



European Union Science Olympiad

Prueba 1

Tema: Calidad del agua

NUI, Galway
Lunes, 16 de Mayo de 2005

Instrucciones.

Dentro del laboratorio se deben usar siempre gafas de seguridad y la bata de laboratorio.

Está terminantemente prohibido comer, beber y fumar en el laboratorio.

Se dispone de guantes desechables y deben ser usados cuando se manejen muestras microbiológicas y productos químicas.

Todo el papel utilizado, incluyendo el papel de “sucio”, debe ser entregado al final de la tarea.

Todos los resultados deben ser escritos en el cuaderno de respuestas.

Las gráficas deben ser adjuntadas con el cuaderno de respuestas.

Sólo se puntuarán el Cuaderno de Respuestas y las gráficas adjuntas

Cuando se pida que un supervisor firme un resultado antes de seguir con el siguiente paso, se puntuará positivamente sólo cuando la firma del resultado se haga en el momento adecuado.

Las distintas tareas se pueden realizar en cualquier orden (p.e. simultáneamente).

Puntuación de las tareas.

La **Tarea 1** se puntúa sobre 9 puntos

La **Tarea 2** se puntúa sobre 25 puntos

La **Tarea 3** se puntúa sobre 32 puntos

La **Tarea 4** se puntúa sobre 11 puntos

La **Tarea 5** se puntúa sobre 11 puntos

La **Tarea 6** se puntúa sobre 12 puntos

Introducción.

Los residentes de cierto lugar han solicitado una investigación sobre las fuentes y la naturaleza de la contaminación en el río que pasa por su ciudad.

Las urbanizaciones e industrias descargan las aguas residuales tratadas (aguas fecales, aguas de lecherías y residuos químicos) en el río. Este río desemboca en el mar cerca de una zona turística con playa. Algunas de las plantas de tratamiento son antiguas y pueden funcionar mal.

La naturaleza y las consecuencias de estas descargas pueden ser determinantes para el desarrollo local.

Para llevar a cabo esta investigación se han tomado muestras de agua del río y de agua marina de siete lugares diferentes (Se pueden ver en la Figura 1 en los recuadros numerados del 1 al 7). Todas estas muestras han sido analizadas para determinar la naturaleza de las aguas y la contaminación orgánica y química. Los análisis los ha realizado el Laboratorio Estatal y los resultados de cada muestra han sido entregados a la Autoridad Local de Protección Medioambiental.

Las muestras se extrajeron por duplicado y, previamente a los análisis, se envió un subconjunto de ellas a otros laboratorios aprobados para confirmar y verificar los resultados (usando métodos alternativos si es posible). Vuestro equipo representa uno de esos laboratorios de análisis.

Para ello tenéis que analizar tres muestras de agua. Estas muestras han sido llamadas Muestra A (Sample A), Muestra B (Sample B) y Muestra C (Sample C).

El objetivo de estas pruebas es determinar los siguientes puntos:

- 1.- Naturaleza del agua (agua dulce o marina)
- 2.- La naturaleza y, donde sea posible, el nivel de los contaminantes orgánicos.
- 3.- Identificar los contaminantes químicos y la fuente de esta contaminación.
- 4.- Localizar los lugares de extracción de las muestras.

Para poder hacer todo esto se pide que realicéis las siguientes tareas (en el orden que os convenga, repartiéndoselas).

- 1.- Determinar los niveles de **Bacterias** presentes (en CFU por 100 mililitros, CFU=colony forming units, esto es, unidades que forman colonias).
- 2.- Determinar el **Contaminante Químico (R)** presentes en la **Muestra A (Sample A)**.
- 3.- Hallar la **Densidad** de cada una de las muestras.
- 4.- Determinar el tipo de bacteria presente por medio de la **Tinción de Gram**, de la forma de las células y del agrupamiento de las células.
- 5.- Determinar la **Materia Orgánica** presente por el método de BOD (Demanda Biológica de Oxígeno) para el quinto día. (Ver la página 14 para una explicación detallada de la BOD).
- 6.- Localizar los **Sitios donde** se han extraído las muestras A, B y C (Sample A, B y C)

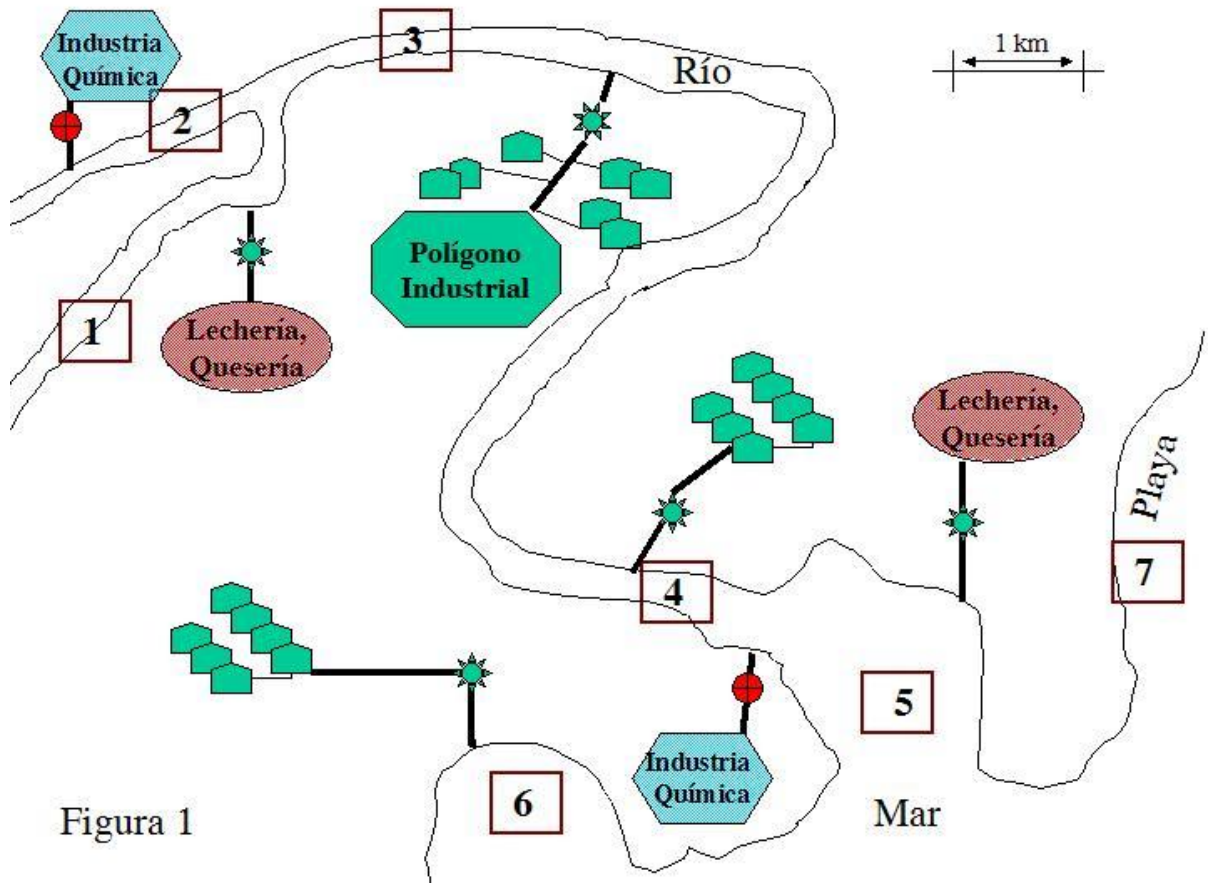
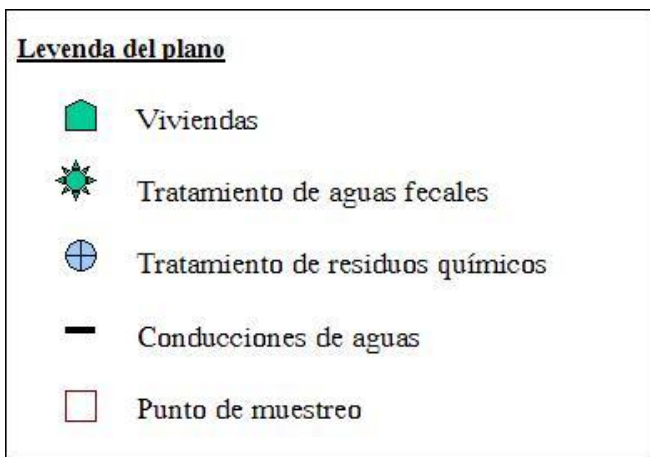


Figura 1



TAREA 1 – DETERMINAR LOS NIVELES BACTERIANOS.

Dispones de tres placas con cultivos, de diluciones de las muestras originales expresadas en potencias de 10 (cada placa corresponde a una de las muestras **A**, **B** o **C**) y hay que determinar la cantidad de bacterias existentes en 100 mL de las muestras originales **A**, **B** y **C**. La dilución de cada placa se indican en potencias de diez.

Determinación de las unidades que forman una colonia* (CFU's) en 100 mL de muestra.

En este caso, se utilizó 0,1 mL de muestra para preparar cada placa. Dividir el número de colonias en una placa por el factor de dilución para obtener el número de CFU's en un 0,1 mL de muestra. Por ejemplo, si cuentas 125 colonias diluidas a 10^{-7} , hay:

$$(125) / (10^{-7}) = 1,25 \times 10^9 \text{ CFU's en } 0,1 \text{ mL de muestra}$$

Después hay que transformar los resultados para expresarlos en CFU's en 100 mL.

Resultados:

Escribir los resultados en la pregunta 1 del Cuadernillo de Respuestas.

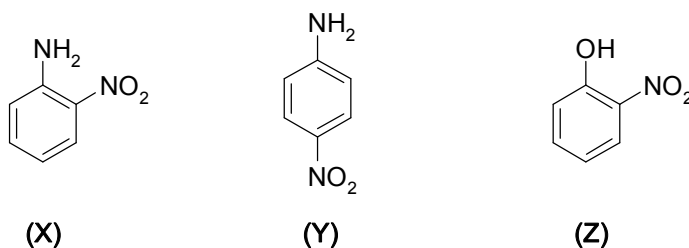
* Una colonia es una población macroscópica visible creciendo en un medio sólido a partir de una única célula.

AQUÍ TERMINA LA TAREA 1.

TAREA 2 - DETERMINAR EL CONTAMINANTE QUÍMICO PRESENTE EN LA MUESTRA A

Problema:

Una de las plantas químicas que se señalan en el mapa (Figura 1) es una factoría de tintes, que utiliza anilinas y fenoles para fabricar tintes azoicos. Desde esa factoría, por accidente, se ha vertido al agua uno de los compuestos siguientes: *orto-nitroanilina* (X), *para-nitroanilina* (Y) y *orto-nitrofenol* (Z). Este contaminante químico se extrajo solamente del agua de la **Muestra A** mediante un disolvente orgánico adecuado. Este compuesto es el contaminante químico (R). Se debe utilizar cromatografía de capa fina (TLC) para identificar el compuesto contaminante (R), a partir de tres muestras de los compuestos puros (X), (Y) y (Z). Se obtendrán los tintes azoicos elaborados por la factoría haciendo reaccionar la sal de diazonio de (R) con fenol y 1-naftol. Debes conocer los colores de estos tintes para identificar futuros vertidos de la factoría.



Ahora responder a la Pregunta 2 en el Cuadernillo de Respuestas.

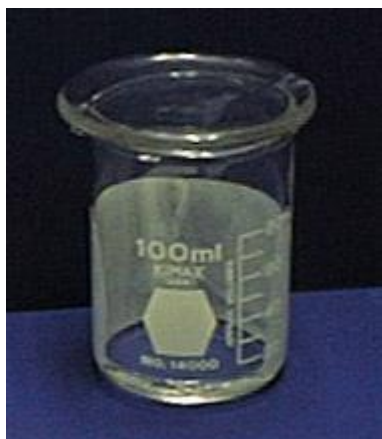
Breve descripción de la Cromatografía de Capa Fina (TLC):

La cromatografía se utiliza para separar compuestos, que están mezclados, según las interacciones de esos compuestos con un fase estacionaria y una fase móvil. En este caso la fase estacionaria es gel de sílice (“silica gel”) adsorbida sobre aluminio, que generalmente se conoce como placa TLC. La fase móvil es una mezcla de disolventes orgánicos. El compuesto más polar de la mezcla interacciona más intensamente con el gel de sílice, y requiere un disolvente más polar para desplazarlo a través de la fase estacionaria. El compuesto menos polar se desplaza a través de la fase estacionaria más rápidamente, y requiere un disolvente menos polar o apolar para desplazarse. Se proporciona acetato de etilo, que es un disolvente polar, y hexano, que es un disolvente apolar.

Procedimiento para llevar a cabo una Cromatografía de Capa Fina (TLC):

1. Con un lápiz marcar cuatro puntos equidistantes sobre la línea base que hay en cada placa (a lápiz), e identificarlos escribiendo (con lápiz) debajo X, Y, Z y R. No dejar señales de los dedos en las placas, ya que los compuestos orgánicos que hay en tus dedos pueden interferir en el análisis. Utiliza las pinzas para manejar las placas TLC.
2. Mediante los tubos capilares de cristal (“TLC Spotters”) colocar una gota de cada compuesto en su correspondiente marca a lápiz X, Y, Z y R. Las muestras no deben tener un diámetro superior a 3 mm para lograr una máxima resolución (poner una pequeña gota tocando con el capilar el punto, esperar a que se seque, volver a poner gotas varias veces hasta que cada muestra se vea con claridad). Debes asegurarte de que las muestras sean claramente visibles (amarillas o naranjas) sobre la fase estacionaria (gel de sílice) de la placa que es blanca.

3. La primera placa se debe colocar en el vaso. Previamente de han colocado en el vaso, 5-6 cm³ de una fase móvil formada por 20% (en volumen) de acetato de etilo y un 80% (en volumen) de hexano. Es esencial que la línea base esté por encima del nivel de disolvente cuando se coloque la placa dentro del vaso (el vaso ha de taparse con un papel de filtro y un vidrio de reloj).



El papel de filtro y el vidrio de reloj se coloca encima del vaso para evitar la evaporación del disolvente y así mantener una atmósfera saturada dentro del vaso.

Figura 2: Ejemplo de cámara cromatográfica

4. Colocar con cuidado la placa dentro del vaso. Mantener el vaso tapado con el papel del filtro y con el vidrio de reloj durante la cromatografía. Debes permitir que la fase móvil (el disolvente) alcance una altura hasta que falte 1 cm para llegar al extremo superior de la placa. Entonces sacar la placa del vaso utilizando las pinzas. Inmediatamente marcar con el lápiz la altura alcanzada por la fase móvil. Esta señal es el frente del disolvente.
5. Señalar con el lápiz un círculo sobre cada mancha y medir la distancia desde la línea base hasta el centro de cada mancha (distancia **a**), y la distancia desde la línea base hasta el frente del disolvente (distancia **b**). Con estas medidas se puede determinar el Factor de Retención (**R_f**) para cada compuesto (**X**), (**Y**) y (**Z**), mediante la siguiente expresión: $R_f = (a)/(b)$.

Ahora escribir las repuestas a las Preguntas 3-5 del Cuadernillo de Respuestas.

Llevar a cabo una segunda cromatografía utilizando como fase móvil 5-6 cm³ de una disolución formada por 30% (en volumen) de acetato de etilo y un 70% (en volumen) de hexano.

Ahora escribir las repuestas a las Preguntas 6-8 del Cuadernillo de Respuestas.

El factor de retención (**R_f**) del compuesto desconocido (**R**) tiene que coincidir con el de uno de los compuestos (**X**), (**Y**) o (**Z**) en ambas cromatografías. Esto sirve para identificar el compuesto (**R**).

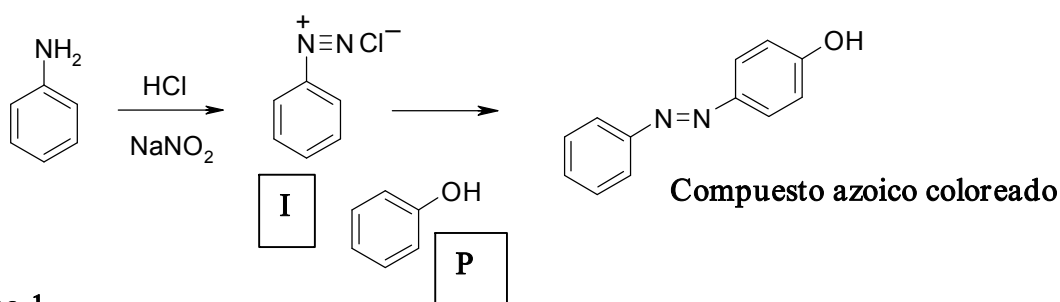
Ahora escribir las repuestas a las Preguntas 9 y 10 del Cuadernillo de Respuestas.

Síntesis de tintes azoicos:

Generalmente un tinte se puede describir como un colorante que tiene una afinidad con el sustrato o sustancia sobre el que se aplica y así queda adherido a él. La siguiente tarea consiste en preparar dos de los tintes azoicos que fabrica la factoría anteriormente indicada. Los diferentes compuestos azoicos tienen distintos colores.

Breve descripción de las reacciones

Los compuestos azoicos se utilizan como tintes desde hace 150 años. Se preparan uniendo una sal de arildiazonio (por ejemplo el compuesto **I** en el esquema del diagrama 1 que se muestra más abajo) con un compuesto aromático activado (por ejemplo el fenol **P** en el esquema del diagrama 1). La sal de diazonio, es decir el compuesto **I**, se obtiene a partir de la reacción de una anilina con ácido nitroso. El ácido nitroso se obtiene *in situ* a partir de la reacción de nitrito de sodio (NaNO_2) con ácido clorhídrico diluido (HCl). Las sales de diazonio son inestables, y se deben mantener a 0°C .



Esquema 1

Ahora escribir la respuesta a la Pregunta 11 del Cuadernillo de Respuestas.

Procedimiento (utilizando los 12 tubos de ensayo que se proporcionan)

Nota – Pedir hielo cuando lo necesites.

1. Añadir una pizca del sólido desconocido (**R**) (la punta de la espátula) a $2\text{-}3\text{ cm}^3$ de ácido clorhídrico. Agitar constantemente, utilizando la varilla de vidrio que se proporciona, mientras se enfría en un baño de hielo.
2. Preparar una disolución de concentración similar añadiendo una pizca de nitrito de sodio en $2\text{-}3\text{ cm}^3$ de agua. Agitar constantemente, utilizando la varilla, mientras se enfría en un baño de hielo.
3. Añadir la disolución fría de nitrito de sodio a la disolución ácida, también fría, del compuesto (**R**) para obtener la sal de diazonio. Mantener esta mezcla en el baño de hielo.
4. En un tercer tubo de ensayo añadir con la espátula una pizca de fenol sobre 3 cm^3 de disolución de hidróxido de sodio (disolución alcalina)
5. Mezclar una pequeña porción de la disolución de la sal de diazonio con la disolución alcalina de fenol. La reacción tiene lugar rápidamente y se forma un precipitado sólido coloreado. Ese precipitado es el tinte azoico crudo.
6. Preparar análogamente el tinte azoico a partir de la sal de diazonio (**R**) y el compuesto aromático activado, 1-naftol.

Ahora escribir las respuestas a las Preguntas 12 y 13 del Cuadernillo de Respuestas.

AQUÍ TERMINA LA TAREA 2

Tarea 3 – Determinar la densidad de cada una de las muestras

Introducción

El agua dulce tiene una densidad de 1000 kg m^{-3} a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. La densidad del agua de mar depende de su temperatura y de las sales y otros materiales disueltos en ella. Los valores típicos de la densidad del agua superficial del océano están entre 1025 kg m^{-3} y 1030 kg m^{-3} . El agua en los estuarios, bahías y cerca de las desembocaduras de los ríos tiene una densidad que está entre la densidad del agua dulce y la densidad del agua marina. Su densidad depende de la mezcla de agua dulce y agua de mar. Las muestras de este agua tienen una densidad que varía con la situación de los puntos de muestreo, más o menos cerca de las desembocaduras de los ríos, también varía con la cantidad de agua que vierten los ríos y con las mareas.

Un hidrómetro (densímetro) es un dispositivo que sirve para medir la densidad de un líquido. En esta tarea se pide que se construya un hidrómetro y se mida la densidad de las muestras de agua.

Construcción de un hidrómetro.

Fundamento

El Principio de Arquímedes dice que todo cuerpo que está total o parcialmente sumergido en un fluido experimenta un empuje ascensional equivalente al peso del fluido desalojado.

Procedimiento de construcción.

Se proporcionan los componentes necesarios para construir un hidrómetro como muestra la Figura 3. Para ello hay que seguir los siguientes pasos.

- (i) Introduzca la pipeta en el agujero del tapón de goma, con el lado afilado hacia fuera del tubo de ensayo.
- (ii) Quite el papel que protege el adhesivo en la escala de papel. Pegue firmemente la escala a la pipeta mientras está seca. La posición del “0” debe quedar a pocos centímetros de la parte superior de la pipeta. Por si se despegara la escala marque el punto de la pipeta que se corresponde con el “0” de la escala.

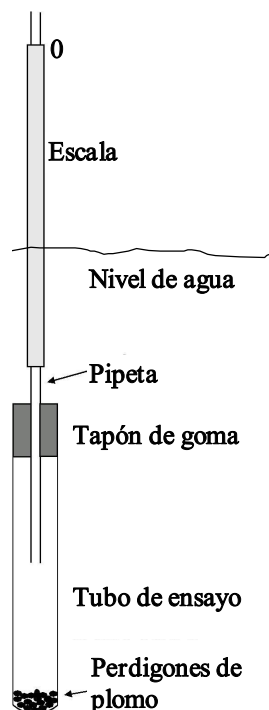


Figura 3: El hidrómetro acabado.

- (iii) Calcule la masa de perdigones que debe poner en el hidrómetro para que pueda flotar verticalmente en agua dulce con la mayor parte de su volumen sumergido. La masa de los diferentes componentes (excluidos los perdigones) se dan en la tabla inferior.

Componente	Masa (g)
Tubo de ensayo	42
Tapón de goma	16
Pipeta	1,5
Escala	0,5

(Nota: Es necesario calcular el volumen del hidrómetro para responder este apartado)

Escriba los cálculos y el resultado en la Pregunta 14 del Cuadernillo de Respuestas

ANTES DE SEGUIR CON EL SIGUIENTE PASO, pide al supervisor del laboratorio que firme estos cálculos.

- (iii) Añade suficientes perdigones de plomo al tubo de ensayo para que el hidrómetro flote verticalmente en agua potable, de manera que la marca del “0” esté en la superficie del líquido. Por si el tapón de goma se moviera, haz una marca con un rotulador indeleble en el tapón señalando la posición del borde del tubo de ensayo.

La lectura de la escala en agua dulce (la medida que señala la superficie del agua) debe escribirse en la Pregunta 15 del Cuadernillo de Respuestas.

Calibrado del hidrómetro:

La escala del hidrómetro debe ser calibrada antes de que se pueda usar para medir la densidad de las muestras de agua. Para hacer esto, hay que dibujar la curva de calibración del hidrómetro construido. La curva de calibración es una gráfica que representa la lectura de la escala del hidrómetro frente a la densidad. Los datos de esta gráfica se obtienen de las lecturas de las medidas de la escala cuando se sumerge el hidrómetro en líquidos de densidad conocida.

No está permitido suponer que la escala del hidrómetro varía linealmente con la densidad. Para hacer las medidas se cuenta con aproximadamente 1000 cm^3 de agua de mar, que tiene una densidad de 1026 kg m^{-3} . También se dispone de agua dulce (agua del grifo) que se puede suponer que tiene una densidad de 1000 kg m^{-3} . Con estas dos muestras (agua de mar y agua dulce) se tienen dos puntos para la curva de calibración. Para tener más puntos se pueden hacer disoluciones de densidades conocidas diluyendo cuidadosamente el agua de mar con la cantidad apropiada de agua dulce. La curva de calibración se debe dibujar con los datos obtenidos usando disoluciones de agua de mar.

- (i) Deduzca la fórmula que expresa la densidad de la disolución que se obtiene cuando se mezcla un volumen V_1 de un líquido de densidad ρ_1 con un volumen V_2 de un líquido de densidad ρ_2 .

Escriba la fórmula obtenida en la Pregunta 16 del Cuadernillo de Respuestas.

- (ii) Antes de tomar cualquier medida, planifique cuidadosamente como va a obtener cada una de las diluciones que se vayan a usar para tener disoluciones de diferentes densidades.

Empiece con agua de mar pura. Incluyendo los puntos de densidad 1026 kg m^{-3} y 1000 kg m^{-3} , la gráfica debería tener siete puntos regularmente distribuidos. Se puede usar tanta cantidad de agua dulce como se desee, pero sólo se tienen aproximadamente 1000 cm^3 de agua de mar para todo el trabajo. Para hacer el esquema de dilución se puede desechar parte de las disoluciones.

Elabore un plan “paso a paso” de cómo se van a hacer las diluciones, dando la densidad de la mezcla de cada dilución. Esta planificación debe hacerse muy cuidadosamente y puede ocupar bastante tiempo.

Examine el esquema cuidadosamente antes de escribirlo en la tabla de la Pregunta 17 del Cuadernillo de Respuestas.

ANTES DE SEGUIR CON EL SIGUIENTE PASO, pide al supervisor del laboratorio que firme el esquema de dilución. Cualquier cambio posterior que se haga a este esquema de dilución debe ser firmado con sus iniciales por el supervisor del laboratorio.

- (iii) Llena la probeta de agua de mar e introduce en ella el hidrómetro.
Registre la lectura de la escala del hidrómetro del agua en la fila apropiada de la tabla de la Pregunta 18 del Cuadernillo de Respuestas.

- (iv) Realice las diluciones según el esquema de dilución diseñado anteriormente.
Para cada dilución obtenida registre su densidad y la lectura de la escala del hidrómetro en la fila apropiada de la tabla de la Pregunta 18 del Cuadernillo de

Respuestas. El supervisor del laboratorio debe observar y firmar con sus iniciales en las lecturas señaladas en la tabla del Cuadernillo de Respuestas.

ANTES DE DIBUJAR LA CURVA DE CALIBRACIÓN, pide al supervisor del laboratorio que firme el tabla de datos.

- (iv) *(Pregunta 19) Dibuje la curva de calibración en el papel milimetrado que se proporciona. Si se considera apropiado, dibuje la línea que mejor se ajuste a los datos. NO SE DEBE OLVIDAR INCLUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN EN EL CUADERNILLO DE RESPUESTAS.*

Medida de las densidades de las muestras.

Se han proporcionado tres muestras de agua, rotuladas como Sample A, B y C. Use el hidrómetro para medir la densidad de estas muestras. No es necesario calcular el error.

Registre las lecturas de la escala del hidrómetro y sus correspondientes densidades para cada una de las muestras A, B y C en la Pregunta 20 del Cuadernillo de Respuestas.

ESTO COMPLETA LA TAREA 3.

Tarea 4 – Tinción de Gram, forma y organización de las bacterias.

Hay que realizar una tinción de Gram en cada uno de los portaobjetos que se suministran de los cultivos bacterianos de la Tarea 1 (Muestras A, B, y C).

Introducción:

La tinción de Gram permite distinguir dos clases de bacterias: las Gram positivas, y las Gram negativas. Si el método se realiza adecuadamente:

- Los organismos Gram positivos (+) se tiñen de color *violeta oscuro*.
- Los organismos Gram negativos (–) se tiñen de color *rosa o rojo claro* por la safranina.

Nota: Se proporciona la Muestra B por duplicado para poder entrenarse.

Procedimiento de la Tinción de Gram:

Antes de empezar, comprobar que se dispone de todos los reactivos, así como que el frasco lavador está cerca y lleno de agua, porque no va a haber tiempo durante el procedimiento de ir a buscarlo. Hacer la tinción sobre el cuenco metálico y cerca de una piletta, porque los colorantes manchan mucho y puede formarse una buena. Hay que ponerse guantes.

ETAPA 1: Colocar el portaobjetos sobre la horquilla de alambre y esta sobre el cuenco metálico. Cubrir completamente todo el portaobjetos con el reactivo “crystal violet”. Dejar actuar al “crystal violet” durante 60 segundos. Finalizado este tiempo regar el portaobjetos con el agua del frasco lavador durante 5 segundos para eliminar todo el reactivo. La muestra debe tener color azul violeta a simple vista.

ETAPA 2: Cubrir el portaobjetos con la disolución de iodo. Dejarla actuar durante un minuto. Pasado este tiempo, regar igualmente con el agua del frasco lavador durante 5 segundos e inmediatamente pasar a la Etapa 3. Todavía la muestra debe tener color azul.

ETAPA 3: Para decolorar la muestra, añadir gota a gota la disolución de decolorante (etiquetada “decolourising solution”) hasta que deje de observarse, a simple vista, color azul-violeta. Como en las etapas anteriores, regar con el agua del frasco lavador durante 5 segundos.

ETAPA 4: Finalmente, hay que aplicar el tinte de recuento, “safranin”. Cubrir el portaobjetos con este tinte como en las etapas 1 y 2. Dejar actuar el tinte durante, al menos, un minuto, para que las bacterias incorporen el “safranin”. Las bacterias Gram positivas incorporan muy poco, o nada, de este tinte y no se han decolorado en la etapa tres, por lo que aparecerán de color azul violeta. Las Gram negativas, adoptan ahora un color rosa, siendo fácilmente distinguibles de las positivas. De nuevo, regar con agua durante 5 segundos para eliminar el exceso de tinte.

Completadas las Etapas 1 a 4, para cada portaobjetos, se deben secar suavemente con papel de filtro, sin frotar, o airear, antes de ponerlos en el microscopio. **!NO FROTAR LA PREPARACION!**

Finalmente, examinar las preparaciones al microscopio, primero con el objetivo X40 y posteriormente utilizando el aceite de inmersión y el objetivo X100.

Nota ESTA TAREA DEBE SER VERIFICADA POR VUESTRO SUPERVISOR DE LABORATORIO, FIRMANDO EN LOS RECUADROS ADECUADOS DE LA PREGUNTA 21 DEL CUADERNILLO DE RESPUESTAS, ANTES DE ESCRIBIR VUESTROS RESULTADOS.

Resultados:

Responder a las siguientes preguntas señalando en el Cuadernillo de Respuestas el recuadro apropiado de la tabla correspondiente a la Pregunta 21. En el Apéndice 1 se explican los términos utilizados.

- (i) Describir la forma y agregación de las bacterias en cada muestra.
- (ii) Determinar la muestra que contiene *E.coli*, y por tanto, contaminada con aguas fecales.
- (iii) Determinar la muestra que contiene bacterias *ácido láctico*, y por tanto, contaminada con residuos de industria lechera/quesera.

ESTO COMPLETA LA TAREA 4.

Tarea 5 – Determinación de la Materia Orgánica por BOD (Demanda Biológica de Oxígeno).

Introducción.

Las bacterias son responsables de la descomposición de los residuos orgánicos. Cuando la materia orgánica, tal como restos de plantas, estiércol, aguas fecales o residuos de comida presentes están presentes en el agua, las bacterias comienzan el proceso de ruptura de estos residuos. Cuando esto sucede, las bacterias aeróbicas consumen gran parte del oxígeno disuelto en el agua, impidiendo que otros organismos acuáticos dispongan del oxígeno que necesitan para sobrevivir. La determinación de la Demanda Biológica de Oxígeno (BOD) nos permite conocer el oxígeno que necesitan los microorganismos para decomponer estos residuos. Si hay una gran cantidad de residuos orgánicos en el agua a tratar, habrá también una gran cantidad de bacterias para descomponer los residuos. Por tanto, la demanda de oxígeno será muy alta (debido a la cantidad total de bacterias) y el valor de BOD será alto. A medida que el residuo se consume o dispersa en el agua, el valor de BOD descenderá.

El ensayo de BOD necesita 5 días para completarse. El valor de BOD se determina comparando el valor del Oxígeno Disuelto (DO) existente en una muestra de agua recién tomada con el valor de DO de una muestra de agua que ha estado incubándose durante 5 días en la oscuridad. La diferencia entre estos dos valores de DO indica la cantidad de oxígeno necesario para descomponer cualquier clase de materia orgánica presente en la muestra y es una buena aproximación al valor de BOD. A cada equipo se le dará el valor del DO de la muestra recién tomada (día 1) y tendrá que determinar el valor del DO a los 5 días correspondientes a las muestras suministradas.

Cada grupo recibe tres muestras de agua (A, B y C), en donde se ha fijado el valor del oxígeno disuelto por el método Winkler. La muestra 1 está diluida 1 a 100, la muestra B es una dilución 1 a 200 y la muestra C es una dilución 1 a 20 de la muestra original.

NOTA: Valorar las muestras suministradas con tiosulfato de sodio (1/80 M o 0,0125 M) para determinar el oxígeno presente en cada muestra.

Procedimiento:

Mediante la probeta graduada, verter 100 mL de la muestra en el matraz erlenmeyer y valorarla con la disolución de tiosulfato hasta que quede un color amarillo pálido. (Para apreciar mejor el cambio de color, colocar el erlenmeyer sobre el azulejo blanco o sobre un trozo de papel blanco).

Añadir al erlenmeyer dos gotas de la disolución de almidón (etiquetada starch) que actúa como indicador, y adoptará un color azul intenso. Seguir valorando hasta que desaparezca dicho color azul (en el punto de equivalencia la disolución es incolora). El procedimiento hay que relizarlo, una sola vez para cada muestra.



Resultados:

En esta tarea se supone que el número de mL de tiosulfato gastados en la valoración es equivalente al número de $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxígeno disuelto en la muestra. !Hay que tener en cuenta el factor de dilución para realizar los cálculos correctamente!

Los valores de oxígeno disuelto correspondientes a las muestras recientes (día 1) son:

Día 1, valor del oxígeno disuelto para la Muestra A = $11,5 \text{ mg L}^{-1}$

Día 1, valor del oxígeno disuelto para la Muestra B = $11,8 \text{ mg L}^{-1}$

Día 1, valor del oxígeno disuelto para la Muestra C = $11,2 \text{ mg L}^{-1}$

Responder las siguientes preguntas, señalando el cuadro apropiado en la tabla del Cuadernillo de Respuestas, correspondiente a la Pregunta 22.

- *Indicar la BOD resultante en mg L^{-1} .*
- *Determinar la muestra que tiene mayor demanda biológica de oxígeno.*
- *Determinar la muestra que tiene menor demanda biológica de oxígeno.*

ESTO COMPLETA LA TAREA 5.

Tarea 6 - Determinar los lugares de la figura 1 donde se tomaron las Muestras A, B, and C.

De acuerdo con los resultados de los tests realizados con las Muestras A, B, y C en las Tareas 1 a 5, localizar los sitios donde se tomaron cada una de las muestras.

Señalar en el cuadro del Cuadernillo de Respuestas, Pregunta 23, marcando el sitio que corresponde a cada Muestra.

CON ESTO SE COMPLETA LA TAREA 6 Y SE ACABA ESTE EXPERIMENTO.

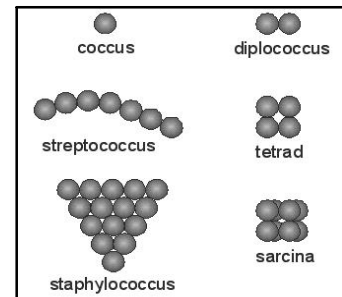
Apéndice 1 – Morfología de las Bacterias y coloración de Gram.

La mayoría de las bacterias aparecen con tres diferentes formas: cocos, bacilos con forma de bastón y bacilos con forma espiral.

Los cocos:

Los cocos son esféricos u ovalados con una de siguientes agregaciones u organizaciones:

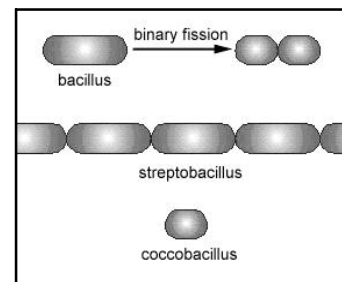
- Par de cocos : Diplococcus
- Cadena de cocos: Estreptococos
- Tetrada : Grupo rectangular de cuatro cocos
- Cubo de 8 cocos: Sarcina
- Al azar : Estafilococos



Los bacilos con forma de bastón:

Los bacilos tienen las siguientes agregaciones:

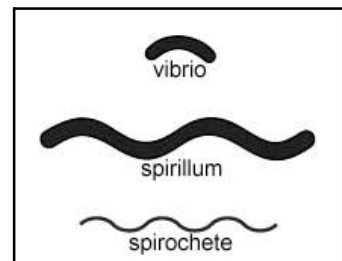
- Bacilos: un solo bastón
- Estreptobacilos: una cadena de bacilos
- Cocobacilos: disposición ovalada y similar a los cocos



Los bacilos con forma espiral:

Las espirales se presentan en una de las tres disposiciones:

- vibrio
- spirillum
- espiroqueta



Si el método Gram se realiza adecuadamente, se obtiene

Los organismos Gram positivos (+) se tiñen de color **violeta oscuro**.

Los organismos Gram negativos (-) se tiñen de color **rosa o rojo claro** (por la safranina).

Las bacterias coliformes son buenos indicadores de contaminación, y entre ellas se encuentran muchas especies que encontramos en el suelo, sobre las frutas, hojas, semillas y en el agua corriente. A las bacterias coliformes de origen fecal se les denomina coliformes fecales. El *Escherichia coli* (*E.coli*) es una bacteria fecal que se encuentra en las heces de los humanos, mamíferos y aves. La cantidad de colonias de *E.coli* nos informa de la calidad microbiológica del agua. La detección de *E.coli* en agua indica contaminación fecal.

- Las *E.coli* son Gram negativas con morfología de bastones delgados.

Las denominadas bacterias ácido láctico agrupa a una gran cantidad de bacterias beneficiosas que tienen propiedades similares, todas producen ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Están muy extendidas en la naturaleza e incluso se encuentran en nuestro sistema digestivo. Estos microbios se utilizan para producir alimentos fermentados, tales como yogurt (*Streptococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*), quesos, mantequilla y el kefir.

- Las bacterias ácido láctico son Gram positivas y varían mucho en su morfología, desde bastoncitos largos y delgados hasta cocobacilos cortos o cocos que suelen disponerse en cadenas cortas o racimos.