas el valor del índice FBILL. Este índice va del 0 (aguas extremadamente contaminadas) hasta el 10 (aguas con muy buena calidad). La presencia de familias típicas de zonas contaminadas (Syrphidae, Chironomidae rojos, Culicidae, Oligochaeta, Physidae), la baja diversidad, o la ausencia de macroinvertebrados da lugar a valores bajos, mientras que la presencia de familias propias de aguas limpias (Plecoptera, Leuctridae, Tricópteros con estuche) proporciona valores altos.



Nivel de calidad	FBILL
Aguas con muy buena calidad	8 a 10
Eutrofia, aguas con contaminación moderada	6 y 7
Aguas contaminadas	4 y 5
Aguas muy contaminadas	2 y 3
Aguas extremadamente contaminadas	0 y 1

El índice IBMWP, está concebido para ríos muy pequeños sin piedras o con muchas pozas. Las muestras se recogen con una red de las mismas características que en el índice FBILL, y bajo unas condiciones de muestreo algo diferentes. Una vez identificados los diferentes taxones recogidos, a través de una tabla se les asigna un valor numérico, del 1 al 10, para cada familia (las familias indicadoras de aguas limpias tienen un valor más alto, y las de aguas sucias un valor más bajo). Se suman todos los puntos y se compara con una tabla en el que el IBMWP puede tomar valores desde <15 hasta >100:

Nivel de calidad	IBMWP
Aguas muy limpias	> 100
Eutrofia, aguas con contaminación moderada	61 - 100
Aguas contaminadas	36 - 60
Aguas muy contaminadas	16 - 35
Aguas extremadamente contaminadas	< 15

El índice QBR, relativo a la calidad del bosque de ribera, se elabora a partir de visitas de campo en las que se valoran una serie de inputs tabulados en una plantilla de campo. Estos inputs se ordenan en cuatro bloques, cada uno con una puntuación propia que va de 0 a 25. Estos bloques son:

- Grado de cobertura de ribera y conectividad con el ecosistema forestal adyacente.
- Estructura de la cobertura.
- Calidad de la cubierta.
- Grado de naturalidad del canal fluvial.

Sumando las puntuaciones de los cuatro bloques se obtiene el valor de QBR:

Nivel de calidad	QBR
Bosque de ribera sin alteraciones	≥ 95
Bosque ligeramente perturbado	75 - 90
Inicio de alteración importante	55 - 70
Alteración fuerte	30 - 50
Degradación extrema	≤ 25



Con el índice biológico y el QBR calculados, se obtiene el ECOSTRIMED a partir de la siguiente tabla:

Índice biológico		QBR			ECOSTRIMED
FBILL	IBMWP	>75	45-75	< 45	
8-10	>100	MUY BUENO	BUENO	MEDIOCRE	
6-7	61-100	BUENO	MEDIOCRE	MALO	
4-5	36-60	MEDIOCRE	MALO	PÉSIMO	
0-3	<36	MALO	PÉSIMO	PÉSIMO	

BIBLIOGRAFÍA.

- “Análisis Químico”. Ramiro Avidad, Ignacio de Orbe. Universidad de Granada. Granada 2006.
- “Standard Methods for the examination of water and wastewater”. Grenberg, Arnold E.2005.
- “Estado actual y perspectivas en el empleo de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos como indicadores del estado ecológico de los ecosistemas fluviales españoles”. A. Alonso, J.A.Camargo. Ecosistemas. 2005/3.
- “Técnicas analíticas de contaminantes químicos”. Miguel Angel Sogorb, y Eugenio Vilanova. Ed Díaz de Santos S.A. Madrid 2004.
- “Química Analítica de los Contaminantes Medioambientales”. CIEMAT. Madrid.2003.
- “ECOSTRIMED: protocolo para determinar el estado ecológico de los ríos mediterráneos”. Prat, N; Munné, A; Rieradevall, M. Solá. Diputación de Barcelona. Área de Medio Ambiente. 2001.
- UNE EN ISO 7899-2:2001. Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: método de la filtración de membrana.
- UNE EN ISO 9308-1:2000. Calidad del agua. Detección y recuento de Escherichia coli y bacterias coniformes. Parte 1: método de la filtración de membrana.
- UNE EN ISO 6222: 1999. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables.
- ISO 11731. Parte 1, 1998. Calidad del agua. Detección y enumeración de Legionella.
- “Toxicología Avanzada”. M.Repetto. Ed. Díaz de Santos S.A. Madrid 1995.
- “Toxicología Ambiental”. John H. Duffus. Ed Omega. Barcelona 1983.