

## 5120. Richiesta biochimica di ossigeno (BOD<sub>5</sub>)

Il saggio del BOD (Biochemical Oxygen Demand) esprime la quantità di ossigeno necessaria per l'ossidazione biochimica delle sostanze contenute in un'acqua nelle condizioni in cui viene eseguito il saggio stesso. Detta determinazione tende a riprodurre, in laboratorio, le condizioni che si possono verificare normalmente nei corpi idrici e negli impianti di depurazione di tipo biologico.

La richiesta di ossigeno è dovuta generalmente a tre classi di sostanze: composti organici, i cui atomi di carbonio vengono utilizzati dai microrganismi come alimento per le varie attività vitali (accrescimento, respirazione, riproduzione); composti ossidabili dell'azoto, utilizzati come fonte energetica da batteri specifici come ad esempio il Nitrosomonas e il Nitrobacter; sostanze inorganiche, come ad esempio ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono facilmente ossidate dall'ossigeno presente nelle acque.

Le sostanze appartenenti alle prime due classi consumano ossigeno attraverso meccanismi biochimici, mentre quelle appartenenti alla terza classe generalmente attraverso processi chimici. La determinazione può essere effettuata con metodi chimici, fisici ed elettrochimici.

I metodi chimici, di cui si riferisce nel seguito, possono essere eseguiti in qualunque laboratorio, senza l'impiego di particolari apparecchiature.

Le condizioni operative per la determinazione del BOD<sub>5</sub> con metodi chimici devono essere stabilite di volta in volta, in relazione alla natura e alla concentrazione delle sostanze ossidabili, nonché alla presenza di un idoneo consorzio batterico.

Ciò premesso, a seconda del tipo di campione da analizzare, si adatterà uno dei seguenti metodi.

### METODO A - Determinazione diretta

#### 1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare prima e dopo incubazione di cinque giorni, al buio ed alla temperatura di 20°C.

La differenza fra le due determinazioni dà il valore del BOD<sub>5</sub> del campione, espresso in mg/L di ossigeno.

#### 2. Campo di applicazione

Il metodo può essere applicato ad acque naturali e di scarico poco inquinate, aventi un BOD<sub>5</sub> inferiore a 5 mg/L, purchè non siano presenti sostanze inibitrici, i valori di pH siano compresi tra 6,5 ed 8,3 e sia garantito un adeguato consorzio batterico.

#### 3. Interferenze e cause di errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto; l'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizioni che la reazione di ossidazione venga supposta completa.

Ad esempio, nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferenze negative possono essere provocate dalla presenza di cloro libero o metalli tossici a causa della loro azione inibitrice. Analoga azione inibitrice è causata da valori di pH inferiori a 6,5 o superiori a 8,3.

#### 4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD<sub>5</sub> entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

#### 5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 *Bottiglie di incubazione*, della capacità di 300 mL ( $\pm 1,5$  mL), fornite di tappo a smeriglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 *Termostato*, da usare a 20°C, regolabile a  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

5.3 *Compressore o bombola di aria compressa*

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 *Setto poroso per l'aerazione*

#### 6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reattivi di grado analitico.

6.1 *Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide*

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH), posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma, in 250 mL di acqua e raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL.

Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN<sub>3</sub>) previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

### 6.2 Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

### 6.3 Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ( $\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) in acqua e diluire a 100 mL.

### 6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.

In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) oppure 4 g di tetraborato sodico ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di  $\text{KIO}_3$  o  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$  disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di  $\text{KIO}_3$  o 3,2500 g di  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$  in acqua e diluendo ad 1 L.

In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogeniodato di potassio precedentemente preparata. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate nel seguente Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

### 6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

### 6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni millilitri di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

### 6.7 Acido solforico concentrato ( $d=1,84$ )

## 7. Procedimento

Aerare il campione in esame a saturazione per circa 10 minuti e lasciarlo riposare per 10 minuti, mantenendo la temperatura del campione a circa 20°C. In questo modo si può evitare la sovrasaturazione del campione. Trasferire il campione per sifonamento, evitando la formazione di bolle, in almeno due bottiglie da 300 mL (5.1). Riempire le bottiglie sino a circa 1 cm oltre l'inizio del cono a smeriglio.

Utilizzare almeno una delle bottiglie per il dosaggio del contenuto di ossigeno al tempo 0 secondo le modalità descritte al Paragrafo (7.1); porre l'altra (o le altre) in termostato a 20°C per 5 giorni, in completa oscurità per prevenire la produzione di ossigeno da parte delle alghe.

Al termine del periodo d'incubazione determinare l'ossigeno disciolto residuo secondo le modalità indicate al Paragrafo (7.1).

### 7.1 Determinazione dell'ossigeno disciolto

Aggiungere al campione contenuto nella bottiglia con tappo a smeriglio, 2 mL di soluzione di solfato di manganese (6.2) e 2 mL di soluzione alcalina di ioduro-sodio azide (6.1), avendo cura di introdurre le soluzioni sotto la superficie del liquido.

Chiudere la bottiglia eliminando le bolle d'aria e agitare capovolgendo molte volte la bottiglia; ripetete l'agitazione una seconda volta dopo che il precipitato si è depositato lasciando il liquido sovrastante limpido.

Quando il precipitato si è nuovamente depositato lasciando almeno 100 mL di liquido limpido, aprire la bottiglia e aggiungere 2 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (6.7), avendo cura di farlo fluire lungo il collo della bottiglia.

Se il campione contiene ferro (III), aggiungere, prima di acidificare, 1 mL di soluzione di fluoruro di potassio (6.3). Tappare nuovamente la bottiglia ed effettuare il mescolamento capovolgendo varie volte la bottiglia finchè lo iodio non è uniformemente distribuito. Far decantare la soluzione e titolare subito 100 mL con la soluzione di tiosolfato (6.5), fino a un colore giallo paglierino. Aggiungere la salda d'amido e continuare a titolare fino a scomparsa del colore azzurro.

## 8 Calcoli

La concentrazione di ossigeno disciolto è dato da:

$$C = \frac{a \cdot N \cdot f \cdot 8 \cdot 1000}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di ossigeno disciolto;

a = volume (mL) di soluzione di tiosolfato di sodio utilizzato nella titolazione;

N = normalità della soluzione di tiosolfato di sodio;

8 = peso equivalente dell'ossigeno;

V = volume (mL) di campione utilizzato per la titolazione;

f = fattore di correzione per il volume dei reagenti introdotti nella bottiglia d'incubazione.

Il fattore di correzione (f) è dato da:

$$f = \frac{B}{B-b}$$

dove:

B = volume (mL) della bottiglia adoperata

b = volume totale (mL) dei reattivi impiegati per la precipitazione.

Se X e Y sono le concentrazioni di ossigeno disciolto nel campione, rispettivamente prima e dopo l'incubazione del campione stesso, il valore di BOD<sub>5</sub> (espresso come mg O<sub>2</sub>/L) si ricava dalla seguente espressione:

$$BOD_5 = (X - Y)$$

## 9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico (\*), preparata secondo le modalità indicate alla nota del Capitolo 9 del Metodo B1.

(\*) Il consumo è opportuno che corrisponda al 40-70% dell'ossigeno disciolto presente prima dell'incubazione.

Lo scarto tipo (riproducibilità), ottenuta valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuno, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di  $\pm 30$  mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a  $\pm 10$  mg/L.

## **METODI B - Determinazione mediante diluizione**

### **METODO B1 - Determinazione mediante diluizione, senza inoculo**

#### **1. Principio del metodo**

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare, opportunamente diluito, prima e dopo una incubazione, al buio e alla temperatura di 20°C, di 5 giorni. La differenza tra le due determinazioni, moltiplicata per il fattore di diluizione, dà il valore del BOD<sub>5</sub> del campione in esame, espresso in mg/L di ossigeno.

#### **2. Campo di applicazione**

Il metodo trova applicazione nella misura del BOD<sub>5</sub> in acque naturali o di scarico, purchè non siano presenti sostanze inibitrici, i valori di pH siano compresi tra 6,3 e 8,5 e sia garantita la presenza di un idoneo consorzio batterico. Mentre per misurare valori di BOD<sub>5</sub> inferiori a 5 mg/L il campione viene analizzato tal quale (Metodo A), nel caso, invece, di valori del BOD<sub>5</sub> superiori a 5 mg/L è necessario ricorrere ad una adeguata diluizione. La diluizione deve essere stabilita in relazione al BOD<sub>5</sub> presunto del campione. Così ad esempio, se il valore presunto è compreso tra 5 mg/L e 12 mg/L, è opportuno diluire un volume del campione con un ugual volume di acqua di diluizione (6.8); se esso è compreso fra 12 mg/L e 25 mg/L, un volume del campione è diluito con quattro volumi dell'acqua di diluizione (6.8). Per valori superiori di BOD<sub>5</sub> è necessario effettuare diluizioni tali da ottenere un campione che, dopo il periodo di incubazione, presenti una quantità residua di ossigeno in grado di essere rilevata analiticamente (\*). La diluizione deve essere eseguita con acqua di diluizione (6.8) preparata di fresco e satura d'ossigeno a 20°C.

#### **3. Interferenze e cause d'errore**

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto. L'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa.

Ad esempio nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferiscono negativamente tutte le sostanze che, se presenti a una data concentrazione, esercitano un'azione inibente sull'attività dei microrganismi, rallentando o bloccando i processi ossidativi. In questi casi può accadere che tali errori siano evitati quando nei campioni in esame, con la diluizione necessaria per la esecuzione della misura del BOD<sub>5</sub>, la con-

(\*) Il consumo è opportuno che corrisponda al 40-70% dell'ossigeno disciolto presente prima dell'incubazione.

centrazione delle sostanze inibenti risulti riportata al di sotto della soglia d'interferenza. Le interferenze negative possono essere superate mediante trattamento del campione. Ad esempio il pH del campione può essere corretto mediante aggiunta di acido solforico o idrossido di sodio (entrambi circa 1 M), mentre per quanto concerne il cloro presente in campioni provenienti da trattamenti di clorazione è necessario un trattamento con solfito di sodio.

#### 4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD<sub>5</sub> entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

#### 5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 *Bottiglie di incubazione*, della capacità di 300 mL ( $\pm 1,5$  mL), fornite di tappo a smeriglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 *Termostato*, da usare a 20°C, regolabile a  $\pm 1$ °C.

5.3 *Compressore o bombola di aria compressa*

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 *Setto poroso per l'aerazione*

#### 6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reagenti di grado analitico.

6.1 *Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide*

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH) posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma in 250 mL di acqua, raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN<sub>3</sub>), previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 *Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)*

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

### 6.3 Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ( $\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) in acqua e diluire a 100 mL.

### 6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.

In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) oppure 4 g di tetraborato sodico ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di  $\text{KIO}_3$  o  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$  disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di  $\text{KIO}_3$  o 3,2500 g di  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$  in acqua e diluendo ad 1 L.

In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogeniodato di potassio precedentemente preparato. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate al Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

### 6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

### 6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

### 6.7 Acido solforico concentrato ( $d=1,84$ )

### 6.8 Acqua di diluizione

La preparazione viene effettuata aggiungendo 1 mL di ciascuna delle seguenti soluzioni (\*) a un litro d'acqua:

- soluzione di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 0,25 g/L
- soluzione di  $\text{CaCl}_2$  anidro a 27,5 g/L
- soluzione di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 22,5 g/L
- soluzione tampone a pH 7,2.

La soluzione tampone a pH 7,2 viene preparata sciogliendo 21,75 g di  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 8,5 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 33,4 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1,7 g di  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , in un litro d'acqua.

Aerare la soluzione a saturazione per 15 minuti e lasciare a riposo per almeno altri 15 minuti. L'acqua di diluizione è stabile al massimo per una settimana. Trascorso detto tempo deve essere ripreparata avendo cura di lavare bene i contenitori con miscela cromica, risciacquando con acqua.

(\*) Nella determinazione del  $\text{BOD}_5$ , se si vuole escludere il contributo dei processi di nitrificazione, che generalmente si instaurano dopo che è stata soddisfatta la richiesta da parte delle sostanze carboniose, occorre aggiungere un agente chimico inibente. Per esempio, 1 mL di una soluzione contenente 0,5 g/L di allitiourea in acqua oltre alle soluzioni indicate.

## 7. Procedimento

Qualora il campione in esame presenti delle sostanze che interferiscono nella misura del BOD<sub>5</sub>, bisogna sottoporlo ad opportuni trattamenti, secondo quanto descritto al Capitolo 3. Stabilire la diluizione o le diluizioni più opportune, introdurre cautamente acqua di diluizione (6.8), aerata a saturazione, per sifonamento o per caduta da una bottiglia di Mariotte, assicurandosi che non si abbiano forti rimescolamenti e conseguenti variazioni del contenuto d'ossigeno.

Riempire le bottiglie sino a circa 1 cm al di sopra della linea che segna l'inizio del cono a smeriglio. Utilizzare almeno una delle bottiglie per il dosaggio del contenuto di ossigeno al tempo 0 secondo le modalità descritte al Paragrafo (7.1) del Metodo A; porre l'altra (o le altre) in termostato a 20°C per 5 giorni, in completa oscurità per prevenire la produzione di ossigeno da parte delle alghe.

Contemporaneamente travasare un campione d'acqua di diluizione (6.8), aerata a saturazione, con le stesse modalità in almeno due bottiglie: utilizzarne una per la determinazione del contenuto al tempo zero dell'ossigeno disciolto e l'altra per l'incubazione. Al termine del periodo d'incubazione determinare, sia nel campione in esame sia nell'acqua di diluizione, l'ossigeno disciolto residuo, secondo il procedimento descritto al Metodo A (7.1).

## 8. Calcoli

Calcolare il BOD<sub>5</sub> tramite la formula seguente:

$$C_{\text{BOD}_5} = (X - Y) \frac{V}{v} - (C - E) \frac{V - v}{v}$$

dove:

$C_{\text{BOD}_5}$  = Domanda biochimica di ossigeno (mg O<sub>2</sub>/L);

X = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito prima della incubazione;

Y = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito dopo l'incubazione;

V = volume (mL) della bottiglia di incubazione;

v = volume (mL) del campione preso in esame;

C = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione prima dell'incubazione;

E = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione dopo l'incubazione.

## 9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico\*).

Lo scarto tipo (riproducibilità) ottenuta valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuna, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ±30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ±10 mg/L.

(\*) Generalmente questa soluzione di riferimento si prepara sciogliendo in acqua distillata 150 mg di glucosio e 150 mg di acido glutammico, previamente essiccati entrambi per un'ora a 105°C, e portando a 1000 mL con acqua distillata.

Prelevare aliquote di 5,0 mL di questa soluzione, portare a volume la bottiglia da BOD con acqua di diluizione inoculata e procedere alla determinazione del BOD della soluzione di riferimento.

Questa soluzione corrisponde ad un valore di BOD<sub>5</sub> pari a 218±11 mg/L.

## METODO B2 - Determinazione mediante diluizione, con inoculo

### 1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare, opportunamente diluito e inoculato, prima e dopo una incubazione di 5 giorni al buio e alla temperatura di 20°C.

La differenza tra le due determinazioni, moltiplicata per il fattore di diluizione, dà il valore del BOD<sub>5</sub> del campione in esame espresso in mg/L di ossigeno.

### 2. Campo di applicazione

Questo metodo per la determinazione del BOD<sub>5</sub> può essere applicato in acque sterili o che contengono sostanze inibenti l'attività batterica, o che richiedano particolari inoculi.

### 3. Interferenze e cause d'errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto. L'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa.

Ad esempio nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferiscono negativamente tutte le sostanze che, se presenti a una data concentrazione, esercitano un'azione inibente sull'attività dei microrganismi, rallentando o bloccando i processi ossidativi. In questi casi può accadere che tali errori siano evitati quando nei campioni in esame, con la diluizione necessaria per la esecuzione della misura del BOD<sub>5</sub>, la concentrazione delle sostanze inibenti risulti riportata al di sotto della soglia d'interferenza.

Le interferenze negative possono essere superate mediante trattamento del campione. Ad esempio il pH del campione può essere corretto mediante aggiunta di acido solforico o idrossido di sodio (entrambi circa 1 M), mentre per quanto concerne il cloro presente in campioni provenienti da trattamenti di clorazione è necessario un trattamento con solfito di sodio.

### 4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD<sub>5</sub> entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

### 5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 *Bottiglie di incubazione*, della capacità di 300 mL ( $\pm 1,5$  mL), fornite di tappo a sme-

riglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 *Termostato*, da usare a 20°C, regolabile a  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

5.3 *Compressore o bombola di aria compressa*

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 *Setto poroso per l'aerazione*

## 6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reagenti di grado analitico.

6.1 *Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide*

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH) posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma in 250 mL di acqua, raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ), previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 *Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)*

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

6.3 *Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)*

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ( $\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 *Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)*

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.

In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) oppure 4 g di tetraborato sodico ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di  $\text{KIO}_3$  o  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$  disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di  $\text{KIO}_3$  o 3,2500 g di  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$  in acqua e diluendo ad 1 L.

In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogeniodato di potassio precedentemente preparato. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate al Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

### 6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

### 6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

### 6.7 Acido solforico concentrato ( $d=1,84$ )

### 6.8 Acqua di diluizione

La preparazione viene effettuata aggiungendo 1 mL di ciascuna delle seguenti soluzioni (\*) a un litro d'acqua:

- soluzione di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 0,25 g/L;
- soluzione di  $\text{CaCl}_2$  anidro a 27,5 g/L;
- soluzione di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 22,5 g/L;
- soluzione tampone a pH 7,2.

La soluzione tampone a pH 7,2 viene preparata sciogliendo 21,75 g di  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 8,5 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 33,4 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1,7 g di  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , in un litro d'acqua.

Aerare la soluzione a saturazione per 15 minuti e lasciare a riposo per almeno altri 15 minuti. L'acqua di diluizione è stabile al massimo per una settimana. Trascorso detto tempo deve essere ripreparata avendo cura di lavare bene i contenitori con miscela cromica, risciacquando con acqua.

## 7. Procedimento

### 7.1 Scelta e preparazione dell'inoculo

La scelta di un appropriato inoculo è un fattore molto importante nella determinazione del  $\text{BOD}_5$ . In molti casi un inoculo soddisfacente è rappresentato dal liquido supernatante proveniente dal liquame di fogna, sedimentato e conservato in incubazione e agitato per 24 ore alla temperatura di 20°C.

Molti scarichi industriali contengono però sostanze organiche non degradabili dai consorzi microbici derivati dal liquame di fogna. In questi casi, utilizzare come inoculo l'effluente dell'impianto di depurazione asservito o il supernatante di un fango attivo prelevato presso altro impianto. Qualora i suddetti inoculi non siano disponibili, utilizzare un inoculo sviluppato in laboratorio oppure l'acqua del corpo idrico ricevente raccolta preferibilmente a 500-2000 metri a valle dal punto d'immissione degli scarichi da esaminare.

L'acqua, impiegata come inoculo, potrà fornire i migliori risultati se verrà prelevata in punti in cui si siano sviluppati particolari microrganismi capaci di utilizzare come alimento i composti organici presenti (consorzi microbici adesi a superfici sommerse). Talvolta può essere necessario concentrare l'inoculo mediante centrifugazione a 7000 giri/min per 30 minuti oppure per filtrazione (0,45  $\mu\text{m}$ ).

(\*) Nella determinazione del  $\text{BOD}_5$ , se si vuole escludere il contributo dei processi di nitrificazione, che generalmente si instaurano dopo che è stata soddisfatta la richiesta da parte delle sostanze carboniose, occorre aggiungere un agente chimico inibente. Per esempio, 1 mL di una soluzione di contenente 0,5 g/L di allitiourea in acqua oltre alle soluzioni indicate.

È opportuno ricordare che l'inoculo dev'essere effettuato sui campioni trattati, qualora fosse stata necessaria la correzione del pH o l'eliminazione di talune sostanze tossiche.

È possibile utilizzare come inoculo anche i microrganismi presenti nel terreno. Sospendere 100 g di terra da giardino in 1000 mL di acqua di rubinetto non clorata. Può essere utile lo stemperamento preventivo della terra in mortaio. Evitare terre troppo ricche in argilla e non prelevare campioni di terra dopo piogge prolungate. Agitare vigorosamente la sospensione, possibilmente con l'aiuto di un agitatore meccanico. Lasciar decantare per 30 minuti, raccogliere 4 litri di liquido supernatante e filtrarli su carta da filtro rapida. Eliminare i primi 200 mL e tenere i restanti in aerazione fino al momento dell'uso. L'inoculo così preparato deve essere impiegato nel giorno stesso in cui è stato preparato.

## 7.2 Acclimatazione

Talvolta i consorzi batterici utilizzati non sono idonei a metabolizzare alcune sostanze organiche difficilmente biodegradabili contenute in alcuni scarichi. Questo inconveniente, in taluni casi, può essere eliminato mediante un processo di acclimatazione in laboratorio.

L'acclimatazione determina la selezione e l'arricchimento del consorzio batterico, con vantaggi generici, quali, ad esempio, il superamento di inibizioni dovute a sostanze tossiche o alla composizione del campione stesso.

L'acclimatazione può essere realizzata aerando e alimentando gli arricchimenti microbici con piccole dosi giornaliere di scarichi in esame fino a quando non si sia sviluppato un consorzio microbico adatto a metabolizzare le sostanze organiche presenti.

Le modalità usualmente impiegate per la realizzazione di un processo di acclimatazione, ad esempio, di un liquame di fogna sono le seguenti:

- prelevare un campione di 4 o 5 litri, lasciar sedimentare e sottoporre a un processo di moderata aerazione per circa 24 ore;
- sospendere l'aerazione e lasciar sedimentare per 30 minuti;
- sifonare parte del liquido supernatante, sostituendolo con un'aliquota delle acque di scarico in esame da acclimatare e riportare al volume iniziale con il liquame di fogna previamente sedimentato;
- ripetere l'aerazione per altre 24 ore e lasciar poi sedimentare per 30 minuti;
- sostituire la fase supernatante con un'altra aliquota d'acqua in esame;
- ripetere le operazioni di sedimentazione ed immissione del campione con le stesse modalità aumentando gradatamente l'aliquota dell'acqua da acclimatare fino a raggiungere il 100%. A questo punto impiegare il campione con inoculo per il dosaggio del BOD<sub>5</sub>.

## 7.3 Dosaggio

Effettuare le indagini preliminari per la determinazione della presenza o meno di interferenze (positive o negative) allo scopo di procedere agli opportuni pretrattamenti necessari alla loro eliminazione o riduzione, secondo le modalità prescritte nel Metodo B1. Quindi, stabilito il rapporto di diluizione più opportuno, diluire il campione in esame con acqua di diluizione (6.8) contenente l'inoculo comunque ottenuto.

Aggiungere l'inoculo orientativamente in ragione di 2 mL/L di acqua di diluizione nel caso si utilizzi liquame di fogna sedimentato, e di 20 mL/L di acqua di diluizione se si impiega acqua del corpo idrico ricevente.

Quindi procedere alla determinazione del BOD<sub>5</sub> applicando le stesse modalità tecniche descritte al Metodo B1 tenendo presente che è necessario porre in incubazione anche l'acqua di diluizione contenente l'inoculo semplice o acclimatato al fine di determinare il BOD<sub>5</sub>.

## 8. Calcoli

Calcolare BOD<sub>5</sub> tramite la formula seguente:

$$C_{BOD_5} = (X - Y) \frac{V}{v} - (C - E) \frac{V - v}{v}$$

dove:

$C_{BOD_5}$  = Domanda biochimica di ossigeno (mg O<sub>2</sub>/L);

X = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito prima della incubazione;

Y = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito dopo l'incubazione;

V = volume (mL) della bottiglia di incubazione;

v = volume (mL) del campione preso in esame;

C = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione prima dell'incubazione;

E = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione dopo l'incubazione.

## 9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico (\*).

Lo scarto tipo (riproducibilità) ottenuto valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuna, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ±30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ±10 mg/L.

## APPENDICE

La misura del BOD può essere utilizzata anche per studiare la biodegradabilità delle sostanze contenute in un determinato campione. A tal fine si segue l'andamento del BOD attraverso misure effettuate da 1 a 20 giorni d'incubazione (BOD<sub>1</sub>, BOD<sub>2</sub>, ..., BOD<sub>20</sub>) e si riportano poi i valori in diagramma, ponendo sulle ascisse i tempi di incubazione e sulle ordinate i corrispondenti valori del BOD. I valori giornalieri di BOD risulteranno più elevati, per ogni successivo giorno d'incubazione, e la differenza tra i valori di BOD riscontrati, per ciascun giorno d'incubazione successiva, diminuirà proporzionalmente, almeno per i primi cinque giorni. Dopo i cinque giorni, nel caso in cui subentrino processi di nitrificazione, potrà riscontrarsi anche un aumento.

## BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XX Ed. (Washington, APHA).

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", Quad. Ist. Ric. Acque, **75**, 141-142.

MARCHETTI R. (1966): "Determinazione del BOD in indagini sul torrente Seveso", Nota n. 12, *Acqua Industriale*, **43**, 23-25.

(\*) Generalmente questa soluzione di riferimento si prepara sciogliendo in acqua distillata 150 mg di glucosio e 150 mg di acido glutammico, previamente essiccati entrambi per un'ora a 105°C, e portando a 1000 mL con acqua distillata. Prelevare aliquote di 5,0 mL di questa soluzione, portare a volume la bottiglia da BOD con acqua di diluizione inoculata e procedere alla determinazione del BOD della soluzione di riferimento. Questa soluzione corrisponde ad un valore di BOD<sub>5</sub> pari a 218±11 mg/L.