

ANEXO 2: METODOLOGÍAS ESPECIALES Y PROTOCOLOS

METODOLOGÍAS ESPECIALES Y PROTOCOLOS

1. CALIDAD DE AGUAS

1.1 Técnicas de muestreo

Para investigar la calidad de un cuerpo de agua, una de las primeras tareas a resolver es obtener una muestra representativa del cuerpo de agua que se requiere investigar. Si bien la mejor representatividad de un análisis se obtiene cuando las pruebas se realizan directamente en la fuente, las operaciones de muestreo son necesarias dado que muchos de los análisis requieren equipos o métodos que no pueden aplicarse directamente en campo.

El propósito de las operaciones de muestreo consiste en extraer del cuerpo de agua que se investiga, una cantidad de muestra representativa suficiente como para poder realizar con ella la totalidad de las pruebas que se requieren, pero que sin embargo no sea tan grande como para que se dificulte su transporte al laboratorio, en un tiempo suficientemente breve, como para que su composición no cambie apreciablemente antes de realizar los ensayos.

El requisito de que las concentraciones y proporciones relativas de todos los componentes en la muestra, se mantengan idénticos a los de la fuente, implica una tomar varias precauciones y condiciones de manejo de muestras, que pueden incluir refrigeración, adición de preservantes y/o fijación de parámetros.

Dependiendo de la forma como se realiza el muestreo este puede ser de naturaleza puntual o compuesta.

Una “muestra puntual” es la que se toma en un determinado punto del espacio en un determinado instante de tiempo. Las muestras puntuales indican las características de un vertimiento específico en el momento de su recolección. Su volumen depende del tipo y cantidad de análisis que se deseen realizar. Una muestra compuesta es la que se obtiene por “composición de dos o más muestras puntuales.

Una muestra puede ser compuesta con respecto al tiempo, al espacio o al caudal. Una muestra compuesta en función al tiempo, es la que se obtiene por combinación de varias muestras puntuales, tomadas en un mismo sitio, en diferentes instantes de tiempo. Una muestra compuesta en el espacio, es la que se obtiene por combinación de varias muestras puntuales, tomadas en diferentes puntos de un cuerpo de agua, durante un mismo intervalo de tiempo.

Dadas las características de mezcla que presentan los cursos de agua a ser estudiados, las muestras que se tomarán serán puntuales, lo que también se considera más seguro, para evitar la contaminación de las muestras, que puede ocurrir cuando se realiza el muestreo compuesto, al abrir y cerrar el envase de muestreo en reiteradas ocasiones para adicionar las muestras parciales.

Otras consideraciones generales que se aplicarán para realizar el muestreo son las siguientes:

Para garantizar la calidad de las muestras obtenidas, el muestreo se realizará con personal capacitado, equipado con guantes de latex desechables (uno para cada muestra), gorro desechable y barbijo.

Para la toma de muestras se utilizarán envases de plástico nuevos. Antes de tomar las muestras se enjuagará tres veces el recipiente con el agua de muestreo, a menos que el recipiente contenga algún agente preservante.

Los recipientes se llenarán con la muestra, dejando libre un espacio correspondiente aproximadamente al 10 %de su volumen, para que los recipientes no sufran daños por la expansión térmica.

Se llevará un registro de cada muestra, especificando su identificación, tipo de análisis, lugar, fecha y hora de muestreo y una descripción de los aspectos relevantes encontrados e el sitio de muestreo.

Las muestras serán identificadas perfectamente, indicando el nombre y número de la muestra, el sitio de muestreo, el tipo de análisis para el que fue tomada y la fecha y hora en que se realizó e muestreo.

Algunos parámetros cuyos valores cambian rápidamente con el tiempo, serán analizados también en el sitio de muestreo, con equipos portátiles de análisis (Temperatura, pH, Conductividad).

1.1.1. Muestreo en ríos y arroyos

Por precaución y a fin de facilitar las operaciones, el muestreo se realizará siempre entre dos personas.

En los cursos de agua donde no se pueda acceder caminando, se utilizará puentes botes.

Cuando se tomen muestras aguas abajo de un confluencia o descarga, el muestreo se realizará a una distancia donde se haya efectuada una mezcla uniforme de los dos cuerpos de agua.

En lo posible las muestras serán tomadas a media corriente y a unos 0.30 m de la superficie del agua.

En los sitios de muestreo se estimará el caudal que lleva el río, a fin de relacionarlo con la calidad del mismo, en el momento de muestreo. En caso de existir estaciones de aforo en el sector, se tomarán los datos de caudal obtenidos por esta.

1.1.2 Muestreo en lagunas y embalses

Los muestreos se realizarán utilizando botes o lanchas, que permitan acceder a los puntos de muestreo.

La temperatura, el pH y la conductividad, además del laboratorio se determinarán en campo, para evaluar la variabilidad y estratificación tridimensional de la calidad de agua. El cambio de estos parámetros se determinará a diferentes profundidades.

Para el muestreo a diferentes profundidades, se utilizará muestreadores tipo Van Dorn o Kemmerer, de material compatibles con los parámetros que se analizarán.

Las muestras verticales se obtendrán de las concentraciones más bajas a las concentraciones más altas, es decir primero se obtendrán muestras de la superficie y luego las de mayor profundidad.

En lagos poco profundos, las muestras se tomarán a 0.30 m de profundidad.


1.1.3 Muestreo de aguas subterráneas

Las muestras se tomarán lo más cerca posible al ademe del pozo, antes de cualquier tanque de almacenamiento, sistemas de tratamiento o líneas de distribución.

Antes de tomar la muestra se extraerá por bombeo el agua estancada del pozo, bomba y tubería de impulsión (purgado), de modo que se asegure que la muestra sea representativa del acuífero. El agua se dejará correr al menos 10 minutos, hasta que los parámetros de campo se estabilicen.

Una vez estabilizados los parámetros de campo, se llenará las botellas de muestra, directamente de la tubería de descarga. Se dejará que la muestra fluya suavemente dentro de la botella y se la tapaná inmediatamente.

1. 2. Modelo de Etiqueta y Cadena de Custodia que se Utilizará

			
Proyecto: Auditoría Ambiental Kory Kollo			
Número	de	Fecha	Hora
Muestra:		a:	:
.....1.....	
Identificación:			
.....			
Temperatura Muestra		Temperatura ambiente	
.....		
Punto de muestreo:			
.....			
Profundidad:		Conservador:	
.....		
Parámetros a determinar:			
.....			
Nombre y firma del muestreador:			
.....			

Para garantizar la calidad de las muestras de agua tomadas se utilizó un formulario de cadena de custodia, donde figuran los pasos que siguió la muestra desde la toma hasta el laboratorio.

FORMULARIO PARA REGISTRO DE MUESTRAS Y CADENA DE CUSTODIA

Proyecto:		Cliente:		N. de frascos	Tipo de muestra				Matriz/ Conservador Preservante	Tipo de envase/volumen	Análisis Requeridos										
Muestreado por:					Agua	suelo	lodo	otros			simple	compuesta	Físico Químicos	Bacteriológ.	Metales						
Firma:																					
No.			Identificación/ Muestra																		

	Nombre	Instit.	Firma	Fecha	Hora	Muestra intacta	si		Comentarios
Entregado por:						Recipiente adecuado			
Recibido por:						Dentro de tiempo			
Entregado por:						Conservación	frio		
Recibido por:							ambiente		

1.3. Manejo y transporte de las muestras

En cada sección de control, una vez tomadas las muestras, como primera acción se las etiquetará a fin de evitar confusiones, luego se levantarán los datos de campo.

Una vez etiquetadas, las muestras se colocarán en una conservadora con hielo para refrigerarlas en una caja convenientemente protegida de la luz directa. Realizada esta acción se llenará la cadena de custodia de las muestras, la cual será firmada por el personal responsable del muestreo, el encargado de transporte y la persona que las reciba en el laboratorio.

Las muestras que se recolecten en cada sección de control, una vez concluida la jornada de muestreo, de manera inmediata, serán transportadas al laboratorio de SPECTROLAB en la ciudad de Oruro, donde serán recibidas y preparadas para realizar los correspondientes análisis. El tiempo máximo entre la toma de muestras y la entrega al laboratorio, no será mayor a 12 horas.

1.4. Datos de campo

Durante la campaña de muestreo, en cada sección de control se levantarán algunos datos de campo, que permitan establecer las condiciones particulares del curso de agua en el momento de la toma de muestras, y los factores externos que pueden influir en la calidad de agua.

Punto de muestreo N°

Fecha de muestreo :
Hora de muestreo :
Ubicación Física :
Ubicación Geográfica: (WGS 84)
Caudal aforado :
Temperatura ambiente :
Temperatura del agua :
Clima :

2. BIOLOGÍA

2.1. Protocolo y cadena de custodia Herpetología

Los reptiles y anfibios serán coleccionados por el investigador, debiendo ser etiquetados con los datos de coordenadas geográficas, tipo de hábitat, fecha, hora y un número único del colector.

Se tomarán datos generales sobre el micro hábitat donde fue coleccionado.

Se describirá la actividad que estaba realizando el ejemplar antes de la captura

Cada individuo será colocado en una bolsa de plástico hasta llegar al laboratorio de campo y cada bolsa tendrá el mismo número único del colector.

En el laboratorio de campo cada individuo será fotografiado resaltando las características particulares y color.

Luego será eliminado de tal forma que queden con los músculos relajados, empleando una sobre dosis de anestesia, siguiendo los protocolos estandarizados y dependiendo si es anfibio o reptil.

De cada individuo coleccionado se tomaran las medidas corporales estandarizadas y se determinara su madures sexual.

Luego se procederá a su preparación en posiciones estereotipadas que permitan a los investigadores examinarlos fácilmente y con la mayor precisión, para ser fijados (endurecidos) empleando un concentrado de Formalina de acuerdo a la metodología estándar.

Una vez que el espécimen este fijado correctamente se lo lavara con agua y se lo colocara en el líquido conservante (alcohol al 80 % reptiles y alcohol al 70 % anfibios), dentro de recipientes plásticos con tapas de seguridad para evitar el derrame del conservante.

Las colecciones serán transportadas al laboratorio de la Colección Boliviana de Fauna en la ciudad de La Paz.

En la CBF se procederá a su registro de ingreso y posteriormente se procederá a su identificación.

2.2 Protocolo y cadena de custodia para mamíferos

Los pequeños mamíferos que sean capturados diariamente, serán coleccionados por el mismo individuo y serán etiquetados con los datos de microhábitat, localización de la trampa y fecha y un número único del colector.

Se tomarán datos generales del ambiente de la trampa, observaciones de la fenología de la vegetación y condición del clima.

Cada individuo será colocado en una bolsa de plástico hasta llegar al laboratorio de campo y cada bolsa tendrá el mismo número único del colector.

En el laboratorio de campo cada individuo será introducido en un frasco de plástico con tapa hermética con un algodón impregnado en Éter, para eliminar cualquier ectoparásito que pueda esta estar adherido al animal.

Cada individuo coleccionado será preparado como piel seca o espécimen en colección húmeda, dependiendo de las condiciones climáticas y de la disponibilidad de tiempo para la preparación de las muestras.

Si el espécimen fuera preparado como piel seca, el esqueleto del animal llevará el mismo número que su correspondiente piel.

Las colecciones secas serán transportadas en cajas de plástico protegidas con algodón, hasta llegar al laboratorio de la Colección Boliviana de Fauna en la ciudad de La Paz.

Una vez en el laboratorio se procederá a la limpieza del material óseo utilizando una colonia de Derméstidos (escarabajos del género Dermestes sp.).

El material óseo de cada individuo pasará por una limpieza con agua, agua oxigenada y formol para evitar que cualquier larva de estos escarabajos pueda sobrevivir.

El material óseo tendrá el mismo código de colector que la respectiva piel.

Las colecciones preservadas en formol al 10% serán transportadas al laboratorio, en donde se procederá al cambio de líquido preservante por alcohol al 96%.

De cada individuo se obtendrá solamente el cráneo, el cual recibirá el mismo tratamiento que 8,9 y 10.

El material óseo será guardado en frascos de plástico de 30 cc. y mantendrán el mismo código de colector que su respectiva piel.

2.3 Registro de aves acuáticas y terrestres

No.de registro:.....Fecha:.....Punto de muestreo..... de
 Coordenadas:.....Altitud:.....

No.	Nombre científico	Nombre común	Número de individuos	Hábitat	Observaciones

Anexo Encuesta de usos de las aves

No.de encuesta:.....Fecha:.....Punto de muestreo..... de
 Coordenadas:.....Altitud:.....

Nombre científico	Nombre Común	USOS				Observaciones
		Medicina	Comercio	Alimento	Uso tradicional	

Anexo Formulario para muestras de metales pesados en aves

No.de formulario:.....Fecha:.....Punto de muestreo.....
 Coordenadas:.....Altitud:.....

No.	Código de muestra	Nombre científico	Nombre común	Tipo de tejido	Observaciones

2.4 Consideraciones generales de registro y etiquetado para organismos acuáticos

Se debe tener una bitácora apropiada, con números de página foliadas (nunca usar hojas de papel sueltas), para tener toda la información sobre la muestra recolectada y a punto de etiquetar, esta información debe ser obtenida en el campo, en el mismo sitio de muestreo y no debe adelantarse o llevarse ya toda preparada.

Esta bitácora de campo debe concordar con las bitácoras mismas de uso y desempeño de las embarcaciones y de los equipo de medición empleados, con la finalidad de establecer en el futuro las condiciones reales con que se efectuó el muestreo, todo debe contenerse en este documento, que por su carácter se convierte en fundamental, básico y primordial.

La información que suele considerarse se especifica a continuación, teniendo en cuenta que el trabajo de gabinete se desarrollo siguiendo las especificaciones técnicas de escritorio, como de campo, lo cual debe corroborarse a plenitud y satisfacción completa:

- Localización, (longitud y latitud), Coordenadas geográficas, nombre del río, lago, etc., distancia y dirección de la ciudad mas cercana e importante y/ó cualquier otra descripción e información geográfica importante,
- Fecha de muestreo,
- Hora de muestreo,
- Profundidad, (superficial o profundidad),
- Tipo de muestreo,
- Volumen muestreado, longitud de arrastre,
- Descripción de la red y copo empleados,
- Velocidad a la cual se efectuó el arrastre,
- Distancia que se recorrió durante el arrastre,
- Descripción del arrastre, superficial o columna de agua,
- Tipo de preservativos usados, su concentración y pureza,
- Nombre del recolector,
- Número consecutivo del registro en la bitácora,
- Observaciones sobre el arrastre y/o sitio de muestreo.

Es conveniente anotar estos datos en etiquetas internas y externas para cada muestra.

Ya sea que la etiqueta se sumerja en la botella de la muestra o se amarre la etiqueta o se sujete con otro sistema.

La etiqueta debe verse finalmente de esta forma:

Longitud xxx, latitud xxx, Río San Andrés, a 30 km de Santa Catarina, camino empedrado, salida de la quinta del El Sol,
Fecha _____ Hora _____ Profundidad _____ medida con cuenta cable _____, tipo de muestreo _____
Transparencia _____; pH _____ Arrastre con red de plantón de xxx micras, con copo xxxxx; _____ metros de arrastre, velocidad de arrastre _____; _____ ml de formol al 5 %; xxx número del registro en la bitácora; número de hoja de custodia de muestra _____; Muestreador _____
Hora de entrega en el laboratorio _____

En la parte anversa de la etiqueta, deberá tenerse un rayado para escribir observaciones, que el muestreador y o transportista desee plasmar por escrito. Las siguientes tablas podrán ayudar a describir uniformemente las condiciones ambientales circundantes en el cuerpo de agua que se está estudiando, no pretende para nada ser la forma descriptiva perfecta. Quizas para cada cuerpo de agua o para todo el país se pueda establecer un estándar, lo cual ayudaría a uniformizar este tipo de descripciones de toda una basta región:

Registro en la bitácora de campo

Lugar _____ Fecha _____ Hora _____
Estación (Núm ó Codigo) _____ Profundidad _____ Color del agua _____
Transparencia _____ Olor _____

Datos meteorológicos:

Temperatura ambiente _____ °C; temperatura agua superficial _____ °C
Temperatura donde se toma la muestra _____ °C Temperatura del agua circundante al momento del arrastre _____ °C.
Dirección del viento _____ Velocidad del viento _____ (1)
Cantidad de nubes _____ (2), condiciones atmosféricas _____ (3)

En el caso de tener los datos numéricos es mejor, en caso de no tener la posibilidad entonces se atenderán los siguientes estándares y se compararán con los datos de la estación meteorológica más cercana y que tenga influencia.

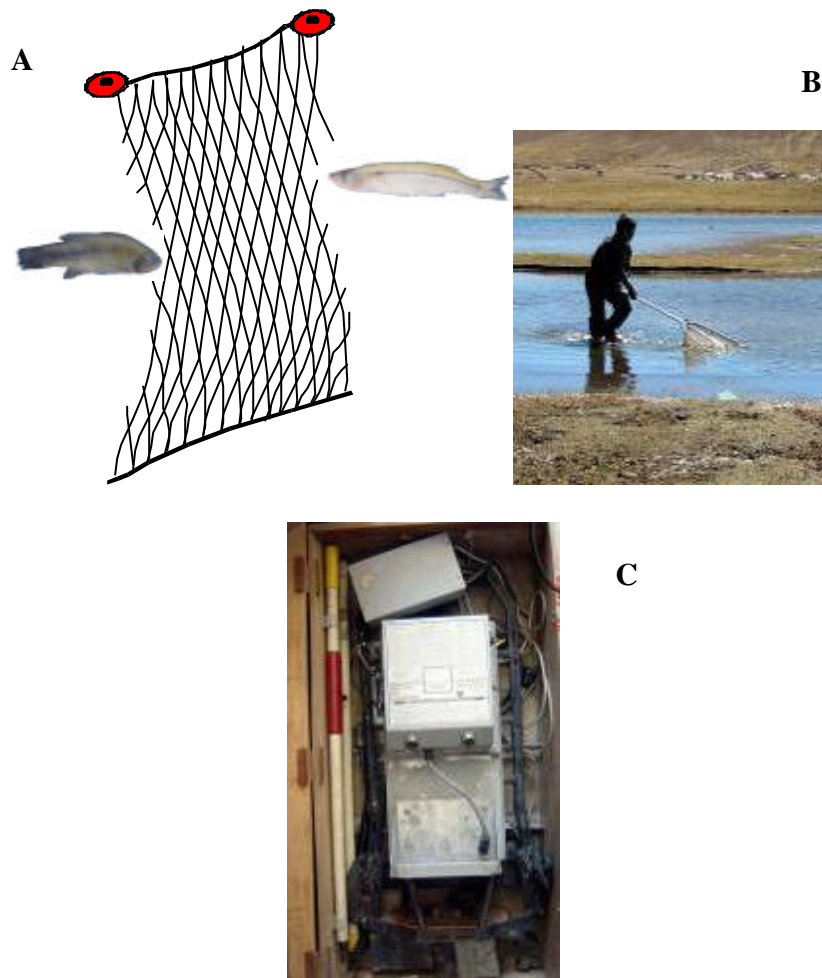
Número de escala	Cantidad de nubes (2)
0	Ninguna
1	1/8 de cielo cubierto
2	2/8 de cielo cubierto
3	3/8 de cielo cubierto
4	4/8 de cielo cubierto
5	5/8 de cielo cubierto
6	6/8 de cielo cubierto
7	7/8 de cielo cubierto
8	Cielo completamente cubierto
9	Cielo obscurecido



Red de muestreo del fitoplancton Caja de Schindler patalas para el muestreo de zooplancton



Draga tipo Ekman, muestreador del bentos en la zona profunda de ambientes lénticos (Lagos)



Aparejos utilizados para la captura de peces. A. Red agallera, B. Sakaña y C. Pesca eléctrica

2. PROTOCOLOS PARA ANÁLISIS DE SUELOS

RESUMEN

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Se siguen los siguientes pasos:

1. Ordenamiento, clasificación y registro de las muestras recogidas en el campo, asignándoles un número para su identificación durante los análisis.
2. Secado de las muestras hasta humedad ambiental, es decir secas al aire, extendiendo los suelos sobre una superficie no absorbente, a temperatura ambiente, hasta apreciarlas secas al tacto. Separación de algunos agregados para el estudio de propiedades físicas.
3. Obtención de tierra fina por tamizado a 2 mm y homogeneización.
4. Determinación del porcentaje de elementos gruesos (gravas, piedras y pedregones) y caracterización de los mismos. Se calcula este porcentaje mediante pesaje.
5. Entre 5-10 gramos de la tierra fina obtenida se muelen con ayuda de un mortero de ágata, acoplado a un agitador mecánico, regulado a una intensidad de 5 vibraciones por minuto y durante 15 minutos, hasta conseguir un tamaño máximo de 0.2 mm, para las determinaciones de carbonato cálcico total, materia orgánica y fósforo asimilable.

Color

El color en húmedo y en seco se determina con la luz natural, sobre los agregados reservados a tal efecto mediante la utilización de la guía Munsell Color Soil Charts.

Consistencia

Se determina en seco, húmedo y mojado, siguiendo la Guía de descripción de perfiles de suelo de la FAO (1977).

Análisis Granulométrico

Se tratan las muestras con agua oxigenada en caliente para la destrucción de la materia orgánica.

Para prevenir una mala dispersión se someten a un lavado de sales por diálisis en una membrana semipermeable y corriente de agua. La dispersión se realiza por agitación durante 8 horas en presencia de hexametáfosfato sódico.

Las fracciones gruesas se separan de las finas por tamizado en húmedo y separación en subfracciones por tamizado en seco mediante un juego de tamices en cascada,

para obtener las diferentes fracciones según los sistemas USDA, Unified, FAO e Internacional.

La arcilla y el limo se determinan por sedimentación, siguiendo el método de la pipeta de Robinson. Alternativamente se utiliza el densímetro o hidrómetro de Bouyoucos que consiste en medir la densidad de una suspensión de suelo en agua para distintos tiempos y relacionar dicha medida con la cantidad de partículas depositadas o en suspensión (arena, limo y arcilla). En la suspensión estable en un volumen de agua conocido la velocidad de sedimentación de las partículas depende de su tamaño (Ley de Stokes). Con la precipitación sucesiva de las distintas fracciones la densidad de la suspensión de suelo en agua disminuye. Esta densidad se mide con un densímetro de escala graduada. Cada división del densímetro corresponde a un aumento o disminución de 1 g en el peso total de agua contenida en una probeta (1 litro).

Carbono Orgánico Total

El carbono orgánico total (COT) de las muestras se oxida con dicromato potásico ($\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$), en presencia de ácido sulfúrico (digestión húmeda de Walkley-Black) y con Ag_2SO_4 como catalizador. El exceso de oxidante es valorado con sulfato ferroso amónico $\{\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}$ sal de Mohr 0.1 N. Se calcula la cantidad de carbono orgánico a partir del volumen de dicromato reducido.

Un método alternativo es la calcinación de las muestras durante 8 h a 450°C en horno mufla.

Reacción del Suelo o pH

Método potenciométrico basado en la comparación de la actividad de los iones H^+ frente a un electrodo de referencia. Dicho electrodo consiste en una membrana de vidrio neutro que contiene una solución de iones H^+ con una actividad determinada y que, al ser introducida en una solución de pH desconocido, desarrolla un potencial eléctrico proporcional a la diferencia de pH entre ambas soluciones. Requiere previa calibración con soluciones tampón.

La medida se hace directamente en la suspensión o extracto acuoso (proporción suelo: agua de 1:2.5 p/p) después de ser sometida a agitación durante 30 minutos. El pH-metro debe estar provisto de una sonda de temperatura.

Conductividad Eléctrica

La conductividad eléctrica, expresión de la concentración salina de la solución problema, se mide con el conductímetro, que en esencia es un puente de Wheatstone en el que una de las resistencias corresponde a la de la solución problema, mientras que otra es variable y permite igualar los potenciales de forma que por el galvanómetro no pase corriente.

La medida se realiza en un extracto de la pasta de saturación de la muestra mediante el empleo de un conductímetro. Los resultados se expresan en $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ a 25°C .

Nitrógeno Total

Basado en la técnica Kjeldahl mediante la cual las muestras de suelo se digieren con ácido sulfúrico y catalizadores. La mineralización del nitrógeno con ácido sulfúrico concentrado en caliente posibilita la transformación del nitrógeno en ión amonio, el cual posteriormente es destilado en medio alcalino y valorado. Se usa como catalizador solución sulfúrica de selenio y sulfato potásico para aumentar el punto de ebullición. La valoración se realiza en un aparato de destilación Bouat (Micro Kjeldhal), con H₂SO₄ 0.005 N.

Fósforo

Formación de complejo con el reactivo nitrovanadatomolibdico y medida con espectrofotómetro a 430 nm.

Para la fracción asimilable se procede a la extracción con carbonato cálcico y carbonato magnésico solubilizados con ácido sulfúrico y ácido acético y formación de un complejo fosfo-molibdico, con el empleo de una solución de amidol y lectura en fotolorímetro a una longitud de onda de 680 nm. Recomendado para suelos de reacción alcalina (pH > 6.5). El resultado expresado en ppm, se obtiene por interpolación en la curva patrón establecida, entre cantidades de P₂O₅ y la medida de absorbancia.

Bases y Capacidad de Intercambio Catiónico

Consiste en el intercambio de todos los cationes de cambio existentes en el suelo por otro catión, eliminación del exceso por lavado, desplazamiento del catión adsorbido y determinación cuantitativa del mismo.

Se determinan sobre la misma muestra, de forma sucesiva, con la siguiente secuencia de actuación:

1. Lixiviación del suelo con acetato amónico (1N y pH = 7) en un tubo de percolación, utilizando como obturador lana de vidrio.
2. Lavado con alcohol y saturación del complejo cambio con sodio por lixiviación con acetato sódico (1N y pH = 8.2), el lixiviado es desechado.
3. Lavado con alcohol y desplazamiento del sodio del complejo cambio con acetato amónico (1N y pH = 7).

Potasio y Sodio

El Potasio y sodio intercambiables se extraen con una solución de acetato amónico (pH = 7) conforme descrito en el punto anterior y posterior determinación por fotometría de llama. El elemento sometido a la llama de un mechero, emite la energía absorbida en forma de radiación con una frecuencia característica, siendo la intensidad de esta radiación directamente proporcional a su concentración.

Calcio, Magnesio y Metales Pesados

Se determina en un extracto. Los componentes de la muestra (a nivel de átomos o iones en estado gaseoso) se determinarse mediante medios espectrales de absorción. Para la obtención del extracto se trata la muestra de suelo seca (T.F.S.A.) sometiéndola a un ataque con ácido nítrico y perclórico. La determinación se realiza directamente mediante espectrofotometría de absorción atómica.