

143



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“VALIDACION DEL SISTEMA DE MEDICION DE
OXIGENO DISUELTO APLICANDO UN METODO
PARA DETERMINAR LA DEMANDA BIOQUIMICA
DE OXIGENO EN MUESTRAS DE AGUA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

SOFIA ROJAS CORDERO



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

MEXICO, D.F.,
TESIS CON
CALIFICACION



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. GARCIA PADILLA MARIA LUISA.
Vocal Prof. CARRERA GARCIA ISAURA LUISA.
Secretario Prof. MORA-TOVAR Y CHAVEZ ROSA LORENIA.
1er. Suplente Prof. AYALA MONDRAGON CONSUELO.
2do. Suplente Prof. MARTIN FUENTES RUTH EDITH.

Sitio donde se desarrollo el tema

Departamento de Control Analítico
Facultad de Química, U.N.A.M.
Edificio "B" sótano
Ciudad Universitaria. México, D.F.
Tel. 5622 37 17.

Asesor del Tema

Ana. Luisa Garcia P.
Q.F.B. GARCIA PADILLA MARIA LUISA

Supervisor técnico

Consuelo Ayala M.
Q.F.B. AYALA MONDRAGON CONSUELO

Sustentante

Sofia
SOFIA ROJAS CORDERO.

Agradecimientos:

A ti señor por darme la oportunidad de vivir y sentirte cerca en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis padres Felipe y Zenaida, por todo su cariño y apoyo incondicional, y por enseñarme a valorar todo lo que hoy tengo, gracias a ustedes.

A mis hermanos Gabriela, Javier y Jesús por mantenernos siempre juntos y por demostrarme que cuento siempre son ustedes.

A karlita por toda su alegría y ternura.

INDICE

	Página	
1	INTRODUCCION	5
2	OBJETIVOS	7
3	GENERALIDADES	
3.1	La importancia del agua y su contaminación	8
3.2	Evaluación de la calidad del agua	9
3.3	Gases disueltos en el agua	10
3.4	Oxígeno disuelto en el agua	10
3.5	Importancia del oxígeno en sistemas acuáticos	11
3.6	Importancia del oxígeno en la calidad del agua	13
3.8	Mecanismo de oxidación biológica	16
3.9	Metabolismo oxidativo	17
3.10	Tipos de contaminantes	20
3.11	Determinación de materia orgánica	21
3.12	Análisis fisicoquímicos relacionados con el contenido de materia orgánica del agua	22
3.13	Demanda bioquímica de oxígeno	25
3.14	Etapas de la Demanda Bioquímica de Oxígeno	28
3.15	Requisitos de la prueba	30
3.16	Cálculos	31
3.17	Oxímetro	32
3.18	Validación	32
4.0	PARTE EXPERIMENTAL	
4.1	Principio	36
4.2	Reactivos	36
4.3	Preparación de soluciones	40
4.4	Material, equipo e instrumentos	40
4.5	Comparación entre la concentración de la solución estándar comercial utilizada para la validación y la recomendada por la Norma ISO-5815-1989 (E)	41
4.5.1	Preparación de la solución estándar siguiendo la norma ISO-5815-1989 (E)	42
4.5.2	Determinación de la concentración de la solución estándar comercial utilizada para la validación del sistema	42
4.6	Procedimiento operatorio	45
4.6.1	Linealidad del sistema	45
4.6.2	Precisión del sistema	47
5	RESULTADOS	
5.1	Linealidad del sistema	50
5.2	Precisión del sistema	52
6	CONCLUSIONES	55

INDICE

	Página
CONTENIDO	
7 BIBLIOGRAFIA	
Referencias bibliográficas	71
8 APENDICES	
I. Método oficial ISO-5815-1989(E)	56
II. Oxímetro	67
III. Formulario	68

1. INTRODUCCION.

La contaminación causada por las actividades del hombre, ha obligado que se desarrollen sistemas de tratamiento eficientes, capaces de disminuir esta contaminación.

Considerando que las descargas de las aguas residuales en cualquier cuerpo de agua, provocan efectos adversos al ecosistema, se hace necesario determinar la cantidad de contaminantes permisibles en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, la agricultura y el hogar.

Uno de los métodos utilizados para el tratamiento de grandes volúmenes de agua contaminada es el biológico, que trata de la descomposición natural de los contaminantes presentes en el agua, mediante una población microbiana bien controlada.⁽¹⁾

La demanda bioquímica de oxígeno, es un parámetro que nos indica el grado de contaminación orgánica del agua, por lo tanto, debido a que la mayoría de los desechos alimenticios, aguas de desecho domésticas y residuales de fábricas, que van a dar a los cuerpos de agua, contienen grandes cantidades de materia orgánica, puede determinarse la demanda bioquímica de oxígeno en éstas.

La presencia de materia orgánica en el agua, es un indicador del grado de contaminación en ésta, ya que puede ser degradada por microorganismos aerobios que utilizan el oxígeno disuelto en el agua; en consecuencia, el oxígeno puede agotarse más rápido de lo que se genera, y los organismos que lo requieren para subsistir tienen que competir por él, afectándose la distribución de la vida en el agua.

Este parámetro es requerido para determinar las condiciones en que se encuentra el agua antes y después de ser tratada.

En el presente trabajo, se describirá la validación del sistema de medición del consumo de oxígeno, llevado a cabo por una población microbiana conocida, basándose en el método oficial ISO-5815-1989(E), pero llevándolo a las condiciones del laboratorio, para determinar la demanda bioquímica de oxígeno en agua.

Para validar el sistema de medición utilizado, en las condiciones del laboratorio, se evaluaron los siguientes parámetros.

- Linealidad del sistema
- Precisión del sistema (evaluada como repetibilidad).

La validación de este sistema de medición es importante para garantizar resultados confiables, con el grado de repetibilidad y linealidad requeridos.

2. OBJETIVOS

- Conocer la importancia de la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno y su relación con la calidad del agua.
- Realizar el método señalado por la norma ISO-5815-1989(E) (Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno después de 5 días DBO5. Dilución y siembra), para determinar la demanda bioquímica de oxígeno en muestras de agua, en las condiciones del laboratorio.
- Validar para las condiciones del laboratorio, el sistema de medición utilizado para determinar la demanda bioquímica, determinando la linealidad y la precisión evaluada como repetibilidad.

3. GENERALIDADES.

3.1. LA IMPORTANCIA DEL AGUA Y SU CONTAMINACION.

El agua es un elemento fundamental, de todo organismo vivo. Desempeña una función física (mantenimiento de la elasticidad de las células) y química (es un solvente en el cual se llevan a cabo reacciones metabólicas). El desarrollo de las actividades del ser humano como lo son: la agricultura, la industria, las vías de comunicación, etc., influyen en la calidad del agua.

De acuerdo con su uso, se puede clasificar en: ⁽¹⁾

- Potable.
- Doméstica.
- Comercial.
- Industrial.
- Agrícola.
- Pública.

Durante los últimos años los organismos oficiales se han concientizado del verdadero problema que supone el deterioro del medio ambiente. De especial importancia se encuentra el relacionado con las aguas residuales, tanto de origen urbano como industrial. Los contaminantes vertidos en dichas aguas ejercen un efecto directo, y a veces inmediato, en la flora y la fauna.

Los contaminantes son muchos y variados, entre ellos, los productos químicos que presentan un doble problema. Algunos son nocivos, venenosos y cancerígenos. Otros, aunque relativamente inocuos, tienen un serio efecto negativo al descomponerse en el agua, donde se oxidan provocando una disminución en la cantidad de oxígeno disuelto en ella.

La contaminación del agua puede definirse como la adición de materia extraña indeseable que deteriora su calidad. La materia extraña contaminante puede ser materia inorgánica como los compuestos de mercurio y plomo, o bien materia viva como los microorganismos. ⁽²⁾

Puede hablarse de dos fuentes de contaminación: ⁽³⁾

- Natural.
- Artificial.

La primera provocada por vertido de aguas provenientes de la erosión, o bien por aguas de lluvia que arrastran contaminantes hacia los cauces.

La contaminación artificial es aquella provocada por el hombre y que se ha acentuado por las grandes conglomeraciones y la industrialización, ocasionando un aumento considerable en la cantidad de desechos.

Algunos de estos contaminantes se depositan en los cuerpos de agua, y aunque éstos tienen la capacidad de asimilar cierta cantidad de contaminantes, sin tener efectos graves, ya que la dilución y los propios procesos de autopurificación lo permiten, en muchos casos dichos procesos resultan insuficientes.

Es de gran importancia evaluar la calidad del agua, para asegurar que es apta para usos benéficos como: bebida del hombre y animales, una vida marina sana, su uso en la agricultura, acarreo de desechos y recreación.

3.2 EVALUACION DE LA CALIDAD DEL AGUA

Para determinar la calidad del agua se utilizan determinaciones físicas, químicas y biológicas.⁽⁴⁾

- **PROPIEDADES FISICAS, DE AGREGACION Y QUIMICAS** .- Determinaciones de color, turbiedad, olor, acidez, alcalinidad, dureza, conductividad, salinidad, materia flotante, sólidos totales, temperatura, pruebas en lodos, gas digestor de lodo, sobresaturación de gas disuelto, determinación de metales (aluminio, antimonio, arsénico, bario, berilio, bismuto, cobre, plomo, etc.), determinación de constituyentes inorgánicos no metálicos (boro, bromuro, dióxido de carbono, cianuro, cloro, cloruros, nitrógeno, oxígeno disuelto, etc.), determinación de componentes orgánicos (demanda química de oxígeno, carbono orgánico total, halógeno orgánico disuelto, aceites y grasas, fenoles, surfactantes, ácidos orgánicos y totales, etc.), examen de la radiactividad de aguas limpias y residuales (cesio radiactivo, radio, estroncio radiactivo total y estroncio 90, tritio, uranio, etc.).

PROPIEDADES BIOLÓGICAS .- Métodos de prueba de toxicidad para organismos acuáticos (mutagenicidad, prueba de toxicidad en fitoplancton, procedimientos de prueba de toxicidad para peces, etc.), examen microbiológico de las aguas (recuento heterótrofo en placa, recuento microbiano total directo, técnica de fermentación en tubo múltiple para miembros del grupo coliforme, identificación de bacterias del hierro y del azufre, detección de bacterias patógenas, detección de hongos, etc.), análisis biológicos de aguas (determinación de plancton, identificación de organismos acuáticos), demanda bioquímica de oxígeno.

La demanda bioquímica de oxígeno es un parámetro significativo para determinar la contaminación del agua debida a la presencia de materia orgánica y por lo tanto, refleja la calidad del agua, ya que proporciona la cantidad de materia orgánica susceptible a la oxidación, llevada a cabo por una población microbiana, a través de la medición del consumo de oxígeno requerido por dicha población microbiana.

Por lo tanto, la cantidad de oxígeno disuelto es un importante indicador de la calidad del agua, ya que su presencia resulta indispensable para que se lleve a cabo la descomposición aerobia de la materia orgánica presente en el agua.⁽⁵⁾

3.3 GASES DISUELTOS EN EL AGUA.

Además de las sales y los compuestos orgánicos, hay pequeñas cantidades de gases disueltos en el agua que pueden ejercer influencia en el desarrollo de los microorganismos. Estos son principalmente oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno y en determinadas ocasiones la presencia de ácido sulfhídrico e hidrocarburos, así como hidrógeno molecular y monóxido de carbono. Su solubilidad disminuye al subir la temperatura.⁽⁶⁾

Todos los gases disueltos pueden formarse en el agua o en el sedimento por procesos bioquímicos:⁽⁶⁾

- Oxígeno .- Resulta de la asimilación de las plantas verdes.
- Monóxido de carbono.- Se origina en la respiración.
- Acido sulfhídrico.- Deriva de la desulfuración.
- Nitrógeno.- Procede de la desnitrificación.
- Hidrocarburos.- Proviene de las fermentaciones.

3.4 OXIGENO DISUELTO EN EL AGUA.

La concentración del oxígeno disuelto puede ser expresada en miligramos por litro (mg/L), en partes por millón (ppm), o como porcentaje de saturación.

La cantidad de oxígeno disuelto varía con la agitación o turbulencia, con la profundidad de la corriente (el agua de la superficie será más oxigenada) y la altitud, ya que se considera que la solubilidad es directamente proporcional a la presión. En la ciudad de México, a una altitud de 2200m y a una temperatura media de 20 ° C, la concentración de saturación del oxígeno disuelto en el agua es aproximadamente de 7 mg / L.⁽⁷⁾

3.5. IMPORTANCIA DEL OXIGENO EN SISTEMAS ACUATICOS.

El oxígeno es un elemento indispensable en la vida de los animales y de las plantas. Es necesario para la oxidación energética de la carboxihemoglobina y se produce como desecho en la fotosíntesis.

El oxígeno disuelto en los sistemas acuáticos proviene de la atmósfera (fuente física), ya que las aguas naturales y en particular las superficiales están en contacto con el aire atmosférico; y de la fotosíntesis (fuente biológica) ⁽⁸⁾. En un sistema balanceado, el oxígeno es reemplazado de acuerdo con su consumo.

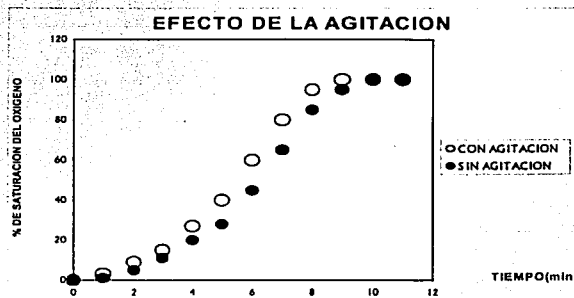
El término oxígeno disuelto se refiere a la cantidad de oxígeno libre disuelto en el agua y que se encuentra disponible para los organismos acuáticos.

Los factores que influyen en la solubilidad del oxígeno en el agua son:⁽¹⁾

- Temperatura.
- Presión.
- Coeficiente de solubilidad.
- Salinidad del agua.

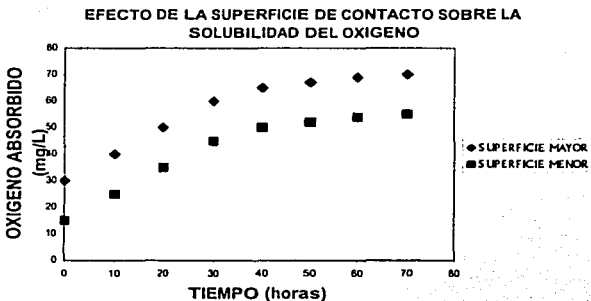
En todo caso la solubilidad del oxígeno en el agua, sigue las leyes de Henry y Dalton "La solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial e inversamente proporcional a la temperatura".

Gráfica No.1



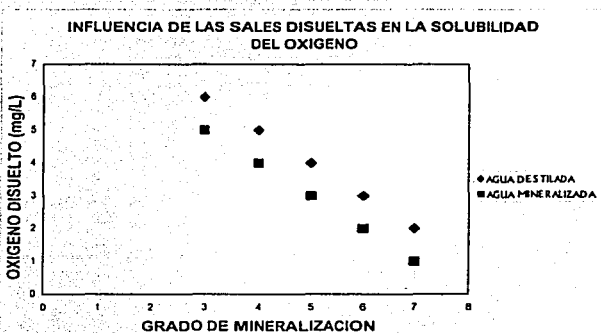
- a) En la gráfica No.1, es posible observar que la distribución del oxígeno en el agua está afectada por la turbulencia o agitación violenta. ⁽⁸⁾

Gráfica No.2



- b) En la gráfica No.2 se presenta la influencia de la superficie puesta en contacto con el oxígeno. Se muestra el oxígeno absorbido en relación con el tiempo de contacto y el oxígeno absorbido en el mismo tiempo, pero con una superficie de contacto siete veces menor. ⁽⁸⁾

GRAFICA No.3



- c) En la gráfica No.3 se presenta la influencia de las sales disueltas en la disolución del oxígeno. Se observa que el agua destilada absorbe más oxígeno que el agua mineralizada. ⁽⁸⁾

3.6 IMPORTANCIA DEL OXIGENO EN LA CALIDAD DEL AGUA.

Todas las aguas naturales poseen cierta capacidad de autopurificación por procesos biológicos, en el caso de aguas contaminadas este proceso de autopurificación depende del origen y la cantidad de materia contaminante. Los factores más importantes que afectan este proceso son el tiempo de aireación, condiciones de temperatura, velocidad de flujo u oleaje, luz solar, características químicas y físicas del cuerpo de agua. ⁽⁷⁾

En el proceso de autopurificación los microorganismos utilizan como alimento la materia orgánica presente en el agua, estos microorganismos forman un microecosistema constituido por bacterias, hongos y algas; es decir, ejercen una acción depuradora mediante su actividad metabólica. Estos microorganismos se encuentran presentes o son aportados por los vertidos de contaminantes. En este proceso de autopurificación, los microorganismos descomponen la materia orgánica en compuestos simples como lo son el dióxido de carbono o el metano; si no existieran los microorganismos, la materia orgánica se acumularía y aumentaría la contaminación.

(3) Existen dos tipos de descomposición en función de los microorganismos que intervienen.

- **Descomposición Aerobia.** Esencialmente se lleva a cabo por fenómenos de oxido-reducción con el consumo o liberación de oxígeno disponible en el aire o el agua, actuando los microorganismos aerobios, cuyo elemento energético es el oxígeno disponible.
- **Descomposición Anaerobia.** Consiste en una serie de procesos que se desarrollan en un medio que carece de oxígeno molecular. Los microorganismos responsables de esta descomposición son anaerobios estrictos o facultativos.

En general, los procesos aerobios son bioquímicamente más eficientes y rápidos, que los anaerobios, generando productos secundarios que son químicamente más simples y están altamente oxidados, como el dióxido de carbono y el agua.

Al ser utilizada la materia orgánica por los microorganismos en los procesos aerobios, se consume el oxígeno disuelto en el agua, si la cantidad de oxígeno no es suficiente, sólo podrán continuar los procesos anaerobios que producen una purificación más lenta además de generar subproductos inconvenientes. Por lo tanto, la cantidad de oxígeno disuelto en el agua es un factor limitante en el proceso de autopurificación.

Una corriente anaerobia de agua representa un peligro para la salud, ya que ciertas bacterias anaerobias son peligrosas, además de que se generan compuestos tóxicos; por ejemplo, cuando en el agua existen sulfatos disueltos, las bacterias anaerobias reductoras de sulfatos producirán el sulfuro de hidrógeno que es venenoso, corrosivo y de olor desagradable. Otros productos de procesos anaerobios son los ácidos orgánicos que pueden ser tóxicos e inhibidores para ciertos organismos vivos. ⁽⁷⁾

3.7 RESPIRACION BACTERIANA.

La respiración bacteriana se refiere a toda la energía producida por las reacciones que ocurren dentro de la célula, estas reacciones consisten en la oxidación de sustancias químicas presentes en el medio en el cual la bacteria se desarrolla. La respiración tiene dos funciones principales e inseparables. ⁽⁹⁾

- Suministrar la energía necesaria para la vida y desarrollo de la bacteria.
- Transformar una porción considerable de los compuestos oxidados a sustancias que puedan ser asimiladas y sintetizadas dentro de nuevo material celular.

Cuando una sustancia es oxidada, otra deberá ser simultáneamente reducida. La sustancia oxidada pierde electrones los cuales son adquiridos por la sustancia reducida.

Esta transferencia de electrones se observa fácilmente en las reacciones de oxidoreducción de iones inorgánicos. Ejemplo:



Donde el Fe^{3+} claramente acepta un electrón del Cu^{+} , reduciéndose a Fe^{2+} .

Cuando los compuestos orgánicos son oxidados, como sucede en la mayoría de las reacciones de respiración bacteriana, los átomos de hidrógeno son transferidos como electrones.

Una corriente anaerobia de agua representa un peligro para la salud, ya que ciertas bacterias anaerobias son peligrosas, además de que se generan compuestos tóxicos; por ejemplo, cuando en el agua existen sulfatos disueltos, las bacterias anaerobias reductoras de sulfatos producirán el sulfuro de hidrógeno que es venenoso, corrosivo y de olor desagradable. Otros productos de procesos anaerobios son los ácidos orgánicos que pueden ser tóxicos e inhibidores para ciertos organismos vivos. ⁽⁷⁾

3.7 RESPIRACION BACTERIANA.

La respiración bacteriana se refiere a toda la energía producida por las reacciones que ocurren dentro de la célula, estas reacciones consisten en la oxidación de sustancias químicas presentes en el medio en el cual la bacteria se desarrolla. La respiración tiene dos funciones principales e inseparables: ⁽⁹⁾

- Suministrar la energía necesaria para la vida y desarrollo de la bacteria.
- Transformar una porción considerable de los compuestos oxidados a sustancias que puedan ser asimiladas y sintetizadas dentro de nuevo material celular.

Cuando una sustancia es oxidada, otra deberá ser simultáneamente reducida. La sustancia oxidada pierde electrones los cuales son adquiridos por la sustancia reducida.

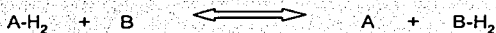
Esta transferencia de electrones se observa fácilmente en las reacciones de oxidoreducción de iones inorgánicos. Ejemplo:



Donde el Fe^{3+} claramente acepta un electrón del Cu^{+} , reduciéndose a Fe^{2+} .

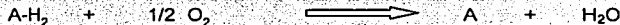
Cuando los compuestos orgánicos son oxidados, como sucede en la mayoría de las reacciones de respiración bacteriana, los átomos de hidrógeno son transferidos como electrones.

La mayoría de las reacciones biológicas deben ser simplemente consideradas en términos de transferencia de hidrógeno.



Donde AH_2 es la sustancia que se va a oxidar o bien la donadora de hidrógeno, mientras que B es el agente oxidante o bien el aceptor de hidrógeno. Las reacciones de oxido-reducción de la respiración no proceden espontáneamente, ya que requieren de la presencia de enzimas específicas.

Las oxidaciones biológicas son usualmente clasificadas en Aerobias o Anaerobias. Si el aceptor de hidrógenos es el oxígeno molecular, se dice que la oxidación es aerobia. Si el aceptor de hidrógenos es otra sustancia que no sea oxígeno, la reacción es anaerobia. Por lo tanto, la presencia o ausencia del oxígeno es de importancia crítica en el metabolismo de la bacteria.

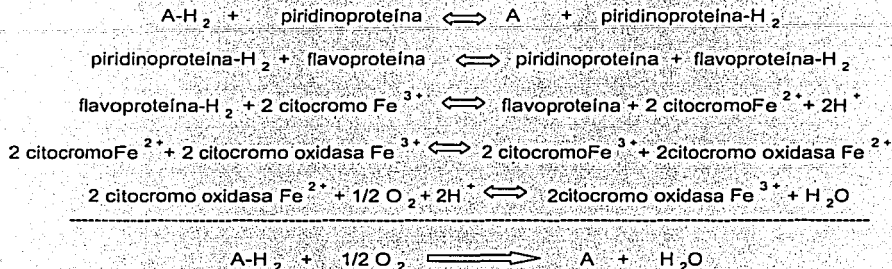


En general, la oxidación biológica se realiza en la célula mediante reacciones catalizadas por enzimas, y consiste en esencia, en la combinación del oxígeno con los distintos materiales orgánicos, produciéndose energía. Una parte de esta energía se transforma en calor y la otra la utiliza la célula para su respiración.⁽¹⁰⁾

En este proceso, el hidrógeno se oxida a agua (H_2O) y el carbono se reduce a dióxido de carbono (CO_2).

3.8 MECANISMO DE OXIDACION BIOLÓGICA.

Las bacterias no obtienen energía de la sustancia oxidada en un solo paso, sino de la suma de consecutivas reacciones de oxido-reducción, cada una de ellas catalizadas por enzimas específicas. Considérese la ecuación general de oxidación aerobia, como se describe para la mayoría de las bacterias:⁽¹⁰⁾



Las características de las enzimas respiratorias son :⁽⁹⁾

- Intervienen en las reacciones reversibles de oxido-reducción, cumpliendo tanto con su función catalítica como con su función de intermediaria transportadora de hidrógeno.
- Cada enzima existe en ambos estados, el oxidado y el reducido.
- La enzima que oxida la fuente de energía no puede transferir directamente el hidrógeno y electrones del sustrato al oxígeno, mientras que la enzima que reacciona finalmente con el oxígeno no puede oxidar al sustrato.

3.9 METABOLISMO OXIDATIVO

El metabolismo de los hidratos de carbono puede llevarse a cabo por varias vías metabólicas, lo cual implica la transferencia de los electrones hidrógeno, a compuestos de mayor potencial redox, liberando energía (ATP) al finalizar el metabolismo. Todos aquellos carbohidratos de 4, 5 y 6 átomos de carbono, son inicialmente degradados a ácido pirúvico.

La glucosa constituye la principal fuente de carbono para las bacterias y puede ser degradada por tres vías metabólicas:⁽¹¹⁾

- la vía de Entner-Doudoroff (ED)
- la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)
- la vía Warburg-Dickens (Hexosamonofosfato o HMP).

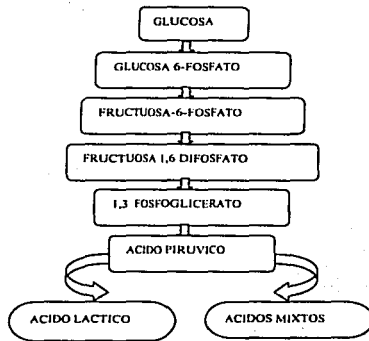
La conversión de glucosa a ácido pirúvico se lleva a cabo por las tres vías, las bacterias utilizarán cualquiera de ellas, dependiendo de su constitución enzimática y de la presencia o ausencia de oxígeno.

La EMP, degrada a la glucosa en ausencia de oxígeno, por lo que también es denominada vía glucolítica o anaerobia, la cual es ocupada por las bacterias anaerobias y aerobias facultativas.

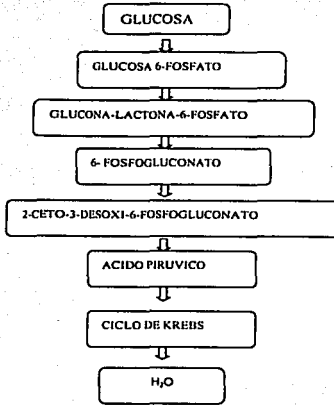
La vía HMP, en sus primera etapas de degradación de la glucosa es semejante a la vía ED. Es llevada a cabo por aquellas bacterias que son incapaces de utilizar el ciclo de Krebs y de transferir el ion hidrógeno al oxígeno, y por lo tanto degradan la glucosa formando ácido pirúvico.

La vía ED también conocida como la vía aerobia, requiere de la presencia del oxígeno para llevar a cabo la glucólisis, en donde la glucosa es oxidada a 6-fosfogluconato y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, antes de formar el ácido pirúvico; algunas bacterias forman directamente estos compuestos sin que haya una fosforilación inicial.

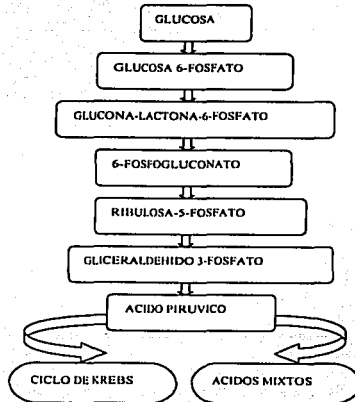
VIA EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP)



VIA ENTNER-DOUDEROFF (ED)

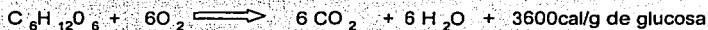


VIA HEXOSA MONOFOSFATO (HMP)

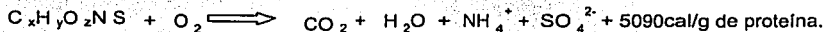


La glucosa tiene una tasa excepcionalmente alta y variable de oxidación, pero cuando se utiliza junto con el ácido glutámico, dicha tasa se estabiliza y es similar a la obtenida con muchas aguas residuales.⁽⁴⁾

La descomposición de carbohidratos llevada a cabo por las bacterias en presencia de oxígeno, es un proceso que rinde mayor energía. Por ejemplo la transformación de la glucosa puede representarse por la siguiente ecuación:⁽¹²⁾



Todas las proteínas contienen nitrógeno, carbono, hidrógeno, oxígeno y algunas azufre, por lo que la descomposición aerobia puede ser representada por la siguiente ecuación no equilibrada, en la que la proteína esta representada por la fórmula $C_xH_yO_zN_s$:



Estas reacciones son típicas de la primera etapa de acción bacteriana en la desoxigenación de las aguas contaminadas.

3.10 TIPOS DE CONTAMINANTES

La materia orgánica, inorgánica y muchos microorganismos son degradados por los procesos naturales de autopurificación, en donde sus concentraciones se reducen con el tiempo. Este proceso dependerá de la naturaleza del contaminante y de otros factores ambientales. La materia inorgánica no es afectada la mayoría de las veces, por ello sólo se reduce su concentración por dilución.

Las sustancias orgánicas suspendidas y disueltas en el agua tienen importancia, ya que sirven de nutrientes a los microorganismos carbono-heterótrofos. De su concentración y composición dependen en gran parte el volumen y la combinación específica de las poblaciones de bacterias y hongos de las aguas. Aquellas aguas que no se encuentran contaminadas, contienen concentraciones bajas de material orgánico. De las materias orgánicas disueltas se ha encontrado la siguiente proporción:⁽⁶⁾

Hidratos de carbono	83.7 %
Proteínas	15.6 %
Lípidos	0.7 %

La proporción de sustancias orgánicas es un factor limitante en muchas aguas para el desarrollo de bacterias y hongos saprófitos. Por consiguiente, la microflora presente en el agua reacciona con gran rapidez a los cambios que experimenta la composición de las sustancias orgánicas.

Las características generales de los contaminantes son:⁽³⁾

- **Compuestos tóxicos.**- Provocan la reducción o inhibición de la vida en el agua, por lo general provienen de descargas industriales. Se pueden incluir metales pesados, pesticidas y herbicidas.

- **Materiales que afectan el balance del oxígeno en el agua:**
 - **Sustancias que consumen oxígeno:** pueden ser materiales orgánicos, los cuales son bioquímicamente oxidados o agentes inorgánicos reducidos.

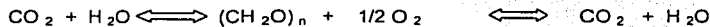
 - **Aceites y grasas que forman una capa protectora en la superficie del agua,** formando una interfase entre el aire atmosférico y el agua, reduciendo así la ruta de transferencia del oxígeno.

 - **Contaminantes térmicos,** ya que la saturación del oxígeno disuelto se reduce con el aumento de temperatura.

- **Sustancias inertes suspendidas o sólidos disueltos,** que en grandes concentraciones pueden causar problemas.

3.11 DETERMINACION DE MATERIAS ORGANICAS.

Un sistema acuático equilibrado presenta una relación de tipo estequiométrica en las reacciones de síntesis y metabolización de materia orgánica. A continuación se muestra este equilibrio mediante la ecuación química no balanceada.



De manera que no acumula exceso de materia orgánica, ni arroja oxígeno a la atmósfera, ni presenta anoxia ni lodos negros en el fondo. Los ecosistemas acuáticos cargados con demasiada materia orgánica, no presentan el equilibrio mencionado anteriormente y se caracterizan por poseer un déficit de oxígeno y un acúmulo de materia orgánica en diversos grados de metabolización. Estas características los convierten en sistemas inestables, considerados como poco útiles para usos humanos como lo son para uso como aguas potables, de pesca, de recreación e incluso industriales.⁽⁶⁾

El problema se centra pues, en el acúmulo de materia orgánica y en cómo eliminarla para restaurar las características adecuadas al uso humano del agua contaminada. Por ello, deben desarrollarse técnicas que determinen el contenido de materia orgánica de un agua sin tratar y su disminución una vez tratada, o bien eliminar la fuente de contaminación. Esto no es sencillo, porque debido a que la materia orgánica no es un conjunto de sustancias fácilmente clasificables y de características homogéneas, determinables con reproducibilidad por uno o más análisis.

Así pues, no existe un único análisis que nos ofrezca el resultado de peso de materia orgánica por volumen de agua, sino varios análisis que, a pesar de haber sido estandarizados, son poco reproducibles y miden algunos tipos de materia orgánica en forma indirecta. Otros análisis con mejor reproducibilidad, pero que la miden de forma todavía más indirecta, requieren para su interpretación de considerable conocimiento del funcionamiento de los ecosistemas acuáticos.⁽⁶⁾

3.12 ANALISIS FISICOQUIMICOS RELACIONADOS CON EL CONTENIDO DE MATERIA ORGANICA EN EL AGUA.

Los análisis para determinar materia orgánica pueden ser clasificadas en dos tipos:⁽¹³⁾

1. Análisis relacionados con el grado de oxidabilidad de la materia orgánica.

- 1.1 Demanda inmediata de oxígeno (DIO) y demanda autooxidable de oxígeno (DAO).
- 1.2 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda bioquímica de oxígeno a los 5 días (DBO5).
- 1.3 Demanda química de oxígeno (DQO).
- 1.4 Carbono orgánico total (COT).

2. Análisis relacionados con el efecto de un desequilibrio por acúmulo de materia orgánica en el sistema acuático.

- 2
- 2.1 Concentración de oxígeno disuelto (OD).
 - 2.2 Potencial redox (Eh)
 - 2.3 Función de concentración de hidrogeniones (pH).
 - 2.4 Azufre reducido (S^{2-} y HS^-).
 - 2.5 Metano (CH_4)

1.1 DEMANDA INMEDIATA DE OXIGENO (DIO) Y DEMANDA AUTOOXIDABLE DE OXIGENO (DAO).

Ambas representan el efecto substractivo de oxígeno que presentan algunas sustancias químicas reductoras, en aguas naturales o contaminadas por el hombre, al margen o no de procesos biológicos.

La DIO es el consumo de oxígeno de un agua durante un período de reacción de 15 minutos, tras diluir la muestra - en caso de ser necesario- con agua destilada aireada. Este análisis determina los compuestos inorgánicos oxidables con velocidad de reacción elevada, tipo sulfuros, sulfitos y sales ferrosas.

La DAO se obtiene de la misma forma que la DBO, pero añadiendo una sustancia microbicida apropiada (tipo $HgCl_2$, 40 mg / L) en muestras que se van a incubar, de manera que al final sólo se habrán revelado los consumos lentos de oxígeno de orden químico.

1.2 DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO (DBO). (sección 3.13).

1.3 DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO)

El requerimiento de la demanda química de oxígeno se utiliza como una medida del equivalente de oxígeno contenido en la materia orgánica de una muestra susceptible a la oxidación por un oxidante químico fuerte. Está en función de las características de los materiales presentes, de sus proporciones y de las posibilidades de oxidación. El resultado se expresa en mg/L de oxígeno cedido por el oxidante/L de muestra. Ya que el grado de oxidación de la materia orgánica dependerá del reactivo oxidante y de las condiciones de trabajo adoptadas.

1.4 CARBONO ORGANICO TOTAL (COT).

El carbono orgánico total es la cantidad de carbono de materia orgánica contenida en la muestra. Se basa en la oxidación completa de la muestra y la subsecuente determinación de la cantidad de dióxido de carbono producido. Entre los compuestos orgánicos, mide los fijos y volátiles, tanto naturales como sintéticos; según se filtre o no el agua (0.45 m de diámetro de poro) se obtiene el carbono disuelto o total. Esta medida permite estimar la demanda de oxígeno debida a los vertidos y establecer una correlación con la DBO y la DQO.

2.1 CONCENTRACION DE OXIGENO DISUELTO (OD).

La concentración de oxígeno disuelto (OD) de un agua se ve rápidamente afectada por el acúmulo excesivo de materia orgánica, sobre todo cuando la turbulencia (agitación) del agua no es suficiente como para reponer desde la atmósfera u otra fuente, el oxígeno disuelto que se gasta en la metabolización de la materia orgánica del agua. El oxígeno disuelto se mide con el análisis de Winkler o con el electrodo de oxígeno.

2.2 POTENCIAL REDOX.

El potencial redox (Eh) es una medida del estado de oxidorreducción de los materiales disueltos en una muestra de agua, es decir, es una medida de la ganancia en electrones - o en hidrógenos, o la pérdida de oxígeno- (reducción) o viceversa (oxidación) de los materiales del agua. Se mide con un potenciómetro que cuente con escala de voltaje y un electrodo de referencia de platino, además del de hidrógeno.

Según Margalef, los valores teóricos límite en el agua entre los que puede oscilar el Eh son aproximadamente de + 800 a - 400 mV.

El potencial redox varía en función del pH (disminuye 58-59 mV por cada unidad de pH que aumenta).

En aguas bien oxigenadas, el Eh se mantiene aproximadamente entre 400 y 600 mV, variando significativamente sólo cuando varía el pH.

2.3 pH

El pH puede presentar diferentes tipos de comportamiento según sea el medio químico que lo produce: a mayor acidez natural del agua (menor mineralización y por lo tanto, menor reserva alcalina) menos amortiguado estará el pH. Esta actividad biológica se da con gran cantidad de nutrientes y luz suficiente (fotosíntesis), o con un acúmulo de materia orgánica (respiración) que a su vez puede dar también exceso de nutrientes al degradarse en presencia de oxígeno. Ambos procesos afectan el pH de aguas poco alcalinas, actuando a través del equilibrio carbónico-carbonatos: la fotosíntesis retira CO_2 y alcaliniza fuertemente el medio, y la respiración aporta CO_2 , por este motivo, una variación en la columna de agua que oscile entre la fuerte alcalinidad en la superficie y la neutralidad y/o ligera acidez en el fondo, indica una elevada inestabilidad del ecosistema, producida por acúmulo de materia orgánica.

2.4 AZUFRE REDUCIDO. (S^{2-} y HS^-).

La producción de ácido sulfhídrico en el agua, es uno de los indicadores más fácilmente detectables en forma directa por el ser humano, debido a su olor aún en concentraciones muy bajas (0.025-0.25 g / L). El H_2S se produce directamente de la materia orgánica por la metabolización de dos aminoácidos que contienen azufre, cistina y cisteína, y se acumula siempre que el Eh sea suficientemente bajo como para evitar su oxidación a sulfato. Por otro lado, aguas con elevado contenido en sulfatos naturales (procedentes, por ejemplo, de la disolución de yesos de la cuenca hidrológica) y mucha materia orgánica, producen adicionalmente H_2S por reducción de los sulfatos en Eh suficientemente bajo.

La producción de H_2S continúa con la metanogénesis porque existen bacterias capaces de utilizar el metano producido y combinarlo con sulfatos procedentes de estratos más oxidados para crecer y dejar H_2S como residuo. Asimismo las aguas termales pueden poseer concentraciones naturalmente elevadas de H_2S proveniente de origen geológico.

2.5 METANO

El metano (CH_4) es un gas resultado de la actividad de las bacterias metanogénicas, cuando la materia orgánica se ha acumulado suficientemente para bajar el Eh a un mínimo de -250mV. La metanogénesis puede resultar un fenómeno deseable como producto de digestores que pretendan el uso posterior del gas como energético, e indeseable en lagunas de estabilización a cielo abierto y pantanos, en donde su elevado riesgo de explosión la hacen peligrosa.

3.13 DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es una medida del consumo de oxígeno requerido por una población microbiana, la cual lleva a cabo la oxidación de materia orgánica presente en el agua.⁽¹⁴⁾ Siendo un parámetro de contaminación, ya que indica la cantidad de materia orgánica susceptible a la descomposición y es un importante índice de su concentración.

El término demanda bioquímica de oxígeno se utiliza comúnmente con referencia a descarga de efluentes (desechos industriales o domésticos) y aguas contaminadas. Es de gran importancia el conocimiento de la DBO, ya que nos indica el impacto de la descarga de efluentes en aguas naturales, al disminuir o agotarse el contenido de oxígeno disuelto. Una vez que el oxígeno se ha agotado, los propios procesos de purificación disminuyen abruptamente. Los productos de fermentación y la reducción de nitratos y sulfatos, conllevan a la presencia de olor nauseabundo, sabor y color en el agua, hasta llegar a ser anaerobia o séptica.⁽¹⁵⁾

La oxidación biológica de la materia orgánica presente en una muestra, puede tomar varias semanas, por lo tanto, para propósitos prácticos se utilizan períodos de incubación más cortos, en los que se lleve a cabo una proporción elevada de la descomposición total, además de cuidar el parámetro de la temperatura.

La demanda bioquímica de oxígeno, frecuentemente utiliza el método de dilución y siembra, también llamado DBO5-días, este método nos da una medida indirecta de la cantidad de compuestos orgánicos biodegradables existentes en el agua. Expresa el oxígeno consumido por una dilución apropiada de la muestra del agua, durante 5 días de incubación a 20°C (68°F). Durante este período, las bacterias aerobias consumen el oxígeno disuelto en proporción a la cantidad de materia orgánica presente.

La DBO5 representa una medida de laboratorio no exacta, por lo que la extrapolación de tal valor a la DBO real de un cuerpo de agua es cuestionable; una misma carga orgánica puede dar valores muy diferentes, según sea la naturaleza de las sustancias implicadas y su diferente biodegradabilidad. Para muchos compuestos, la metabolización exige largos intervalos de tiempo y el consumo de oxígeno a los 5 días es bajo, aunque la demanda ulterior resulte elevada.

Por añadidura, a pesar de la adopción de un procedimiento normalizado, dicha determinación proporciona resultados poco reproducibles, agravado por la presencia en ciertos efluentes de sustancias bactericidas o bacteriostáticas y por el posible cambio en las condiciones naturales que representa la dilución en agua destilada (aún enriquecida con nutrientes e inóculo) y el confinamiento en un recipiente cerrado, todo lo cual contribuye a falsear los resultados. Sin embargo la DBO5 es un descriptor de contaminación ampliamente usado, especialmente para detectar la eficiencia en la eliminación de la materia orgánica de sistemas de tratamiento.⁽¹⁶⁾

Para asegurar que los resultados obtenidos son significativos, la muestra proveniente del efluente deberá ser convenientemente diluida con agua de dilución especialmente preparada, de modo que existan nutrientes y oxígeno disponibles durante el período de incubación. Generalmente se preparan varias diluciones para cubrir todos los posibles valores.

La necesidad de diluir la muestra antes de incubarla, es para equilibrar el suministro y requerimiento de oxígeno, por parte de la población microbiana. De tal forma que al final quede entre un 40 y 50% de oxígeno disuelto; o bien quede un mínimo de oxígeno superior a 1mg/L, hasta alcanzar un nivel estacionario donde ya no se consume más oxígeno. ⁽⁴⁾

DILUCIONES RECOMENDADAS PARA DBO5. ⁽¹⁷⁾

PROBABLE DBO5 mg/L	Factor de dilución	Resultado redondeado a	Generalmente aplicable a
3 a 6	entre 1 y 2	0.5	R
4 a 12	2	0.5	R, E
10 a 30	5	0.5	R, E
20 a 60	10	1	E
40 a 120	20	2	S
100 a 300	50	5	S, C
200 a 600	100	10	S, C
400 a 1200	200	20	I, C
1000 a 3000	500	50	I
2000 a 6000	1000	100	I

Donde:

R = Agua de río.

E = Agua de alcantarillado.

S = Agua de alcantarillado clarificada o agua de efluentes industriales débilmente contaminada.

C = Agua de alcantarillado bruta.

I = Agua de efluente industrial muy contaminada.

El agua de dilución se inocula, con el objeto de introducir una población biológica capaz de oxidar la materia orgánica presente. Cuando la muestra tiene una gran población de microorganismos, no es necesario efectuar dicha inoculación.

El empleo de un inóculo inadecuado ocasiona el desarrollo de otros microorganismos que son los que oxidan la materia orgánica específicamente. Puede suceder que dicho inóculo no sea lo suficientemente activo como para la oxidación de la materia orgánica carbonosa. El agua residual doméstica, los efluentes no clorados, o desinfectados por otros medios, las aguas de superficie que reciben las descargas de agua residual, contienen poblaciones microbianas satisfactorias. El agua de un lago o río que haya estado recibiendo determinado desecho industrial, debido a que los microorganismos activos de la oxidación han tenido suficiente tiempo de adaptación a esas condiciones de vida también pueden utilizarse como inóculo. Por último puede utilizarse un inóculo comercial. Cuando no se disponga de ninguno de estos, utilícese el sobrenadante del agua residual doméstica después de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante al menos 1 hora, pero no más de 36 horas. ^(7,18)

La demanda de oxígeno en aguas de desagüe, aguas contaminadas y desechos industriales, se debe a la oxidación de tres clases de sustancias: ⁽¹⁹⁾

- Materia orgánica carbonosa, que es aprovechada como nutriente por los microorganismos aerobios.
- Materiales nitrogenados oxidables que se deriven de nitritos, amoníaco y nitrógeno orgánico, que sirven como nutrientes de bacterias específicas como Nitrosomonas sp. y Nitrobacter sp
- Algunas sustancias reductoras como: hierro ferroso, sulfitos y sulfuros; que puedan reaccionar con el oxígeno disuelto.

En aguas de desecho domésticas sedimentadas, aguas contaminadas y para la mayoría de los fines prácticos del método, la cantidad de la demanda bioquímica de oxígeno se debe al primer grupo de sustancias.

En aguas tratadas biológicamente, una cierta cantidad de la DBO se debe a la oxidación de los compuestos mencionados en segundo término.

La oxidación de las sustancias de la clase 3, no se considera en la demanda bioquímica de oxígeno, ya que como se mencionó anteriormente este método sólo considera la degradación carbónica y nitrogenada.

3.14 ETAPAS DE LA DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO.

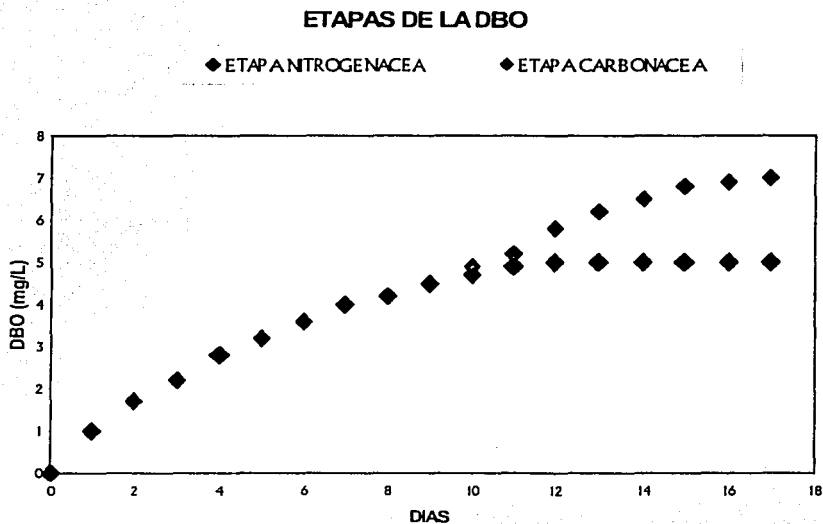
La transformación biológica de la materia orgánica se realiza en dos etapas: (7,18)

1ª. Etapa: Se oxidan principalmente los compuestos carbonados (demanda carbonácea).

2ª. Etapa: Se oxidan los compuestos nitrogenados (demanda nitrogenácea).

En la gráfica No.4, se muestra la curva típica de las etapas de la demanda bioquímica de oxígeno.

Gráfica No.4



La primera comienza inmediatamente y termina aproximadamente a los 20 días, a una temperatura de 20 ° C. La segunda no comienza antes de los 10 días, a 20 ° C.

De la clase de sustancias presentes depende la forma en que se ejerce la demanda. El punto final puede alcanzarse después de mucho tiempo, por eso se ha aceptado como regla general el período de 5 días de incubación a 20 ° C. Aunque el proceso de oxidación es lento y no se cumple en el período de 5 días, la mayoría de los compuestos orgánicos sencillos como es el caso de la glucosa, son oxidados completamente en 5 días, pero las aguas provenientes de cloacas domésticas son oxidadas sólo en un 65 % y los compuestos orgánicos complejos pueden ser oxidados sólo en un 40 %, en este período.

Sin embargo, la demanda bioquímica de oxígeno se ve modificada por el oxígeno requerido para la nitrificación, pero debido al lento crecimiento de bacterias nitrificantes, este efecto no es importante hasta después de 8 a 10 días. En el caso de aguas tratadas, el proceso de nitrificación puede aparecer en un período de 1 a 2 días, debido a la presencia de gran número de bacterias nitrificantes.

La nitrificación puede ser inhibida en las muestras por la adición de alitiourea o una cantidad de 2-cloro-6-clorometilpiridina fijada con cloruro de sodio. De esta manera, sólo se mide la demanda de oxígeno carbonácea. ^(7,17)

Los resultados obtenidos pueden ser influenciados por la presencia de sustancias tóxicas para los microorganismos, como lo son bactericidas, metales tóxicos o cloro libre, que pueden inhibir la oxidación. La presencia de algas o microorganismos nitrificantes pueden producir resultados erróneos. ⁽¹⁷⁾

Si realizamos una prueba de DBO utilizando sólo hidratos de carbono, se verifican las siguientes reacciones:

Oxidación de hidratos de carbono:

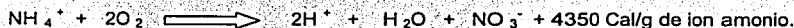


Quando están presentes nitrógeno, fósforo y azufre en el material orgánico, se realizan las siguientes reacciones. ⁽⁷⁾



El empleo del oxígeno en la oxidación biológica está íntimamente relacionado con el mantenimiento y crecimiento de los organismos.

Cuando el elemento nutritivo orgánico comienza a agotarse, el microorganismo obtiene energía suplementaria mediante la oxigenación de sales de amonio.



A este proceso se le denomina nitrificación.

En general, una elevada DBO refleja altas concentraciones de sustancias que pueden ser biológicamente degradadas, por lo tanto el consumo de oxígeno se eleva, dando como resultado bajas cantidades del mismo, en el agua.

3.15 REQUISITOS DE LA PRUEBA.

Las soluciones sometidas al ensayo, deben satisfacer la siguiente condición. ^(20,17)

$$\frac{C_1}{3} \leq (C_1 - C_2) \leq 2 \frac{C_1}{3}$$

Donde:

- C_1 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de cada una de las soluciones de ensayo en el tiempo cero.
- C_2 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de estas mismas soluciones después de 5 días.

3. 16 CALCULOS

La demanda bioquímica de oxígeno después de 5 días (DBO₅), expresada en miligramos de oxígeno por litro, se calcula por la fórmula.

$$DBO_5 = \left((C_1 - C_2) - \left(\frac{V_l - V_e}{V_l} \right) (C_3 - C_4) \right) \frac{V_l}{V_e}$$

Donde:

- C₁: Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de cada una de las soluciones de ensayo en el tiempo cero.
- C₂: Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de estas mismas soluciones después de 5 días.
- C₃: Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de la solución blanco a tiempo cero.
- C₄: Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de la solución blanco después de 5 días.
- V_e: Volumen de la muestra, en mililitros, utilizada para la preparación de la solución de ensayo.
- V_l: Volumen total, en mililitros, de la solución de ensayo.

3.17 OXIMETRO.

El modelo YSI DBO es utilizado para medir el oxígeno disuelto presente en todo tipo de botellas de incubación, comúnmente utilizadas para determinar la demanda bioquímica de oxígeno.

OPERACIONES PRINCIPALES.

El modelo 5905 DBO es un sensor voltamétrico de oxígeno disuelto. Una membrana permeable al oxígeno cubre una celda electrolítica, que consta de un cátodo y un ánodo. Esta membrana actúa como una barrera de difusión y una barrera de aislamiento que impide que la superficie del cátodo entre en contacto con cualquier partícula extraña del medio ambiente.

El cátodo es un electrodo de oro y el ánodo es un electrodo de plata, lo cual completa la celda electrolítica y actúa como un electrodo de referencia.

Al colocar la membrana a través de la celda, el oxígeno es reducido a un potencial aplicado de -0.8 V referidos al electrodo de plata. La reducción de corriente al cátodo es directamente proporcional a la presión parcial del oxígeno en el líquido. (Expresada como % de saturación de aire), la cual es proporcional también a la concentración de oxígeno disuelto (mg / L) a una temperatura determinada. ⁽²¹⁾

De esta manera, la misma presión parcial de oxígeno (% de saturación de aire) en líquidos, dará diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (mg / L) a diferentes temperaturas, debido a las diferentes solubilidades de oxígeno a las distintas temperaturas. El sulfuro de hidrógeno, los halógenos, el monóxido de carbono, el cloro, el óxido nítrico, pueden causar lecturas erróneas. Los ácidos concentrados, los cáusticos y los solventes fuertes, pueden dañar el equipo.

3.18 VALIDACION.⁽²²⁾

La validación de sistemas, se puede definir como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que un sistema satisface los requisitos para los que fue creado y que se obtienen resultados de manera reproducible, cumpliendo así con lineamientos regulatorios, ayudando a asegurar y mejorar la calidad del sistema. La validación nos permitirá conocer mejor el sistema estudiado, ya que éste se encuentra bajo control, siempre y cuando los parámetros no sufran un cambio significativo.

Estos sistemas pueden ser:

- equipos.
- productos y/o materiales.
- métodos de análisis.
- procedimientos.
- procesos.
- sistemas computacionales.
- otros

Para realizar la validación del sistema, se deben considerar los siguientes parámetros: ⁽²²⁾

- Linealidad.
- Precisión (evaluada como repetibilidad).

A continuación se definen cada uno de los parámetros.

LINEALIDAD: La linealidad de un sistema, es la capacidad que permite asegurar que los resultados analíticos, que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta medida), utilizando cuando menos cinco concentraciones diferentes, preparadas a partir de una misma solución patrón y realizando el análisis por duplicado para cada concentración.

La curva de calibración se determina, usualmente en concentraciones que varían entre 60 y 140 % del valor esperado en la muestra o bien dependerá del propósito del método, debiendo incluirse siempre el 100 %.

La curva resultante se debe presentar con los datos obtenidos (concentración vs. respuesta del sistema) y los valores del coeficiente de correlación y el de determinación. Cuanto más cercano a la unidad se encuentren estos valores, más lineal será el sistema. También se busca que el intercepto al origen tienda a cero.

PRECISION: Es el grado de concordancia entre los resultados individuales. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión se evalúa como repetibilidad o reproducibilidad.

REPETIBILIDAD: Evalúa la precisión y manifiesta la concordancia entre los valores de los resultados que se obtienen de las determinaciones independientes, realizadas bajo las mismas condiciones (analista, instrumento, tiempo, laboratorio, técnicas, etc).

En este trabajo, para la validación del sistema de medición de oxígeno disuelto presente en muestras de agua, los parámetros se evaluaron de la siguiente manera:

LINEALIDAD DEL SISTEMA. Debe demostrarse que la relación entre las diferentes concentraciones de soluciones con materia orgánica (solución estándar) y la respuesta del detector siguen una relación matemática definida. Se busca que la función sea lineal.

Se determina construyendo una gráfica (concentración de materia orgánica vs. respuesta medida), utilizando cinco concentraciones diferentes de materia orgánica, preparadas a partir de una misma solución patrón y realizando por duplicado cada dilución.

CRITERIO DE ACEPTACION:

$$r \geq 0.98$$

$$r^2 \geq 0.98.$$

Donde:

r = coeficiente de correlación.

r^2 = coeficiente de determinación. (Anexo III)

PRECISION DEL SISTEMA (EVALUADA COMO REPETIBILIDAD): Deberá demostrarse que los resultados obtenidos, guardan concordancia cuando el procedimiento se aplica repetidamente en las mismas condiciones.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución de materia orgánica correspondiente al 100 %.

CRITERIO DE ACEPTACION:

$$\text{C.V.} \leq 3.0 \%$$

Donde:

C.V. = coeficiente de variación(Anexo III)

4. PARTE EXPERIMENTAL.

El método que se utilizó fue el de la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno después de cinco días de incubación (DBO5), basándose en la norma ISO5815-1989 (E). (Anexo I).

Este método es convencionalmente utilizado para la determinación de una demanda bioquímica de oxígeno mayor o igual a 3 mg de oxígeno por litro y que no exceda 6000 mg de oxígeno por litro.

Los resultados obtenidos son el producto de una combinación de acciones químicas y bioquímicas.

4.1 PRINCIPIO.

Se llevan a cabo diferentes diluciones para obtener distintas cantidades de materia orgánica adicionada y utilizando como disolvente un agua rica en oxígeno disuelto, además de contener una población microbiana definida, que llevará a cabo la oxidación de la materia orgánica presente en el agua.

Se incuban las muestras durante 5 días, en la oscuridad y a una temperatura controlada de 20 ° C, utilizando botellas que deberán llenarse y taparse con sello hidráulico, para evitar cualquier flujo de gases o intercambio con sustancias extrañas. Se determina la concentración del oxígeno disuelto en mg / L, con el oxímetro, antes y después de de los cinco días de incubación. Simultáneamente se realiza un ensayo blanco.

Se calcula la demanda bioquímica de oxígeno.

4.2 REACTIVOS.

Los reactivos utilizados deben ser de calidad reactivo analítico y deben disolverse en agua destilada.

A) SOLUCIONES SALINAS.

Las soluciones son estables y deben conservarse en frascos de vidrio color ámbar y almacenarse en refrigeración. Si se observa alguna precipitación o señal de crecimiento biológico deberán ser desechadas y reemplazadas. La necesidad de adicionar estas soluciones salinas es proveer los nutrientes necesarios a la población microbiana para su óptimo crecimiento.

A.1) Solución amortiguadora de fosfatos.

Disolver 8.5 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 21.75 g de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), 33.4 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 1.7 g de cloruro de amonio (NH_4Cl), en aproximadamente 500 mL de agua destilada. Diluir a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar. El pH de esta solución debe ser de 7.2 sin ajuste posterior.

A.2) Sulfato de magnesio heptahidratado, solución conteniendo 22.5 g / L .

Disolver 22.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada. Diluir a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar.

A.3) Cloruro de Calcio, solución conteniendo 27.5 g / L.

Disolver 27.5 g de cloruro de calcio anhidro (CaCl_2), en agua destilada. Diluir a 1000 mL con la misma agua y homogeneizar.

A.4) Cloruro férrico hexahidratado, solución conteniendo 0.25 g / L.

Disolver 0.25 g de cloruro de férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada. Diluir a 1000 mL con la misma agua y homogeneizar.

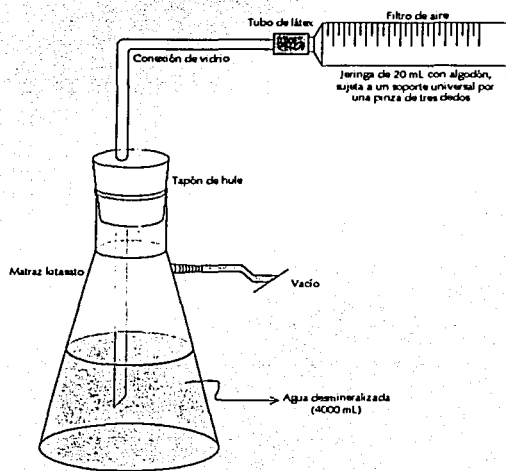
B) AGUA DE DILUCION.

Con este término se denomina al agua destilada que es rica en oxígeno disuelto y sales minerales, que darán las condiciones propicias para el desarrollo microbiano. Esta agua será utilizada como diluyente.

Preparación:

- Filtrar un litro de agua destilada, utilizando para ello membranas con un poro de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro, colocadas en un sistema de filtración Millipore.
- Después de filtrada el agua se airea durante 2 horas, como se indica en el esquema de aireación.

Esquema del equipo de aireación



Debe cuidarse de mantener constante la presión negativa. El filtro de algodón tiene como objetivo filtrar el aire para evitar la entrada de cualquier contaminante, o partícula extraña al agua en aireación.

- Después de dos horas, se toma una muestra de agua, utilizando para ello un vaso de precipitados de 150 mL y se mide la cantidad de oxígeno disuelto en mg / L, utilizando el oxímetro. Debe obtenerse una lectura no menor a 7 mg / L.
- Agregar 1 mL de cada una de las cuatro soluciones salinas. (4.2)
- Airear nuevamente el agua durante 15 minutos más.

C) AGUA DE DILUCION SEMBRADA.

Se denomina agua de dilución sembrada, al inóculo preparado a partir de una población microbiana definida y agua de dilución.

Preparación:

- Utilizar el inóculo comercial POLYSEED, que se presenta en cápsulas con un peso de 250 mg, las cuales contienen un liofilizado de mezcla de microorganismos aerobios, que garantiza la exactitud y confiabilidad del ensayo de DBO5.
- Transferir 25 mg del contenido de la cápsula a un matraz aforado de 200 mL.
- Diluir con 125 mL de agua de dilución.
- Agitar durante 30 minutos, con agitador mecánico.

4.3. PREPARACION DE SOLUCIONES.

SOLUCION ESTANDAR COMERCIAL (SSC)

Esta solución se obtiene de un producto comercial llamado estándar para determinar DBO y que se presenta en ampollas de 5 mL, conteniendo glucosa y ácido glutámico en las siguientes concentraciones :

Glucosa	_____	3000 mg / L
Acido glutámico	_____	3000 mg / L

Preparación:

- Transferir 5 mL de la solución estándar, a un matraz volumétrico con tapón esmerilado de 100 mL.
- Llevar al aforo con agua destilada y homogeneizar la solución.

4.4 MATERIAL, EQUIPO E INSTRUMENTOS.

El material de vidrio utilizado debe estar rigurosamente limpio y seco.

MATERIAL.

- Equipo de filtración Millipore.
- Membranas para filtración de 0.20 μm de diámetro de poro.
- Matraz Kitasato de 4000 mL, con tapón de hule.

- Jeringa de 20 mL sin aguja.
- Matraces volumétricos de 100, 250 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1 y 5 mL
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Inóculo comercial deshidratado (POLYSEED).
- Solución estándar comercial para determinar DBO (SSC) ó en su defecto, solución estándar preparada según la norma ISO-5815-1989 (E)
- Botellas de incubación con capacidad de 300 mL, con tapón esmerilado.
- Bureta de 25 mL.

EQUIPO E INSTRUMENTOS.

- Balanza analítica.
- Oxímetro (YSI Metter-Dissolved Oxygen).
- Estufa de incubación mantenida a 20 ° C.

4.5. COMPARACION ENTRE LA CONCENTRACION DE LA SOLUCION ESTANDAR COMERCIAL UTILIZADA PARA LA VALIDACION Y LA RECOMENDADA POR LA NORMA ISO-5815-1989(E)

Para la validación del sistema, se utiliza la solución estándar comercial mencionada con anterioridad (4.3); en tanto que la solución estándar utilizada por la norma ISO-5815-1989(E) se prepara a partir de una solución que contiene glucosa y ácido glutámico. A continuación se justifica el uso de la solución estándar comercial al demostrar que se llega a la misma concentración que la establecida por la norma ISO-5815-1989(E).

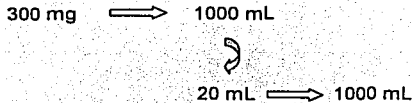
A la glucosa y al ácido glutámico, contenidos en la solución estándar les llamaremos materia orgánica susceptible a la oxidación.

4.5.1. PREPARACION DE LA SOLUCION ESTANDAR SIGUIENDO LA NORMA ISO-5815-1989(E).

Se requiere pesar 150 mg de cada sustancia (glucosa y ácido glutámico), transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver con agua de dilución y llevar al aforo con esta misma agua. Transferir 20 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 1000 mL y llevar al volumen con agua de dilución.

Cálculos de la concentración obtenida:

150 mg de glucosa + 150 mg de ácido glutámico = 300 mg de materia orgánica.



Concentración final: 0.006 mg de materia orgánica susceptible a la oxidación / mL.

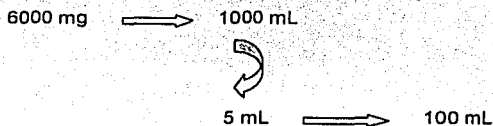
A esta concentración de 0.006 mg / L, se le considera el 100 % de materia orgánica susceptible a la oxidación.

4.5.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LA SOLUCION ESTANDAR COMERCIAL UTILIZADA PARA LA VALIDACION DEL SISTEMA.

Para la validación del sistema se utilizó, como ya se mencionó anteriormente, una solución estándar comercial (4.3); por lo tanto para obtener la concentración de 0.006 mg / L, que representa la concentración al 100 % de la norma ISO-5815-1989 (E), se siguieron los siguientes pasos.

1) Se tiene una concentración inicial (solución A):

3000 mg / L de glucosa + 3000 mg / L de ácido glutámico = 6000 mg / L de materia orgánica.
De esta solución tomar 5 mL y diluir a 100 mL con agua de dilución; por lo tanto se tiene una concentración final de 0.300 mg / mL



Concentración final (Solución A): 0.300 mg / mL.

Para llegar a la concentración de 0.006 mg / mL que corresponde al 100 %, se requirió una alícuota de 6 mL de la solución A y llevar al aforo a 300 mL con agua de dilución, en una botella de incubación; de esta forma se tiene:

$$0.300 \text{ mg / mL} \times (6 \text{ mL} / 300 \text{ mL}) = 0.006 \text{ mg / mL}$$

Obteniendo así la concentración de 0.006 mg / mL, que se considera el 100 % de materia orgánica susceptible a la oxidación (4.5.1)

En la tabla No.1 se muestran las alícuotas a tomar para obtener las concentraciones al 50, 80, 90, 100, 110 % que se utilizarán para la validación del sistema.

TABLA No.1

Concentración de materia orgánica (%)	Alícuota de la solución estándar (mL)	Volumen final (mL)
50	3.0	300
80	4.8	300
90	5.4	300
100	6.0	300
110	6.6	300

La tabla No.2 muestra la cantidad de materia orgánica adicionada, expresada en miligramos por mililitro de solución estándar adicionada, dependiendo de las concentraciones utilizadas de esta (%). El cálculo se determina a partir de la preparación de la solución A.

$$(6000 \text{ mg} / 1000 \text{ mL}) \times (5 \text{ mL} / 100 \text{ mL}) = 0.300 \text{ mg} / \text{mL}$$

$$0.300 \text{ mg} / \text{mL} \times Y = \text{mg de materia orgánica adicionada}$$

Donde:

Y = volumen adicionado en mililitros dependiendo de la concentración de solución estándar.

TABLA No. 2

Concentración de materia orgánica (%)	Cantidad de materia orgánica adicionada en 300mL de agua aireada (mg)
50	0.90
80	1.44
90	1.62
100	1.80
110	1.98

4.6 PROCEDIMIENTO :

4.6.1.LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se utilizan cinco diferentes concentraciones de solución estándar (materia orgánica): 50, 80, 90, 100, 110 %; cada una de estas concentraciones se analiza por duplicado.

- a) Tomar la alícuota correspondiente con bureta a las concentraciones: 50, 80, 90, 100 y 110 %, de la solución estándar (tabla No.1).
- b) Transferir cada alícuota a las botellas de incubación correspondientes; trabajando cada concentración por duplicado.
- c) Agregar 1mL de agua de dilución sembrada, con pipeta volumétrica, a todas las botellas de incubación correspondientes a cada una de las concentraciones de solución estándar, y a dos botellas más que se designarán ensayo blanco (las cuales no contienen solución estándar).
- d) Adicionar agua de dilución a cada una de las botellas de incubación hasta obtener un volumen de 160 mL aproximadamente.
- e) Medir con el oxímetro, la concentración de oxígeno disuelto en mg/L. Para ello sumergir completamente el electrodo en la solución y permitir que se establezca la lectura, a ésta se le denomina concentración de oxígeno disuelto expresada en mg/L, de las soluciones de ensayo, en el tiempo cero.
- f) Completar el volumen de cada botella de incubación a 300 mL con agua de dilución, lo cual se logra permitiendo que se desborden un poco.
- g) Eliminar las burbujas que pudieran quedar adheridas a las paredes de las botellas de incubación dándole ligeros golpes a éstas, taparlas asegurando un sello hidráulico y colocar papel parafilm sobre el tapón de cada botella. (para evitar cualquier intercambio del oxígeno de las muestras con el medio ambiente)
- h) Incubar las botellas durante 5 días a 20 ± 2 ° C.
- i) Después de este período, determinar la cantidad de oxígeno disuelto en mg/L , de cada una de las soluciones ensayadas y del blanco, con el oxímetro.

- j) Calcular la cantidad de oxígeno consumido y comprobar si cumple con la condición para poder determinar si se pueden utilizar los datos obtenidos.

Cálculos:

$$\text{Oxígeno consumido mg / L} = O_2(t_i) - O_2(t_f).$$

Donde:

- $O_2(t_i)$ = oxígeno presente en el tiempo cero de cada una de la soluciones de ensayo.
- $O_2(t_f)$ = oxígeno residual después de cinco días de incubación de cada una de las soluciones de ensayo.

Condición:

$$\frac{C_1}{3} \leq (C_1 - C_2) \leq 2 \frac{C_1}{3}$$

Donde:

C_1 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de la solución de ensayo en el tiempo cero.

C_2 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de esta misma solución después de 5 días.

Con los resultados obtenidos se trazará una gráfica de concentración de materia orgánica adicionada (mg) vs. cantidad de oxígeno consumido después de cinco días de incubación (mg / L). Esta gráfica demostrará si cumple o no una relación lineal entre la concentración de la materia orgánica presente y la respuesta de medición de oxígeno consumido.

CRITERIO DE ACEPTACION:

$$r \geq 0.98$$
$$r^2 \geq 0.98.$$

Donde:

r = coeficiente de correlación.

r^2 = coeficiente de determinación. (Anexo III)

4.6.2. PRECISION DEL SISTEMA.(EVALUADA COMO REPETIBILIDAD).

Se determina realizando el análisis por sextuplicado de una misma concentración de solución estándar correspondiente al 100 % de materia orgánica, trabajando bajo las mismas condiciones; (mismo equipo de medición, misma solución estándar, mismo día de análisis, mismo analista).

- a) Tomar la alícuota de la solución estándar correspondiente al 100 % de la materia orgánica, con bureta (tabla No 1).
- b) Transferir esta alícuota a las botellas de incubación correspondiente, realizando este ensayo por sextuplicado.
- c) Agregar 1 mL de agua de dilución sembrada, con pipeta volumétrica, a todas las botellas de incubación, y a dos botellas más que se designarán ensayo blanco (las cuales no contienen solución estándar).
- d) Adicionar agua de dilución a cada una de las botellas de incubación hasta obtener un volumen de 160 mL aproximadamente.
- e) Medir con el oxímetro, la concentración de oxígeno disuelto en mg / L. Para ello sumergir completamente el electrodo en la solución y permitir que se establezca la lectura, a ésta se le denomina concentración de oxígeno disuelto expresada en mg/L, de las soluciones de ensayo, en el tiempo cero.

- f) Completar el volumen de cada botella de incubación a 300 mL con agua de dilución, lo cual se logra permitiendo que se desborden un poco.
- g) Eliminar las burbujas que pudieran quedar adheridas a las paredes de las botellas de incubación dándole ligeros golpes a éstas; taponarlas asegurando un sello hidráulico y colocar papel parafilm sobre el tapón de cada botella. (Para evitar cualquier intercambio de oxígeno de las muestras con el medio ambiente)
- h) Incubar las botellas durante 5 días a $20 \pm 2^\circ \text{C}$.
- i) Después de este período, determinar la cantidad de oxígeno disuelto en mg / L , de cada una de las soluciones ensayadas y del blanco, con el oxímetro.
- j) Calcular la cantidad de oxígeno consumido y comprobar si cumple con la condición para poder determinar si se pueden utilizar los datos obtenidos.

Cálculos:

$$\text{Oxígeno consumido mg / L} = \text{O}_2 (\text{ti}) - \text{O}_2 (\text{tf}) .$$

Donde:

$\text{O}_2 (\text{ti})$ = oxígeno presente en el tiempo cero de cada una de las soluciones de ensayo.

$\text{O}_2 (\text{tf})$ = oxígeno residual después de cinco días de incubación de cada una de las soluciones de ensayo.

Condición:

$$\frac{C_1}{3} \leq (C_1 - C_2) \leq 2 \frac{C_1}{3}$$

Donde:

C_1 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de una de las soluciones de ensayo en el tiempo cero.

C_2 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de esta misma solución después de 5 días.

CRITERIO DE ACEPTACION:

$$C.V. \leq 3.0\%$$

Donde:

C.V. = coeficiente de variación.(Anexo III)

5.RESULTADOS

5.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

En la tabla No.3 se muestran los resultados obtenidos de la concentración de oxígeno disuelto (mg / L) al tiempo cero y después de cinco días de incubación, correspondientes a las diferentes concentraciones de solución patrón adicionada (materia orgánica).

TABLA No.3

Concentración (%)	T (°C)	MUESTRA PATRON (mL)	INOCULO (mL)	Volumen final (mL)	O ₂ (ti) mg/L	O ₂ (tf) mg/L
50	21.6	3.0	1	300	8.59	6.05
50	21.7	3.0	1	300	8.58	5.85
80	21.7	4.8	1	300	8.59	4.88
80	21.7	4.8	1	300	8.59	4.94
90	21.6	5.4	1	300	8.58	4.47
90	21.6	5.4	1	300	8.56	4.37
100	21.7	6.0	1	300	8.58	3.98
100	21.6	6.0	1	300	8.61	3.96
110	21.4	6.6	1	300	8.57	3.65
110	21.7	6.6	1	300	8.57	3.71
BLANCO	21.4	----	1	300	8.59	8.40

Donde:

O₂ (ti) = oxígeno presente en el tiempo cero de cada una de las soluciones de ensayo.

O₂ (tf) = oxígeno residual después de cinco días de incubación de cada una de las soluciones de ensayo.

En la tabla No.4 se muestran los resultados interpretados basándose en el oxígeno consumido.

$$\text{Oxígeno consumido mg / L} = O_2 (ti) - O_2 (tf).$$

Donde:

- O₂ (ti) = oxígeno presente en el tiempo cero de cada una de las soluciones de ensayo.
- O₂ (tf) = oxígeno residual después de cinco días de incubación de cada una de las soluciones de ensayo.

TABLA No.4

CONCENTRACIÓN (%)	CONDICION	OXIGENO CONSUMIDO (mg / L)
50	$2.86 \leq 2.54 \leq 5.73$	2.54
50	$2.86 \leq 2.73 \leq 3.90$	2.73
80	$2.86 \leq 3.71 \leq 5.73$	3.71
80	$2.86 \leq 3.65 \leq 5.73$	3.65
90	$2.86 \leq 4.11 \leq 5.72$	4.11
90	$2.85 \leq 4.19 \leq 5.70$	4.19
100	$2.86 \leq 4.60 \leq 5.72$	4.60
100	$2.86 \leq 4.65 \leq 5.74$	4.65
110	$2.86 \leq 4.92 \leq 5.71$	4.92
110	$2.88 \leq 4.86 \leq 5.71$	4.86

Donde condición: $C_1 / 3 \leq (C_1 - C_2) \leq 2 C_1 / 3$

Donde:

C_1 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de la solución de ensayo en el tiempo cero.

C_2 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de esta misma solución después de 5 días.

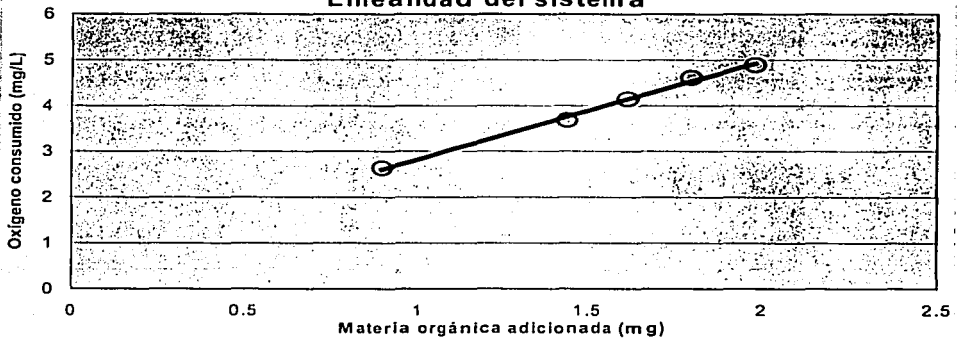
En la tabla No.5 se muestran los resultados promedio del oxígeno consumido y se gráfica contra la cantidad adicionada de materia orgánica.

TABLA No.5

CONCENTRACION (%)	CANTIDAD ADICIONADA DE MATERIA ORGANICA (mg)	RESPUESTA DEL OXIGENO CONSUMIDO (mg / L)
50	0.90	2.63
80	1.44	3.68
90	1.62	4.15
100	1.80	4.62
110	1.98	4.89

GRAFICA No.1

Linealidad del sistema



Los datos obtenidos del coeficiente de correlación y coeficiente de determinación son los siguientes:

$$r = 0.9952$$

$$r^2 = 0.9906$$

Donde:

r = coeficiente de correlación.

r^2 = coeficiente de determinación. (Anexo III).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el sistema de medición es lineal, ya que el coeficiente de determinación y el coeficiente de correlación, cumplen los criterios establecidos para métodos microbiológicos. Criterio de aceptación:

$$r \geq 0.98$$

$$r^2 \geq 0.98.$$

En la gráfica No.1 se puede observar la tendencia lineal.

5.2. PRECISION DEL SISTEMA (EVALUADA COMO REPETIBILIDAD).

En la tabla No.6, se presentan los resultados obtenidos del oxígeno disuelto (mg/L) de una misma muestra, analizada por sextuplicado y correspondiente a una concentración del 100% de materia orgánica, después de los cinco días de incubación.

TABLA No.6

Concentración (%)	Temperatura °C	MUESTRA PATRON (mL)	INOCULO (mL)	VOLUMEN FINAL (mL)	O ₂ (ti) (mg/L)	O ₂ (tf) (mg/L)
100	21.6	6.0	1.0	300	8.50	4.29
100	21.4	6.0	1.0	300	8.50	4.20
100	21.5	6.0	1.0	300	8.50	4.28
100	21.6	6.0	1.0	300	8.50	4.32
100	21.4	6.0	1.0	300	8.50	4.30
100	21.4	6.0	1.0	300	8.50	4.24
Blanco	21.3	----	1.0	300	8.60	8.26

Donde:

O₂ (ti) = oxígeno presente en el tiempo cero de cada una de las soluciones de ensayo.

O₂ (tf) = oxígeno residual después de cinco días de incubación de cada una de las soluciones de ensayo.

En la tabla No.7, se muestran los resultados del cumplimiento de la condición, en cada uno de los 6 ensayos, tomando en cuenta la cantidad de oxígeno consumido durante los cinco días de incubación. Se comprueba que se cumple la condición establecida.

TABLA No.7

CONCENTRACION (%)	CONDICION	O ₂ CONSUMIDO (mg/L)
100	$2.83 \leq 4.21 \leq 5.66$	4.21
100	$2.83 \leq 4.30 \leq 5.66$	4.30
100	$2.83 \leq 4.22 \leq 5.66$	4.22
100	$2.83 \leq 4.18 \leq 5.66$	4.18
100	$2.83 \leq 4.20 \leq 5.66$	4.20
100	$2.83 \leq 4.26 \leq 5.66$	4.26
BLANCO	-----	0.34

Donde condición: $C_1 / 3 \leq (C_1 - C_2) \leq 2 C_1 / 3$

Obteniéndose:

$$C.V. = 1.04 \%$$

Donde:

C.V. = coeficiente de variación.

De esta manera se cumple con el criterio de aceptación en relación con la precisión del sistema, para métodos microbiológicos, que establece que el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3.0%

$$\text{C.V.} \leq 3.0 \%$$

6. CONCLUSIONES.

1. Las condiciones en las que se desarrolló la prueba no modificaron la respuesta de medición del sistema, ya que se presentó linealidad en un intervalo de concentraciones de 50, 80, 90, 100, 110 %. Esta tendencia lineal puede observarse en la gráfica No. 1.
2. Se comprueba la relación entre la cantidad adicionada de materia orgánica y la cantidad de oxígeno consumido, ya que el coeficiente de correlación obtenido es igual a $0.9952 \geq 0.98$ que es el requerido para métodos microbiológicos.
3. El grado de concordancia entre los resultados obtenidos es aceptable, y se considera que existe precisión en el sistema, pues el coeficiente de variación obtenido es menor del 3.0 % que es el exigido para métodos microbiológicos.
4. En ambas determinaciones tanto la linealidad como la precisión del sistema, la disminución del oxígeno después del tiempo de incubación en el blanco, no excedió de 5 mg / L, que es el indicado por la norma oficial.
5. Se puede asegurar la confiabilidad de la respuesta de medición del método propuesto, además de ser sencillo y rápido.
6. En ambos ensayos, linealidad del sistema y precisión del sistema (repetibilidad), se obtuvo una disminución esperada de menos de 0.5 mg / L de oxígeno consumido, después de cinco días de incubación en el blanco.

Los resultados obtenidos, demostraron que los parámetros de linealidad y precisión del sistema, cumplen con los requisitos de aceptación para la validación del sistema, lo que indica que las condiciones en las que se desarrolló el procedimiento, no afectan la respuesta de medición, dando lugar a resultados confiables para determinar la demanda bioquímica de oxígeno en muestras de agua.

CALIDAD DEL AGUA-- DETERMINACION DE LA DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO DESPUES DE 5 DIAS (DBO5)-- DILUCION Y SIEMBRA.

1. ALCANCE.

Esta norma internacional es un método para la determinación empírica y convencional de la demanda bioquímica de oxígeno de agua por dilución y siembra.

Este método se aplica a todas las aguas que tienen una demanda bioquímica de oxígeno mayor o igual a 3 mg de oxígeno por litro y que no excedan 6000 mg de oxígeno por litro, sin embargo para aquellas que excedan esta concentración de 6000 mg / L, la prueba puede aún aplicarse; sin embargo los errores causados por las diluciones que se necesitan, requieren que los resultados sean interpretados con cautela.

Los resultados obtenidos son el producto de una combinación de acciones químicas y bioquímicas. Estos no tienen el carácter de riguroso o ambiguo, es decir un único y bien definido proceso químico o bioquímico. No obstante proveen una indicación debido a la cual la calidad del agua se puede estimar.

La prueba puede ser influenciada por la presencia de varias sustancias. Dentro de estas se puede mencionar sustancias tóxicas a los microorganismos, por ejemplo bactericidas, metales tóxicos, o cloro libre, que pueden inhibir la acción bioquímica. La presencia de algas u organismos nitrificantes pueden producir resultados elevados de consumo de oxígeno, que no se deben necesariamente a el consumo de materia orgánica presente en el agua.

2. REFERENCIAS.

- ISO 5813: 1983 --Determinación de oxígeno disuelto - método yodométrico.
- ISO 5814:1984 --Determinación de oxígeno disuelto - método electroquímico.
- ISO 6107-2: 1981 --Vocabulario.
- ISO 7393-1: 1985 --Determinación de cloro libre y cloro total.
- ISO 7393-2: 1985 --Determinación de cloro libre y cloro total. método colorimétrico

3. DEFINICION.

Demanda bioquímica de oxígeno.- Es la concentración en masa, de oxígeno disuelto consumido, bajo condiciones específicas, por oxidación biológica de materia orgánica y/o inorgánica en el agua, definición dada desde ISO 6107-2 (1981)

Para los propósitos de esta norma internacional "oxidación biológica" significa "oxidación bioquímica"

4. PRINCIPIO.

Neutralizar la muestra de agua a analizar y diluir con diferentes cantidades de agua de dilución rica en oxígeno disuelto y conteniendo una siembra de microorganismos, con o sin inhibición de la nitrificación, según se requiera.

La incubación debe ser a una temperatura controlada, por un período definido de 5 días, en la oscuridad, en una botella completamente llena y tapada. Determinar la concentración del oxígeno disuelto antes y después de la incubación. Calcular la masa de oxígeno disuelto consumido, por litro de agua.

Simultáneamente, se realiza un ensayo blanco utilizando una solución estándar de glucosa y ácido glutámico.

5. REACTIVOS.

Durante el análisis utilizar sólo reactivos de reconocido grado analítico, usar sólo agua destilada o agua de una pureza equivalente (agua desmineralizada). El agua no debe contener más de 0.01 mg de cobre por litro y debe estar exenta de cloro, cloraminas, alcalinidad cáustica, materias orgánicas y ácidos.

5.1 AGUA DE SIEMBRA.

Si la muestra a ensayar no contiene, por sí misma, suficientes microorganismos adaptados, el agua de siembra, puede ser obtenida por cualquiera de los siguientes procedimientos:

1. Agua residual urbana, recogida de un gran recolector o de un colector correspondiente a una zona residencial sin contaminación industrial considerable. Esta agua debe decantarse antes de su uso.
2. Se puede preparar a partir de 100 g de tierra de jardín en un litro de agua. Mezclar y dejar reposar durante 10 minutos. Tomar 10 mL del sobrenadante y diluir hasta un litro de agua, la cual puede utilizarse como agua de siembra.
3. Agua obtenida de algún río o lago conteniendo aguas residuales de tipo urbano.
4. Efluentes que provengan de una instalación de tratamiento de aguas.
5. Agua recogida más abajo del punto de descarga del agua a analizar o agua conteniendo microorganismos adaptados al agua a ser analizada y cultivada en el laboratorio (en el caso de efluentes industriales que contienen sustancias que se degradan con dificultad).

5.2. SOLUCIONES SALINAS

Las siguientes soluciones son estables al menos un mes y deben ser almacenadas en frascos de vidrio, color ámbar, en la oscuridad. Estas se deberán desechar si se detecta algún signo de precipitación o crecimiento biológico.

5.2.1 Solución amortiguadora de fosfatos.

Disolver 8.5 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 21.75 g de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), 33.4 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 1.7 g de cloruro de amonio (NH_4Cl). En aproximadamente 500 mL de agua destilada. Diluir a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar. El pH de esta solución debe ser de 7.2 sin ajuste posterior.

5.2.2 Sulfato de magnesio heptahidratado, solución conteniendo 22.5 g / L .

Disolver 22.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada. Diluir a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar.

5.2.3 Cloruro de Calcio, solución conteniendo 27.5 g / L .

Disolver 27.5 g de cloruro de calcio anhidro (CaCl_2). Diluir a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar.

5.2.4 Cloruro férrico hexahidratado, solución conteniendo 0.25 g / L.

Disolver 0.25 g de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada. Diluir a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar.

5.3 AGUA DE DILUCION.

A aproximadamente 500 mL de agua destilada, adicionar 1 mL de cada una de las soluciones salinas (5.2.1, 5.2.2, 5.2.3 y 5.2.4). Diluir a 1000 mL con agua destilada y homogeneizar. Mantener esta solución a 20° C; airear durante 1 hora, tomando todas las precauciones para no contaminarla, debido a la adición de materia orgánica, por sustancias oxidantes o reductoras, o bien por metales, hasta que la concentración de oxígeno disuelto sea al menos 8 mg / L.

Utilizar esta solución dentro de las 24 horas posteriores a su preparación y descartar cualquier solución remanente.

5.4 AGUA DE DILUCION SEMBRADA.

Adicionar de acuerdo a la fuente de 5 a 20 mL de agua sembrada (5.1) por litro de agua de dilución (5.3). Almacenar el agua de dilución sembrada obtenida a 20 °C. Prepararla inmediatamente antes de su uso y descartar alguna solución remanente, al finalizar el día de trabajo.

La disminución del oxígeno después de 5 días de incubación a 20 °C del agua de dilución (5.3), el cual es el valor del blanco (8.3), deberá preferiblemente no exceder de 0.5 mg de oxígeno por litro.

5.5 ACIDO CLORHIDRICO. (HCl), solución, aproximadamente 0.5 M.

5.6 HIDROXIDO DE SODIO (NaOH), solución, aproximadamente 20 g / L.

5.7 SULFITO DE SODIO (Na₂SO₃), solución, aproximadamente 0.5 M.

5.8 SOLUCION ESTANDAR DE GLUCOSA-ACIDO GLUTAMICO.

Secar la glucosa deshidratada (C₆H₁₂O₆) y el ácido glutámico (HOOC-CH₂-CH₂-CHNH₂-COOH) a 103 °C durante 1 hora. Pesar 150 ± 1 mg de cada sustancia, disolver en agua destilada, diluir a 1000 mL con la misma agua y mezclar.

Preparar la solución inmediatamente antes de usarla y descartar cualquier remanente al finalizar el día de trabajo.

5.9 ALILTIOUREA (ATU) (C₄H₈N₂S), SOLUCION.

Disolver 1.00 g de aliltiourea en agua destilada, diluir a 1000 mL con la misma agua y homogeneizar. La solución es estable por al menos dos semanas.

TABLA No. 1 ⁽¹⁴⁾
Diluciones recomendadas para determinar la DBO₅.

PROBABLE DBO ₅ mg/L	Factor de dilución	Resultado redondeado a	Generalmente aplicable a:
3 a 6	entre 1 y 2	0.5	R
4 a 12	2	0.5	R, E
10 a 30	5	0.5	R, E
20 a 60	10	1	E
40 a 120	20	2	S
100 a 300	50	5	S, C
200 a 600	100	10	S, C
400 a 1200	200	20	I, C
1000 a 3000	500	50	I
2000 a 6000	1000	100	I

Donde:

R = Agua de río.

E = Agua de alcantarillado.

S = Agua de alcantarillado clarificada o agua de efluentes industriales débilmente contaminada.

C = Agua de alcantarillado bruta.

I = Agua de efluente industrial muy contaminada.

6. MATERIAL Y EQUIPO.

El material de vidrio utilizado debe estar rigurosamente limpio, exento de materias tóxicas o biodegradables y debe conservarse protegido de contaminaciones.

- 6.1 Frascos para incubación. De capacidad entre 130 mL y 350 mL, con tapón esmerilado, que evite que queden burbujas adheridas.
- 6.2 Incubador. Con capacidad de mantener la temperatura a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.3 Equipo para determinar la concentración de oxígeno disuelto.
- 6.4 Cámara de refrigeración ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), para el transporte y almacenamiento de la muestra.
- 6.5 Contenedores de dilución. Matraces volumétricos, de capacidad adecuada dependiendo del volumen de la muestra diluida utilizada.

7. ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA.

Almacenar la muestra a una temperatura entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un frasco lleno y herméticamente sellado. Comenzar la determinación tan pronto como sea posible y como máximo en las 24 horas siguientes a su muestreo.

8. PROCEDIMIENTO.

8.1 OPERACIONES PRELIMINARES.

8.1.1 Neutralización de la muestra

Si el pH de la muestra no se encuentra entre 6 y 8, neutralizarla. Se neutraliza después de haber determinado, en una muestra separada, el volumen de solución de ácido clorhídrico (5.5) o de solución de hidróxido de sodio (5.6) necesario; no debe preocupar la posible formación de precipitado.

8.1.2 Presencia de cloro libre o combinado.

Neutralizar el cloro libre y combinado en la muestra por adición del volumen necesario de solución de sulfito de sodio (5.7). Se debe tener cuidado de no añadir solución en exceso.

8.2 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE ENSAYO.

8.2.1 Determinación de la DBO sin supresión de nitrificación.

Llevar la muestra a una temperatura de 20 °C y agitar en un recipiente llenado a la mitad de su volumen, evitando la posible saturación de oxígeno.

Colocar un volumen conocido de la muestra en la dilución basal (6.5) y adicionar agua de dilución sembrada (5.4). Mezclar evitando la formación de burbujas de aire. Si el factor de dilución a aplicar es mayor a 100, llevar las diluciones en dos o más etapas.

8.2.2 Determinación de la DBO con supresión de nitrificación.

Llevar la muestra a una temperatura de 20 °C y colocarla en un recipiente medio lleno, con agua de dilución, evitando la posible saturación de oxígeno.

Colocar un volumen conocido de la muestra en la dilución basal (6.5) y adicionar 2 mL de alitiourea (5.9) por litro de muestra diluida, y llenar con agua de dilución sembrada (5.4). Mezclar, evitando la formación de burbujas.

NOTAS:

- Alternativamente se puede utilizar como supresor de la nitrificación 2-cloro -6-(tricloro metil) piridina TCMP. Adicionar 0,5 mg / L en muestras diluidas.
- El grado de dilución, deberá ser tal que después de la incubación la concentración residual de oxígeno deberá estar entre una tercera y dos terceras partes de la concentración inicial. Ante la dificultad de seleccionar con exactitud el grado de dilución convenientemente, es necesario realizar varias diluciones en progresión geométrica y que enmarquen la dilución correspondiente a la DBO5 probable. (tabla No.1)
- Las determinaciones previas de la demanda de oxígeno total (DOT) y la demanda química de oxígeno (DQO) con dicromato, pueden dar información útil al respecto.
- Cuidar que las muestras tomadas sean representativas.
- La supresión de la nitrificación de acuerdo a 8.2.2 no es recomendable en todos los casos.

8.3 ENSAYO EN BLANCO.

Se realiza un ensayo en blanco al mismo tiempo, utilizando el agua de dilución sembrada.

8.4 DETERMINACION.

Utilizando cada dilución (8.2), se llenan dos frascos de incubación (6.1), permitiendo que se desborden un poco. Se deja que se escapen las burbujas de aire adheridas a las paredes de los frascos. Se cierran los frascos evitando que queden atrapadas burbujas de aire.

Se disponen los frascos en dos series, cada una conteniendo un frasco de cada dilución y un frasco de solución en blanco. (8.3).

Coloque una de las series en incubación (6.2) y manténgase en la oscuridad durante 5 días a 20 °C.

Se mide la concentración de oxígeno disuelto al tiempo cero en cada una de las diluciones y en la solución blanco de la otra serie de frascos que se incubaron, especificados en ISO 5813 o ISO 5814.

8.5 ENSAYO CONTROL.

Utilícese este procedimiento como una comprobación aproximada de la calidad del agua de dilución, del agua de siembra y de la técnica del analista, empleados.

Diluir 20 mL de la solución estándar de glucosa-ácido glutámico (ver 5.8) a 1000 mL de agua de dilución (Ver 5.4) y proceder como se indica en el apartado 8.4.

La DBO5 obtenida de este ensayo deberá estar comprendida entre 180 y 230 mg / L. En caso de no obtener resultados dentro de este intervalo, se debe verificar la preparación del agua de siembra y si es necesario el método de análisis.

Se realiza un ensayo control simultáneamente con el ensayo de la muestra.

9 CALCULO DE RESULTADOS.

Las soluciones sometidas al ensayo, deben satisfacer la siguiente condición:

$$\frac{C_1}{3} \leq (C_1 - C_2) \leq 2 \frac{C_1}{3}$$

Donde:

- C_1 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de una de las soluciones de ensayo en el tiempo cero.
- C_2 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de esta misma solución, después de 5 días.

La demanda bioquímica de oxígeno después de 5 días (DBO_5), expresada en miligramos de oxígeno por litro, se calcula por la fórmula:

$$DBO_5 = \left((C_1 - C_2) - \left(\frac{V_t - V_e}{V_l} \right) (C_3 - C_4) \right) \frac{V_l}{V_e}$$

Donde:

- C_1 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de una de las soluciones de ensayo en el tiempo cero.
- C_2 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de esta misma solución, después de 5 días.
- C_3 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de la solución blanco a tiempo cero.

- C_4 : Concentración de oxígeno disuelto, expresada en miligramos por litro, de la solución blanco después de 5 días.
- V_e : Volumen de la muestra, en mililitros, utilizada para la preparación de la solución de ensayo.
- V_t : Volumen total, en mililitros, de la solución de ensayo.

Si varias diluciones se encuentran en el intervalo requerido, se calcula la media de los resultados obtenidos para estas diluciones.

10.REPORTE.

El reporte del ensayo deberá incluir la siguiente información:

- La referencia de la presente norma.
- La fecha y hora de muestreo.
- Método de conservación de la muestra.
- Fecha y hora a la cual se realizó la determinación de la DBO.
- El tipo de agua de siembra utilizada.
- Indicación de la supresión o no de la nitrificación.
- El número de días de incubación.
- Los resultados y el método de cálculo empleado.
- Cualquier detalle especial que pudo ser observado durante el ensayo.
- Consignación de todas las operaciones no previstas en esta norma y que se consideren de interés.

APENDICE II

OXIMETRO:

ESPECIFICACIONES:

Cátodo : oro.

Anodo : plata.

Membrana : FEP Teflon.

Electrolito : 2M KCl.

Intervalo de oxígeno disuelto : 0.1 mg / L.

Intervalo de temperatura : 15 a 35 °C.

Exactitud de temperatura : +/- 0.2 °C.

Polarización de voltaje : 0.8 volts.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración de la dilución de la solución patrón (x)	Propiedad medida (y)
X ₁	Y ₁₁ , Y ₁₂ ... Y _{1n}
X ₂	Y ₂₁ , Y ₂₂ ... Y _{2n}
X ₃	Y ₃₁ , Y ₃₂ ... Y _{3n}
.	.
.	.
.	.
X _n	Y ₁₁ , Y ₁₂ , Y ₁₃ ... Y _{1n}

Donde:

t = número de diluciones

n = número de replicas de cada dilución de la solución patrón.

Y = cantidad de oxígeno disuelto

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicas por dilución, sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$\sum x = n(X_1 + X_2 + \dots + X_n)$$

$$\sum Y = (Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + \dots + Y_{t1} + \dots + Y_{t2} + \dots + Y_{tn})$$

$$\sum X^2 = n(X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_i^2)$$

$$\sum Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 + \dots + Y_{i1}^2 + Y_{i2}^2 + \dots + Y_{in}^2$$

$$\sum XY = (Y_{11} + Y_{12} + Y_{1n}) + X_2(Y_{21} + Y_{22} + Y_{2n}) + \dots + X_i(Y_{i1} + Y_{i2} + \dots + Y_{in})$$

3) Cálculos para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación

$$r = \left[\frac{[nt(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)]^2}{[nt(\sum X^2) - (\sum X)^2][nt(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r^2 = \left[\frac{[nt(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)]^2}{[nt(\sum X^2) - (\sum X)^2][nt(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]} \right]$$

Donde :

r = Coeficiente de correlación.

r² = Coeficiente de determinación

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

PRESICION DEL SISTEDA

1) Tabular los resultados

$$Y_1, Y_2, Y_3 \dots Y_n$$

2) Cálculos Preliminares

$$\sum y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots Y_n^2$$

$$\bar{Y} = \sum \frac{Y_i}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

Donde:

DE = Desviación Estándar

3) Cálculos finales

$$CV = \frac{DE}{Y} * 100$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación

8. BIBLIOGRAFIA.

1. Brown, L.T., LeMay, H. E., Química la ciencia central. 3ª Edición. Edit. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. México (1987). pp. 399-402.
2. Martínez Bremont, Marco A., La demanda bioquímica de oxígeno en aguas contaminadas. Tesis de licenciatura. Facultad de Ingeniería. U.N.A.M. México, (1983).
3. Hernández Muñoz, Aurelio., Abastecimiento y distribución del agua. 1ª. Edición. Edit. Colegio de Ingenieros de canales y puertos. España (1987). pp 78-81.
4. American Public Health Association., Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Edit. Ediciones Diaz Santos S.A. España (1992). pp 5-4, 5-20.
5. The Academy of natural sciences. Proceedings of the fourth national conference. Philadelphia. <http://www.acnatsci.org/erd/ea/pollnb2.html>.
6. Rheinheimer, Gerhard., Microbiología de las aguas. 4ª. Edición. Edit. Acribia, S.A. España (1987). pp 124-131.
7. Vázquez González, Alba B., Métodos para definir el valor del coeficiente (k) de la rapidez de la reacción en la curva de la DBO. Tesis de licenciatura. Facultad de Ingeniería. U.N.A.M. México (1988).
8. Catalán Lafuente, José G., Química del agua. 1ª. Edición. Edit. Blume. España (1969).pp 144, 240-245, 279-285.
9. Voet Donald and Voet G.J., Bioquímica. 1ª. Edición. Edit. Ediciones Omega, S.A. España (1990).pp 728-733.

10. Lehninger L. A., Principios de Bioquímica. 1ª. Edición . Edit. Ediciones Omega, S.A. España (1988) pp397-424.
11. Koneman, E., Stephen, A. D., Diagnóstico microbiológico. 1ª. Edición. Edit. Médica Panamericana: Uruguay (1989). pp 200-205
12. Tebbut, T.H.Y. Principles of water quality control. 4ª . Edición. Edit. Pergamon. USA (1992). pp 64-74; 172-173.
13. Villaclara Fatjo, Gloria., Material del curso "Descriptores del contenido de materia orgánica en aguas naturales y de desecho". México (1989)
14. Program National Stuary. Types of pollutants.
<http://riceinfo.rice.edu/armadillo/Galveston/Chap6/type.pollutant.html>.
15. Nex.Gen.BioTec.Ltd. White papaer on biological oxygen demand.
<http://www.nexgenbiotec.com/oxygen.html>.
16. Clark and Viessman., Water supply and pollution control. 1ª. Edición. Edit. Panamericana. España (1989).
17. Norma Española. Calidad del agua. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Método de dilución y siembra. UNE 77-003-89. España (1989).
18. Jiménez Leyva, Fernando., Influencia del lignosulfonato de calcio, en la demanda bioquímica de oxígeno de cinco carbohidratos presentes en el licor sulfítico. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M. México (1972).
19. Winkler, M.A., Tratamiento biológico de aguas de desecho. 1ª. Edición. Edit. Limusa. México (1986).
20. International Standard. Water quality-determination of biochemical oxygen demand after 5 days (BOD5)-Dilution and seeding method. ISO-5815-1989(E).

21. YSI Incorporated. Manual de operación del oxímetro Modelo YSI 5905 BOD-Probe.

22. Comité de elaboración de guías oficiales de validación. Validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de QFB. México. A.C. (1989).