

**INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL
LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO**

CONTENIDO

1.	OBJETIVO	2
2.	ALCANCE	2
3.	RESPONSABLES.....	2
4.	TERMINOS Y DEFINICIONES	2
5.	REFERENCIA NORMATIVA	2
6.	CONDICIONES GENERALES/REFERENCIALES	3
6.2	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	3
6.2.1	EL MATERIAL VOLUMÉTRICO.....	3
6.2.2	EQUIPO REQUERIDO.....	3
6.2.3	REACTIVOS.....	3
6.2.4	PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	4
6.3	PATRON DE REFERENCIA.....	4
6.4	CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS.....	5
7	LIMITACIONES E INTERFERENCIAS.....	5
7.2	CONTROLES PREVIOS	5
8.1	FUNDAMENTO TECNICO:	6
8.1.1.	REACCIONES INVOLUCRADAS	7
9.	DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA ANALITICA.....	8
9.1.	TOMA, PRESERVACIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRA	8
10.	DESCRIPCION DEL PROCESO DE ANALISIS	8
10.1	PREPARACIÓN DEL AGUA DE DILUCIÓN.....	8
10.1.1.	PREPARACIÓN DE DILUCIONES	9
10.1.2.	LLENADO DE BOTELLAS	9
10.1.3.	LECTURA DEL BLANCO	9
10.1.4.	LECTURA DEL BLANCO CON ADICIÓN DE CEPA (POLYSEED).....	9
10.1.5.	LECTURA DEL ESTÁNDAR.....	10
10.1.6.	PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	10
11.	CALCULOS.....	10
12.	CRITERIOS DE ACEPTACION Y RECHAZO.....	12
13.	FORMATOS PARA REGISTRO DEL PROCESO ANALITICO Y DE LOS RESULTADOS	12

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

1. OBJETIVO

Determinar la Demanda Bioquímica de Oxígeno en agua como un indicador indirecto de la materia orgánica presente en el agua, la cual es consumida por los microorganismos. el cambio en la concentración del oxígeno disuelto durante la incubación por 5 días por el método SM 5210 B

2. ALCANCE

Este método de análisis aplica a muestras de aguas superficiales, residuales e industriales, lluvias y subterráneas.

3. RESPONSABLES

La ejecución del presente procedimiento es responsabilidad en orden decreciente de la dirección técnica, los analistas de laboratorio y los auxiliares técnicos.

4. TERMINOS Y DEFINICIONES

Demanda bioquímica de oxígeno DBO₅: Es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días a 20°C. El método se basa en medir el oxígeno consumido por una población microbiana en condiciones en las que se ha inhibido los procesos fotosintéticos de producción de oxígeno en condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos.

Cepa o semilla: Cultivo heterogéneo de microorganismos aeróbicos que transforman la materia orgánica en CO₂ y H₂O.

Materia orgánica: Comprende a las moléculas naturales y artificiales que contiene carbono e hidrógeno. Cantidad de sustancia orgánica en el efluente que ejerce un efecto adverso en el cuerpo receptor del agua.

5. REFERENCIA NORMATIVA

NTC-ISO/IEC 17025:2005, Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración

Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno. Método DBO₅ SM 5210 B. Métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales - APHA-AWWA-WEF. Edición 23 (2017). p 5-5 a p 5-11 .

ASTM-tantard Test Methods for Dissolves Oxygen in Water D888-18, Test Method C

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

6. CONDICIONES GENERALES/REFERENCIALES

6.1 ASPECTOS DE LA SALUD Y SEGURIDAD LABORAL

Antes de iniciar el análisis revisar instructivo para el aseguramiento de la calidad de los ensayos en el laboratorio de aguas de la Universidad del Quindío M.EDS-04.LA.INT.14. Utilizar como protección personal delantal de laboratorio, guantes de nitrilo, monogafas, pinzas. Adicionalmente conocer las Hojas de seguridad de los productos Químicos manejados, y mantenerlas al alcance de todo el personal del Laboratorio de Aguas.

6.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

6.2.1 El material volumétrico

El material utilizado en este método debe ser de clase A verificados de acuerdo con el procedimiento de verificación de material volumétrico.

- Botellas Winkler de 300mL
- Transferpipetas (1-10mL, 100-1000μL)
- Aireador para el agua de dilución
- Frasco lavador
- Espátula
- Balón aforado 1000 mL
- Frasco boca ancha de vidrio
- Recipiente plástico para aireación

6.2.2 Equipo requerido

Los equipos deben ser verificados y/o ajustados de acuerdo con el instructivo. Registrar los resultados en el formato de verificación correspondiente.

- Incubadora, controlada termostáticamente a $20 \pm 1^\circ\text{C}$; excluir cualquier fuente luminosa para eliminar el proceso de producción fotosintética de OD.
- Nevera
- Balanza Analítica
- Agitador magnético
- Desionizador
- Horno
- Potenciómetro
- Termohigrómetro
- Oxímetro (luminiscencia)

6.2.3 Reactivos

- Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4)
- Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4),
- Fosfato ácido de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de amonio (NH_4Cl)
- Cloruro de calcio (CaCl_2)
- Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de Magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Sulfito de sodio (Na_2SO_3)
- Ceba o semilla (Polysed)
- Glucosa
- Ácido glutámico

6.2.4 Preparación de Reactivos

- **Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7,2:** Disolver 8,5 g de Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), 21,75 g de fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4), 33,4 g de fosfato ácido 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 y diluir a 1 L. El pH debe ser 7,2 sin posteriores ajustes. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descartar.
- **Solución de Cloruro de Calcio (CaCl_2):** Disolver 27,5 g de cloruro de calcio (CaCl_2) en agua destilada y diluir a 1L. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descartar.
- **Solución de Cloruro Férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$):** Disolver 0,25 g de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada, diluir a 1L. prepara el día de trabajo.
- **Solución de Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$):** Disolver 22,5 g de sulfato de Magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada y diluir a 1 L. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descartar
- **Soluciones ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1N:** a un volumen apropiado de agua destilada agregar muy lentamente y mientras se agita, 28 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado; diluir a 1 L.
- **Solución básica hidróxido de sodio (NaOH):** Disolver 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua destilada y diluir a 1 L.
- **Solución de sulfito de sodio (Na_2SO_3):** Disolver 1,575 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) en 1L de agua destilada. Esta solución no es estable y se debe preparar diariamente.
- **Solución de cloruro de amonio:** Disolver 1,15 g de NH_4Cl en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7,2 con solución de NaOH , y diluir a 1 L. La solución contiene 0,3 mg de N/mL.
- **Ceba o semilla:** Se toman 500mL de agua de dilución previamente aireada (mínimo 2 horas) y se toma una capsula de polysed, se pone en aireación y agitación durante dos horas, luego se reposa y se toma el sobrenadante

6.3 PATRON DE REFERENCIA

- **Solución Estándar de glucosa – ácido glutámico de 300 mg/L:** Pesar 150 mg de glucosa anhidra y 150 mg de ácido glutámico previamente secados a 103°C durante 1 hora, se disuelve en agua destilada aforando a 1000 mL. Debido a que esta solución se oxida rápidamente es necesario prepararla

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

a diario, desechándola después de su uso. El estándar de esta concentración produce una DBO teórica de 198 mg O₂/L.

La preparación de los reactivos se registra en el formato M.EDS-04.LA.F.03 Preparación de reactivos

6.4 CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS

Teniendo en cuenta que se debe garantizar que el agua de dilución y las muestras deben permanecer a una temperatura de 20 ± 3 °C, la temperatura ambiental debe estar en este rango.

7 LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

Existen numerosos factores que afectan la prueba de la DBO, entre ellos la relación de la materia orgánica soluble a la materia orgánica suspendida, los sólidos sedimentables, los flotables, la presencia de hierro en su forma oxidada o reducida, la presencia de compuestos azufrados y las aguas no bien mezcladas. Al momento no existe una forma de corregir o ajustar los efectos de estos factores.

La oxidación de las formas reducidas del nitrógeno como el amoníaco y nitrógeno orgánico mediada por microorganismos, ejercen una demanda nitrogenácea, la cual ha sido considerada como una interferencia en la prueba; sin embargo, ésta puede ser eliminada con la adición de inhibidores químicos. Se reportan los resultados como DBOC5 (DBO carbonácea) cuando se inhibe la demanda nitrogenácea. Sin inhibición, la DBO calculada corresponde a la suma de la carbonácea y la nitrogenácea. La inhibición es recomendable en muestras de efluentes secundarios, para muestras de agua contaminada o cuando la semilla provenga de efluentes secundarios.

7.1 CONTROLES Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Las practicas de control de calidad se consideran parte de cada método, para este método se incluye en la Tabla 1.

Calibración o Estandarización	Muestra Control (QCS)	Blanco del Método (MB)	Blanco Fortificado (LFB)	Duplicado
-	X	X	-	X

Tomados del SM Tabla 5020: I

7.2 CONTROLES PREVIOS

- El OD consumido por el agua de dilución debe ser menor de 0,2 mg/L
- Origen de las semillas o inóculo.** Es necesario que en la muestra esté presente una población de microorganismos capaces de oxidar la materia orgánica biodegradable. Las aguas residuales domésticas, los efluentes no desinfectados de plantas de tratamiento biológico, y las aguas superficiales que reciben descargas residuales contienen poblaciones satisfactorias de microorganismos. Algunas muestras no

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

contienen una población microbiana suficiente (por ejemplo, efluentes industriales sin tratamiento, aguas desinfectadas, efluentes con elevada temperatura o con valores extremos de pH), por tanto, deben inocularse por adición de una población adecuada de microorganismos.

- La semilla o inóculo preferible es el efluente de un sistema de tratamiento biológico, La semilla utilizada en este procedimiento es una semilla comercial (Polyseed). De acuerdo a las indicaciones del proveedor las capsulas deben airearse y agitarse suavemente por una hora constante. Esta solución debe utilizarse preferiblemente en un intervalo de 6 horas.
- Cuando no se disponga de del inóculo, se puede desarrollar en el laboratorio una semilla adaptada, por aireamiento continuo de una muestra clarificada de agua residual doméstica y adición de pequeños incrementos diarios de aguas residuales.
- **Control de inóculos (Según el proveedor)** Para determinar el factor o consumo de la semilla, se deben realizar 4 siembras con diferentes volúmenes de semilla 15 mL, 20 mL, 25 mL y 30 mL. Se determina el OD inicial y después de 5 días el OD final. Con estos datos se calcula el factor de la semilla, el cual debe estar entre 0,6 y 1,0 mg/L.
- Verificación de Nevera, termohigrómetro (condiciones ambientales), balanza, incubadora a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, evitar la exposición de los winklers a la luz directa para prevenir la producción fotosintética de oxígeno disuelto.
- Las botellas de incubación, deben limpiarse con una solución diluida de hipoclorito posterior adición de agua caliente para eliminar el cloro y finalmente ser enjuagadas con agua abundante desionizada, secar antes de usar.
- Medir el pH inicial a una temperatura de la muestra de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, si el pH de las muestras no está comprendido entre 6 y 8, se debe neutralizar a un pH entre 6,5 a 7,5 con una solución ácida 1N o solución alcalina 1N, cuidando de no diluir la muestra más de un 0,5%.
- En muestras de aguas sobresaturadas con oxígeno disuelto, es decir, aquellas con contenido mayor a 9 mg/L de oxígeno para prevenir la pérdida del oxígeno durante la incubación, se debe reducir el oxígeno disuelto hasta saturación a temperatura de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, agitando en una botella parcialmente llena o aireando la muestra.

8. DESARROLLO

8.1 FUNDAMENTO TECNICO:

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) es un procedimiento experimental, tipo bioensayo. Su aplicación permite calcular los efectos de los afluentes domésticos, industriales y en general residuales sobre la calidad de las aguas de los cuerpos receptores. La prueba DBO_5 estima el oxígeno gastado en la descomposición biológica actual de una muestra residual, y es efectivamente, una simulación de laboratorio del proceso microbiano de auto purificación. En una muestra de residuos se diluye una mezcla convenientemente con una población mixta apropiada de microorganismos, en un frasco hermético hasta el rebose, se mide la concentración de oxígeno disuelto, se incuba la mezcla a una temperatura ya determinada y después de cierto

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

tiempo prefijado, se mide de nuevo la concentración de oxígeno disuelto. El cambio en la cantidad de oxígeno disuelto da la cantidad de oxígeno no utilizado durante este tiempo por los microorganismos al metabolizar nutrientes de dicha cantidad de muestra de agua residual. De este resultado se calcula la cantidad de oxígeno requerido para el tratamiento similar de un volumen normal de residuos, la demanda bioquímica de oxígenos, expresada en miligramos por litro (mg/L) o partes por millón (ppm). La cantidad de nutrientes descompuestas en la prueba, por tanto la cantidad de oxígeno disuelto consumido, depende de la temperatura y de la duración de la incubación. Cuando la descomposición de los nutrientes es tan completa como se pueda obtener aeróbicamente, el oxígeno disuelto así consumido es la DBO₅ total. Sin embargo, alguna materia orgánica puede quedar, la que no es afectada por los procesos aeróbicos, pero que se presta a la descomposición anaeróbica, como la celulosa.

La descomposición completa de una muestra residual fácilmente biodegradable podría tomar varias semanas, de manera que para propósitos prácticos, se usa un periodo normal de incubación más corto, en el que tenga lugar una porción razonablemente alta de la descomposición total posible, pero que suministre todavía un resultado dentro del tiempo útil, de muestreo. Las condiciones normales aceptadas son: incubación durante 5 días a 20°C, DBO₅ que corresponde a la descomposición de la porción principal de los nutrientes carbonáceos. Como la prueba de DBO₅ es esencialmente un sistema microbiano de crecimiento, la mezcla de microorganismos debe contener tipos capaces de metabolizar las sustancias presentes en la prueba y deben suministrar un razonable balance nutricional para los microorganismos.

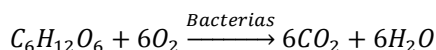
Es importante determinar la dilución correcta de la muestra de prueba, puesto que, si está demasiado concentrada, el oxígeno disuelto disponible se gastará antes de que haya transcurrido el tiempo completo de incubación. Por el contrario, si está demasiado diluida, solo se consumirá una pequeña parte de oxígeno disuelto.

La información obtenida en la prueba de la DBO₅ nos brinda una aproximación de la cantidad de materia orgánica biodegradable que se encuentra en el agua residual.

8.1.1. REACCIONES INVOLUCRADAS

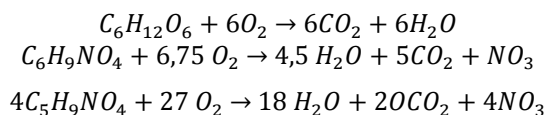
DBO₅: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

Metabolismo de sustancias orgánicas por los organismos, los microorganismos usan materia orgánica y produce H₂O, CO₂ y un residuo no biodegradable:



SOLUCIÓN DE CONTROL:

Glucosa + Acido Glutámico



Cuando se tiene un exceso de materia orgánica vertida a un cuerpo de agua, mayor será la demanda de oxígeno para su descomposición, por lo tanto, habrá una baja en el oxígeno disuelto creando condiciones en la disminución de la vida acuática.

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

Un alto valor de DBO_5 puede indicar un incremento en la microflora presente e interferir en el equilibrio de la vida acuática, favorecer el crecimiento excesivo de algas, además de ocasionar olores y sabores desagradables.

9. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

9.1. TOMA, PRESERVACIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRA

Las muestras para la determinación de DBO_5 se deben analizar con prontitud; si no es posible, refrigerarlas a una temperatura menor o igual a 6°C , ya que se pueden degradar durante el almacenamiento, dando como resultado valores bajos. Sin embargo, es necesario mantenerlas el mínimo tiempo posible en almacenamiento, incluso si se llevan a bajas temperaturas.

- Muestras simples o puntuales.** Si el análisis se inicia dentro de las 2 horas después de la recolección no es necesario refrigerarlas; después de 2 horas de la recolección de la muestra se debe mantener refrigerada a $\leq 6^\circ\text{C}$; idealmente inicie el análisis dentro de las 6 horas de la recolección; si no es posible por la distancia desde el lugar de muestreo y el laboratorio, inicie el análisis dentro de las siguientes 24 horas. El tiempo de almacenamiento recomendado es de 24 h, sin embargo, la agencia de protección ambiental de los estados unidos EPA permite almacenar hasta 48 h.
- Muestras compuestas.** El periodo límite de composición es de 24 h y se deben mantener las muestras refrigeradas a $\leq 6^\circ\text{C}$. El tiempo de almacenamiento inicia cuando termina el periodo de composición. Aplicar los mismos criterios que para las muestras puntuales.

Las muestras se rotulan en el M.EDS-04.LA.F.05 Rótulo de Muestras, mediante un código único el cual será su identificación durante su permanencia en el laboratorio de acuerdo a la información registrada en el M.EDS-04.LA.F.06 Registro de Ingreso de muestras

10. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE ANÁLISIS

10.1 Preparación del agua de dilución

Adicionar en un garrafón previamente limpio y estéril agua desionizada en cantidad suficiente para el análisis, teniendo en cuenta que el gasto aproximado es de 300 mL por botella winkler y se van a utilizar, 3 botellas para blanco, 4 botellas para cepa más agua de dilución, 3 botellas para estándar, 6 botellas para cada muestras y 1,5 L adicionales.

Chequear que el oxígeno disuelto este en 7,5 mg/L antes de iniciar el procedimiento; si no se cumple, mantener el contenido de este garrafón en aireación hasta conseguir este valor a temperatura de $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

Adicionar 1 mL por cada litro de agua desionizada de cada una de las siguientes soluciones; Solución Buffer de Fosfato, Solución de Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Solución de Cloruro de Calcio (CaCl_2), Solución de Cloruro Férrico (FeCl_3) (en el orden mencionado) para proporcionar los nutrientes y el pH adecuado para el crecimiento bacteriano dentro de las botellas; cuando se requiera, se utilizará proporcionalmente la cantidad de las soluciones comerciales buffer y de nutrientes, teniendo en cuenta disolver las sales que generalmente

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

se encuentran aglomeradas en un extremo. Confirmar la temperatura de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Si el agua de dilución muestra un consumo mayor a $0,2 \text{ mg/LO}_2$ a los cinco días se debe mejorar su calidad.

10.1.1. Preparación de diluciones

Antes de hacer las diluciones llevar las muestras a $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Las diluciones que dan lugar a un OD residual mayor de 1 mg/L y un consumo de OD de al menos 2 mg/L después de 5 días de incubación, producen los resultados más confiables. Hacer varias diluciones (al menos 3) de la muestra preparada para obtener un consumo de OD en dicho intervalo. La experimentación con una muestra concreta permite el uso de un número menor de diluciones.

Un análisis más rápido tal como la DQO, presenta una correlación aproximada con la DBO_5 y sirve como una guía para seleccionar las diluciones. En ausencia de datos previos, utilizar la **tabla 1** como referencia

Tabla 1. Guía de diluciones según el tipo de muestra y la DQO

Tipo de muestra	Diluciones (%)
Residuos Industriales fuertes	0-1
Aguas Residuales sedimentables y crudas	1-5
Efluentes tratados biológicamente	5-25
Aguas superficiales contaminadas	25-100

Las soluciones se pueden preparar usando material volumétrico clase A. El número de botellas a ser preparadas para cada dilución depende de la técnica de análisis del OD y del número de réplicas deseadas. Cuando sea necesaria la inoculación, agregar la semilla directamente a la botella winkler.

10.1.2. Llenado de Botellas

Llenar cuidadosamente las botellas con suficiente agua de dilución de modo que la inserción del tapón desplace todo el aire, sin dejar burbujas. Para evitar el intercambio de gases durante el periodo de incubación y luego de la medición de oxígeno, debe asegurarse en la botella un sello de agua.

10.1.3. Lectura del blanco

Alistar previamente tres botellas Winkler, rotular las botellas como "Blanco". Adicionar agua de dilución hasta la mitad del cuello de la botella. Leer el oxígeno inicial de los blancos, llene totalmente dejando el sello hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella y el ambiente) Lea las otras dos botellas de blancos como muestras y registre los datos en el formato de datos primarios M.EDS-04.LA.F.01 e incube a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días. Lea el Oxígeno disuelto residual de los blancos, blanco con cepa, estándares y muestras.

10.1.4. Lectura del blanco con adición de cepa (Polyseed)

Alistar cuatro botellas Winkler previamente limpias. Adicionar 15, 20, 25 y 30 mL de semilla. Adicione agua de dilución solamente hasta la mitad del cuello de la botella para que al introducir el electrodo no haya pérdida de muestra. Lea el oxígeno inicial de los blancos con adición de cepa, llene totalmente dejando el sello

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la Botella y el ambiente), registrar los datos en el Registro datos primarios ensayos fisicoquímicos (M.EDS-04.LA.F.01) e incubar a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco días. Leer el Oxígeno disuelto residual al quinto día.

10.1.5. Lectura del Estándar

Alistar tres botellas Winkler previamente limpias, seguidamente adicionar:

- 4 mL de semilla.
- 6 mL del estándar de glucosa y ácido glutámico 198 mg/L.

Por ultimo adicionar el agua de dilución solamente hasta la mitad del cuello de la botella para que al introducir el electrodo no haya pérdida de muestra. Lea el oxígeno inicial de los estándares, llene totalmente dejando el sello hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella y el ambiente). Registrar los datos en el Registro datos primarios ensayos fisicoquímicos (M.EDS-04.LA.F.01) e incubar a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco días. Leer el Oxígeno disuelto residual a los 5 días de incubación.

10.1.6. Procesamiento de la muestra

Después de establecer la cantidad de muestra que necesita de acuerdo a las diluciones a realizar, agite la muestra para homogenización completa y sirva en un vaso de precipitados la muestra, confirme que el pH de la muestra está en un intervalo de 6 a 8, de lo contrario ajuste el pH de la muestra entre 6,5 y 7,5 con ácido sulfúrico 1 N o hidróxido de sodio 1 N, según sea el caso.

Alistar seis botellas Winkler, en cada botella disponer la cantidad de muestra que se ha establecido, a continuación adicionar 4 mL de semilla, seguido de agua de dilución (tres cuartas partes de la botella) para que al introducir el electrodo no haya pérdida de muestra. Leer el oxígeno inicial de las seis botellas de muestra, llene totalmente dejando el sello Hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella y el ambiente). Registrar los datos en el formato de datos primarios, ensayos fisicoquímicos (M.EDS-04.LA.F.01) e incubar a $20^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco días. Al quinto día leer el Oxígeno disuelto residual. Calcule la DBO_5 con los resultados obtenidos.

11. CALCULOS

El cálculo para la determinación de la DBO_5 incubación 5 días (expresada en $\text{mg O}_2/\text{L}$) para control del agua de dilución y muestras que no han sido inoculadas, se basó en la siguiente expresión matemática:

$$\text{DBO}_5 \frac{\text{mg O}_2}{\text{L}} = \frac{(\text{ODi} - \text{ODf})}{P}$$

Donde:

OD_i: Oxígeno disuelto de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación mg/L

OD_f: Oxígeno disuelto de la muestra dividida después de 5 día de incubación a 20°C , mg/L

P: Fracción volumétrica decimal de la muestra empleada.

Para las muestras que cumplen con el mínimo de consumo de 2mg/L y un residual mayor a 1mg/L:

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

Sin control de inóculo

$$DBO_5 mg/L = \frac{(OD_i - OD_f) - (S)V_s}{P}$$

Dónde:

OD_i: Oxígeno disuelto inicial en la botella de la muestra, mg/L

OD_f: Oxígeno disuelto final después de 5 días de la incubación a 20°C, mg/L

S: Consumo de oxígeno por mL de semilla adicionado, Δ DO/mL semilla adicionado por botella (S=0 muestra sin semilla)

V_s: Volumen de la semilla en la respectiva botella, mL

P: Fracción Volumétrica decimal de muestra usada; 1/P factor de dilución

Si el Oxígeno disuelto (OD) disminuye 2,0 mg/L y la concentración de la muestra es 100% (no diluir excepto para semilla, nutrientes, minerales y soluciones buffer), corrección de la semilla, el agotamiento de OD puede ser reportado como el DBO₅ incluso si es menos de 2mg/L.

Con control de inóculo

$$DBO_5 mg/L = \frac{(D_i - D_f) - f(BI_1 - BI_2)}{P}$$

En donde:

D_i: Oxígeno disuelto inicial en la botella de la muestra, mg/L

D_f: Oxígeno disuelto final después de 5 días de la incubación a 20°C, mg/L

P: Fracción Volumétrica decimal de muestra usada, 1/P factor de dilución

f: Relación de la semilla en la muestra/ relación semilla en control de inóculo

BI₁: Oxígeno disuelto inicial del control inóculo, mg/L

BI₂: Oxígeno disuelto en la botella del control inóculo al final de la incubación, mg/L.

Con polyseed

$$DBO_5 mg/L = \frac{(D_i - D_f) - f}{P}$$

En donde:

D_i: Oxígeno disuelto inicial en la botella de la muestra, mg/L

D_f: Oxígeno disuelto final después de 5 días de la incubación a 20°C, mg/L

P: Fracción Volumétrica decimal de muestra usada, 1/P factor de dilución

f: Factor de control de la semilla

NOTA

Sí el consumo de OD es menor a 2 mg/L y la muestra no tiene dilución (aunque tenga inóculo y soluciones) el consumo real corregido por el factor de la semilla puede ser reportado el valor de DBO aun estando por debajo de 2 mg/L.

INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN EL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

Cuando todas las diluciones resultan con un oxígeno residual menor a 1mg/L seleccionar la botella que tiene el valor más alto de oxígeno disuelto (usualmente la mayor dilución) y reportar.

Toda la información referente a la prueba se registra en el M.EDS-04.LA.F.01 Registro datos primarios ensayos fisicoquímicos

12. CRITERIOS DE ACEPTACION Y RECHAZO

Para aquellos valores que sean inferiores al Límite de cuantificación de método se informara “<LCM mg/L” (valor definido en la comprobación del método). La dirección técnica del laboratorio revisa la información consignada en los registros y autoriza para el procesamiento de informes.

Con cada lote de muestras se deben realizar los siguientes controles:

- Mínimo residual de OD y mínimo consumo de OD: Todas las botellas, incluyendo los controles de la semilla, deben presentar un consumo mínimo de OD de 2 mg/L y un residual de OD de al menos 1.0 mg/L después de 5 días de incubación para que sean considerados datos válidos
- Control de glucosa – ácido glutámico: el control de glucosa – ácido glutámico es la base para establecer la precisión y exactitud del método y es el principal control de la calidad de la semilla y del procedimiento en general. El resultado del promedio de las 3 botellas con estándar debe ser 198 mg O₂/L ± 30.5 mg/L. Si el valor no se encuentra en este rango, se deben evaluar las causas y hacer las correcciones pertinentes
- Control de agua de dilución: el OD consumido por el agua de dilución debe ser menor de 0,2 mg/L. Si el agua de dilución excede este valor, se debe identificar claramente cuál es la causa de esta situación.
- Control de la semilla: Para determinar el factor o consumo de la semilla, se deben realizar 4 siembras con diferentes volúmenes de semilla de 15 mL, 20 mL, 25 mL y 30 mL. Determinar el OD inicial y después de 5 días el OD final. Con estos datos se calcula el factor de la semilla, el cual debe estar entre 0,6 y 1,0 mg/L y se calcula de la siguiente manera:

$$f = \frac{DBO * V_{semilla}}{300}$$

Donde:

f = Factor de la semilla

DBO = Demanda Biológica de oxígeno de cada dilución de la semilla

$V_{semilla}$ = Volumen de semilla usado en las muestras

- La diferencia de las réplicas que produjeron resultados válidos (consumo de oxígeno mínimo de 2 mg/L y OD final superior a 1 mg/L), no debe superar el 30%

Los analistas evaluarán los resultados y tendencias de los patrones, diluciones y blancos y en caso de que alguna situación lo amerite se avisara a la dirección técnica quien documentará y tomará las medidas que sean necesarias, tal como se establece en el instructivo de Aseguramiento de la calidad (M.EDS-04.LA.INT.14)

13. FORMATOS PARA REGISTRO DEL PROCESO ANALITICO Y DE LOS RESULTADOS

M.EDS-04.LA.F.01 Registro datos primarios ensayos fisicoquímicos

M.EDS-04.LA.F.03 Preparación de reactivos

**INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO EN EL
LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO**

M.EDS-04.LA.F.05 Rótulo de Muestras

M.EDS-04.LA.F.06 Registro de Ingreso de muestras

Calculador de POD Polyssed

Elaboró: Luis Alfonso Salazar Guerrero – Analista Laboratorio de Aguas	Revisó: Lina Marcela León Gallón- Dirección técnica laboratorio aguas Diana Milena Cardona Lindo- Profesional Acreditación de laboratorios	Aprobó: Luis Fernando Polanía Obando – Vicerrector de Extensión y desarrollo Social
Fecha: 2019/11/01	Fecha: 2020/02/14	Fecha: 2020/02/20