 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 1 de 15

1. OBJETIVO

Establecer la metodología para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno durante cinco días por el Método de electrodo de membrana (electrometría). SM 5210B.

2. ALCANCE


Este método es aplicable a aguas residuales, efluentes y aguas contaminadas.

Esta técnica se aplica en el Laboratorio de Calidad Ambiental para el recurso hídrico superficial. No se hace uso de inhibidor en la técnica; el intervalo empleado es de 2 hasta 5000 mg O₂/L.

La técnica de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), es una prueba experimental utilizada para determinar las necesidades de oxígeno de las aguas residuales, efluentes y aguas contaminadas. La prueba mide el oxígeno molecular utilizado durante un período de incubación específico para la degradación bioquímica de la materia orgánica (demanda carbonosa) y el oxígeno utilizado para oxidar material inorgánico tal como sulfuros y hierro ferroso. También puede medir la cantidad de oxígeno usado para oxidar formas reducidas de nitrógeno (demanda nitrogenada) a menos que su oxidación sea impedida por un inhibidor.

Los procedimientos de siembra y dilución proporcionan una estimación de la DBO₅ a pH de 6,5 a 7,5 , con temperatura de incubación de 20 °C ± 1.0 °C, permitiendo determinar la concentración de oxígeno molecular utilizado durante un periodo de incubación de cinco días, para la degradación bioquímica de la materia orgánica.

La DBO₅, como todo ensayo biológico, requiere cuidado especial en su realización, así como conocimiento de las características esenciales que deben cumplirse, con el fin de obtener valores representativos y confiables. El ensayo supone la medida de la cantidad de oxígeno consumido por organismos vivos en la utilización de la materia orgánica presente en un residuo; por tanto, es necesario que durante todo el período de ensayo exista suficiente oxígeno disuelto para ser utilizado por los organismos; se debe garantizar las condiciones ambientales adecuadas para el metabolismo de los microorganismos, de la misma manera los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, tales como nitrógeno y fósforo, y una población de organismos suficiente en cantidad y en variedad de especies y la eliminación de cualquier sustancia toxica de la muestra.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-1025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 2 de 15


Los siguientes son los resultados obtenidos en la validación del método:

Tabla 1. DATOS VALIDACIÓN DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

DETERMINACIÓN BIOQUÍMICA DE OXÍGENO.DBO ₅			
NOMBRE DEL METODO:			
PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACIÓN
LIMITE DE DETECCION	2	mg O ₂ / L	Corresponde al límite de cuantificación.
PRECISION EN TÉRMINOS DE %CV	1.60	%	Para estándar 2.0 mg O ₂ /L
	2.43	%	Para estándar 5000 mg O ₂ /L
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	-1.36	%	Para estándar 2.0 mg O ₂ /L
	8.04	%	Para estándar 5000 mg O ₂ /L
RANGO DE TRABAJO (Lectura Directa)	N-A		Sin dilución de la muestra
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	2 - 5000	mgO ₂ /L	Con la mayor dilución posible o aceptable.
RECUPERACION EXPRESADO COMO %	103	%	Para M ₁ Ab 200 mg O/L
	104	%	Para M ₁ Aa 600 mg O/L

3. DEFINICIONES

- SM: Estándar método.
- LDM: Limite de detección del Método.
- Blanco de reactivos o Blanco de Método (MB): Agua ultra pura que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos solventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra.
- OD: Oxígeno disuelto.
- ODi: Oxígeno disuelto inicial.
- ODr: Oxígeno disuelto residual.
- DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno, prueba empírica, que se usa para determinar los requerimientos de Oxígeno en la degradación bioquímica de la materia orgánica, por una población microbiana heterogénea en sus procesos metabólicos, en un período de 5 días y una temperatura de incubación de 20°C ± 1.0 °C.
- Botellas Winkler: son botellas de incubación para la DBO₅, de 300 ml, de capacidad con tapa hermética, la cual evita el ingreso de oxígeno al recipiente.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 3 de 15

- **Aguas Superficiales:** son aguas expuestas a la atmosfera. Pueden ser corrientes que se mueven en una misma dirección y circulan continuamente sobre la superficie de la tierra, como los ríos, manantiales, arroyos, o bien estancadas como los lagos, lagunas, charcas, humedales y pantanos. El agua superficial es la proveniente de las precipitaciones.
- **Cepa:** microorganismos vivos que se han adaptado para reproducirse en un medio específico. También son denominados semilla o inóculo, transforma la materia orgánica en CO₂ y H₂O.
- **Cepa liofilizada (Polyseed):** cultivo microbiológico específico comercial, utilizado como cepa en la prueba de demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), para la degradación de residuos.
- **Tampón o solución buffer:** solución con un pH definido y estable que permite regular el pH.
- **Oxímetro:** indicador de oxígeno, que mide las concentraciones de oxígeno en mg/L su sensor es un electrodo que contiene una membrana permeable específica para la determinación de oxígeno.
- **LSA = Límite superior de alarma.**
- **LSC = Límite superior de control.**
- **LIA = Límite inferior de alarma.**
- **LIC = Límite inferior de control.**

4. ASPECTOS DE SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO

Antes de iniciar el análisis químico, revisar el Manual de Higiene, Salud Ocupacional y Seguridad en el Laboratorio y las hojas de Seguridad que reposan en el mueble ubicadas a la entrada; en el área de recepción de muestras.

Utilizar los implementos de seguridad, en la preparación de reactivos. En esta técnica son: bata, pantalón, zapatos antideslizantes, gafas de seguridad, máscara con filtro para vapores ácidos y guantes de nitrilo.


Los residuos producto del análisis de la determinación, se tratan de acuerdo al documento disposición de muestras y residuos de análisis, Disposición final de residuos

5. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Antes de operar los equipos verifique que se encuentran en óptimas condiciones siguiendo los instructivos de manejo de equipos y realizando las verificaciones indicadas al respecto como lo indica el instructivo de cada equipo. Diligencie el formato de control diario de manejo del equipo; formato M-S-LC-F007.

5.1 Equipos

- Balanza analítica de cuatro cifras decimales.
- Estufa a 103 ± 1 °C.
- Medidor de oxígeno .Ver Manual de instrucciones de operación del medidor de oxígeno.
- Incubadora con temperatura controlada 20°C ± 1°C.
- pH metro.
- Aireador de acuario.
- Plancha de agitación.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 4 de 15

5.2 Materiales

- Micro –espátula metálica.
- Balón aforado de vidrio clase A de 1L, con tapa esmerilada.
- Pipetas aforadas de vidrio de 1, 2, 3, 5, 6, 10, 20, 50 mL clase A.
- Pipetas graduadas 10 mL, 20 mL.
- Probetas 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL.
- Pera de succión.
- Vasos de precipitados de 10, 50 y 100 mL.
- Botellas Winkler de aproximadamente 300 mL de capacidad
- Garrafa de 20 L de capacidad con llave.
- Agitador magnético.
- Barra agitadora.

5.3 Reactivos

Solicite los reactivos y material diligenciando el formato correspondiente. Preparare los reactivos con anterioridad, descarte si observa algún signo de precipitación o crecimiento biológico en las botellas de los reactivos.

Utilizar reactivos de alta pureza que sean de grado analítico.

Solución tampón de fosfato

Disuelva 4,25 g de KH_2PO_4 , 10,875 g de K_2HPO_4 , 16,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 0,85 g de NH_4Cl en aproximadamente 250 mL de agua ultra-pura y lleve a volumen de 500 mL. El pH del buffer preparado debe ser 7,2 sin ajuste adicional. Alternativamente, se disuelven 42,5 g KH_2PO_4 y 1,7 g de NH_4Cl en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 con NaOH al 30% y diluir a 1 L. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descarte este reactivo.


Solución de sulfato de magnesio

Disuelva 11,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua ultra-pura y lleve a volumen de 500mL. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descarte este reactivo.

Solución de cloruro de calcio

Disuelva 13,75 g de CaCl_2 en 250 mL de agua ultra-pura y lleve a volumen de 500mL. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descarte este reactivo.

Solución de cloruro de hierro (III)

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 5 de 15

Disuelva 0,25g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua ultra-pura, lleve a volumen de 1L. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descarte este reactivo.

Solución de cloruro de amonio

Se disuelve 1,15 g de NH_4Cl en aproximadamente 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7,2 con NaOH y diluir a 1 L. La solución contiene 0,3 mg N / mL.

Ácido Sulfúrico 1 N

En un vaso de precipitados coloque alrededor de 300 mL de agua ultra-pura y agregue muy lentamente y mientras agita, 28 mL de ácido sulfúrico concentrado; diluya a 1 L. Para la solución de trabajo, prepare una solución al 0.1 N.

Hidróxido de Sodio 1 N

Disuelva 40g de hidróxido de sodio en agua ultra-pura y diluya a 1 L.

Reactivo declorador

Solución de Sulfuro de sodio: Disolver 1,575 g de Na_2SO_3 en 1.000 ml de agua destilada. Esta solución no es estable; preparar a diario. (Este reactivo se utiliza para eliminar las interferencias en muestras que se encuentran cloradas).

Agua de fuente para preparar agua de dilución de DBO


Utilice agua ultra pura tipo I para hacer diluciones de muestra.

5.3.1 Preparación de la Solución Estándar

En un vaso de precipitados coloque $\approx 1\text{g}$ de ácido glutámico y en otro $\approx 1\text{g}$ de glucosa seque durante una hora en el horno a 103 ± 1 °C. Deje enfriar dentro del desecador, hasta temperatura ambiente. En un vaso de precipitado pequeño pese 0,1500 gramos de ácido glutámico y en otro 0,1500 gramos de glucosa. Disuelva con agitación. Coloque 200 mL de agua ultra-pura en un balón aforado de 1 litro, transfiera cuantitativamente los 0,1500 g de ácido glutámico disuelto, enjuague varias veces el vaso que lo contiene. Transfiera cuantitativamente los 0,1500 g de glucosa disuelta, enjuague varias veces el vaso que lo contiene. Lleve a volumen de 1 L con agua ultra-pura. Homogenice invirtiendo el balón varias veces. Esta solución se debe utilizar justo después de su preparación, no es recomendable su almacenamiento; a menos que la solución se mantenga en un estado estéril. Guarde todas las mezclas de glucosa-ácido glutámico a 4°C o menos.

5.3.2 Preparación de la Cepa:

Cepa Liofilizada Polyseed: es la más adecuada para la siembra. Se pesa la cantidad correspondiente y un excedente de cepa liofilizada dependiendo del número de botellas a inocular (el excedente de cepa, es para prever posteriores diluciones, a criterio del analista) (tabla No. 2). La cepa se prepara con agua de dilución y se debe colocar en agitación muy suave y aireación como mínimo por 1 hora antes de realizar la siembra; (se puede preparar con el agua de dilución previamente aireada) para mejores resultados la cepa debe usarse entre las

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 6 de 15

seis (6) horas de rehidratación. Se deja en reposo por lo menos durante 15 minutos para que se decanten las partículas combinadas con los microorganismos y posteriormente se transfieren 6 mL del sobrenadante de la cepa a cada botella Winkler.

Tabla 2. PESO A UTILIZAR DE LA CEPA SEGÚN EL VOLUMEN REQUERIDO

Masa Cepa g	Volumen Agua de Dilución mL	Masa Cepa g	Volumen Agua de Dilución mL	Masa Cepa g	Volumen Agua de Dilución mL
0,010	26	0,031	81	0,052	136
0,011	29	0,032	83	0,053	138
0,012	31	0,033	86	0,054	141
0,013	34	0,034	89	0,055	143
0,014	37	0,035	91	0,056	146
0,015	39	0,036	94	0,057	149
0,016	42	0,037	97	0,058	151
0,017	44	0,038	99	0,059	154
0,018	47	0,039	102	0,06	157
0,019	50	0,04	104	0,061	159
0,020	52	0,041	107	0,062	162
0,021	55	0,042	110	0,063	164
0,022	57	0,043	112	0,064	167
0,023	60	0,044	115	0,065	170
0,024	63	0,045	117	0,066	172
0,025	65	0,046	120	0,067	175
0,026	68	0,047	123	0,068	177
0,027	70	0,048	125	0,069	180
0,028	73	0,049	128	0,07	183
0,029	76	0,05	130	0,071	185
0,030	78	0,051	133	0,072	188

Tabla 2. Relación de la cantidad de cepa para diferentes volúmenes requeridos en el análisis. Para estimar el volumen de cepa Requerido, se multiplica el volumen que se adiciona a cada botella (6 mL) por el número total de botellas requeridas en el análisis: tres Botellas del blanco con adición de cepa, tres botellas de los estándares y el número de botellas que sean necesarias para preparar las Diluciones de cada una de las muestras.

5.3.3 Preparación del Agua de Dilución:

- Llene la garrafa con agua ultra Pura, la necesaria 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, 3 botellas para cepa más agua de dilución, 3 botellas para el estándar, entre 3 y 5 botellas para cada una de las muestras, agregue 2 L de agua adicional.
- Verifique que la temperatura del agua de dilución se encuentre entre $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Por cada litro de agua agregar 1 mL de cada una de las siguientes soluciones: tampón fosfato, MgSO_4 , CaCl_2 , y FeCl_3 . Mezclar bien y llevar la temperatura a $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- Airee el agua por dos horas mínimo, para que la concentración de oxígeno se acerque al punto de saturación, utilizando la bomba de los acuarios, que se encuentra disponible en el lugar de trabajo. Verifique que las mangueras estén en buen estado de limpieza, libres de crecimiento microbiano.
- El agua utilizada debe estar libre de materia orgánica, de microorganismos y de metales pesados en particular cobre o cloro, que pueden interferir con las mediciones de DBO₅.
- Verifique que la temperatura del agua de dilución sea de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, midiéndola con el Oxímetro.
- Cuando el agua de dilución esté lo suficientemente saturada, calibre el Oxímetro de acuerdo al Instructivo de manejo de equipo, tenga en cuenta la temperatura y la altitud del laboratorio para reportar el porcentaje de saturación del Oxímetro. Recuerde que al quinto día se debe volver a calibrar el equipo con agua saturada por medio de aireación con la bomba de acuario.

6. 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, peróxido, cloro. Al momento no existe una forma de corregir o ajustar los efectos de estos factores.


Muestras que contienen cloro residual o metales tóxicos no permiten el desarrollo de bacterias que degradan la materia orgánica.

Muestras de aguas provenientes de lugares fríos o con alta producción de fotosíntesis pueden causar niveles de oxígeno iniciales súper saturados que pueden interferir con el valor obtenido de la DBO₅. Para evitar la pérdida de oxígeno durante la incubación de tales muestras, reducir el DO de la saturación llevando la muestra a aproximadamente 20°C en botella parcialmente llena mientras se agitar vigorosamente o aireando con aire comprimido limpio y filtrado.

El peróxido de hidrógeno que permanece en muestras de algunos procesos de blanqueo industrial tales como los utilizados en fábricas de papel y plantas textiles puede causar niveles de oxígeno súper-saturado en muestras recogidas para pruebas de DBO. Mezclar estas muestras vigorosamente en recipientes abiertos durante un tiempo suficiente para permitir que el peróxido de hidrógeno se disipe antes de realizar las pruebas de DBO. Compruebe la suficiencia de la eliminación de peróxido observando las concentraciones de oxígeno disuelto con el tiempo durante el mezclado. Los tiempos de mezcla pueden variar de 1 a 2 h dependiendo de la cantidad de peróxido de hidrógeno presente. La reacción de peróxido puede considerarse completa cuando el OD ya no aumenta durante un período de 30 minutos sin mezclarse.

Las muestras que contienen sustancias tóxicas, contienen metales tóxicos. Tales muestras a menudo requieren estudio y tratamiento especial.

Si el agua de dilución es de baja calidad, su DBO₅ aparecerá como DBO₅ de la muestra, efecto que será amplificado por el factor de dilución, y el resultado tendrá una desviación positiva. La fuente del agua de dilución puede contener amoníaco o compuestos orgánicos volátiles. El agua desionizada también puede estar contaminada con compuestos orgánicos solubles lixiviados del lecho de la resina; el uso de destiladores con conductos o accesorios de cobre pueden producir agua con cantidades excesivas de cobre, que alteran el crecimiento de los organismos, y actúan como biocida.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 8 de 15

DBO carbonácea y DBO nitrogenácea: La oxidación de las formas reducidas del nitrógeno como amoníaco y nitrógeno orgánico, realizada por los microorganismos, ejercen una demanda nitrogenácea, que ha sido considerada como una interferencia en la prueba; sin embargo, esta puede ser eliminada con la adición de inhibidores químicos. Cuando se inhiba la demanda nitrogenácea de oxígeno, se deben reportar los resultados como demanda bioquímica de oxígeno carbonácea (DBOC₅); cuando no se inhiba, se deben reportar los resultados como DBO₅. Los resultados se reportan como DBO₅ debido a que no se adiciona inhibidor de nitrificación.

Muestras con Cloro residual: Evitar las muestras que contengan cloro residual; tomarlas antes del proceso de cloración; en algunas muestras, el Cloro se elimina si se dejan 1 o 2 horas a la luz, lo cual puede suceder durante el transporte y manejo de la muestra. Para muestras en las cuales el Cloro residual no se disipa en un tiempo razonablemente corto, eliminar éste por adición de solución de Tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃.5H₂O). ¹Utilice 1ml de Tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃.5H₂O) para eliminar 1mg de cloro residual en 500ml de muestra. Disuelva 1,750g de tiosulfato de sodio en agua y lleve a volumen en balón aforado de 500mL. Prepárese semanalmente, (Utilice 1 ml de reactivo para eliminar 1 mg / L de cloro residual por cada 500mL de muestra clorada se debe agitar y se deja en reposo 30 minutos).

El exceso de Na₂SO₃ o de Na₂S₂O₃.5H₂O como agentes decloradores ejerce una demanda de oxígeno.

7. CONTROL Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Las prácticas de control de calidad se consideran parte integrante de cada método, para este método se incluye la siguiente tabla.

Tabla 3. CONTROL DE CALIDAD MÉTODO 5210B.


Blanco del Método (MB)	Blanco fortificado en laboratorio (LFB)	(LFMD) Duplicado matriz fortificada en laboratorio	Otros
-	-	-	1,2,3

Tomado del SM Tabla 5020: I. (- indica que un tipo de control de calidad no es obligatorio para el método) (1.Pautas adicionales de control de calidad en el método) (2. Se ejecutarán duplicados de la muestra) (3.Consulte 5020B del SM para más Requisitos de control de calidad).

- Utilizar material de vidrio al cual se le ha realizado el control de calidad.
- Realizar controles de calibración al Medidor de oxígeno, antes de realizar el análisis. Tenga en cuenta la temperatura y la altitud del laboratorio para la correcta calibración y verificación del medidor de oxígeno; reporte el porcentaje de saturación del oxímetro. Ver instrucciones de manejo del equipo. Estos controles son necesarios para asegurar las lecturas del oxígeno disuelto.
- Efectúe el análisis dentro de las 24 horas siguientes a la toma de la muestra.

¹ Agente declorador: referenciado en el Standard methods for the examination of water and wastewater 22 st edition pág 4 (4500 – NH₃ 3d)

- En forma paralela, con cada grupo o lote de muestras, es necesario procesar en un mismo día, un estándar por triplicado. Registre los resultados en la carta de control de la técnica analítica.
- Tome en cuenta los siguientes aspectos a la hora de reportar los análisis:
- El oxígeno disuelto de agotamiento debe ser mínimo 2 mg/ L y el oxígeno disuelto residual debe ser de al menos 1 mg/L después de 5 días de incubación para producir datos válidos.
- Verificación ácido glutámico y glucosa: la comprobación de glucosa-ácido glutámico es la base principal para el establecimiento de la exactitud y precisión de la prueba de DBO y es la principal medida de la calidad de la semilla. Se procede como indica el numeral de preparación de solución estándar y se siembra como se indica para la verificación de la solución estándar. La precisión y desviación en la DBO resulta de promediar las tres botellas, después de la corrección para dilución y siembra, esta se debe encontrar en el rango de $198 \pm 30,5$ mg/L si el valor promedio cae fuera de este rango, se deben evaluar la causa y hacer las correcciones apropiadas. Los valores altos pueden indicar el uso de un exceso de suspensión de semillas, agua de dilución contaminada, o la aparición de nitrificación. Valores bajos pueden indicar baja calidad de la semilla, cantidad no adecuada de la semilla o la presencia de un material tóxico. Si los valores bajos persisten, preparar una nueva mezcla de glucosa y ácido glutámico y comprobar las fuentes de agua de dilución y la fuente de semilla.
- Verificación de la calidad del agua: el agua de dilución contiene nutrientes, minerales y soluciones también pero sin semilla, Este blanco de agua de dilución sirve como un control de calidad del agua, la absorción de OD en 5 días no debe ser más de 0,20 mg / L y preferiblemente no más de 0,10 mg / L, antes de realizar correcciones de semillas. Si el blanco de agua de dilución es superior a 0,20 mg / L, desechar todos los datos para las pruebas que utilizan esta agua de dilución o claramente identificar dichas muestras.
- Control de la semilla: hacer tres diluciones de semilla de tal manera que la cantidad más pequeña de por lo menos 2,0 mg/L de OD de agotamiento y los mayores resultados de cantidad en al menos 1,0 mg /L de OD residual después de 5 días de incubación. Determinar la absorción de OD por mililitro de semilla añadió a cada botella, utilizando el método de la pendiente o el método de relación. Para el método de la pendiente, graficar el OD de agotamiento en miligramos por litro frente a mililitros de semilla para todas las botellas de control de semilla que tienen un agotamiento de 2,0 mg/L y 1,0 mg/L mínimo de OD residual. El grafico debería presentar una línea recta donde la pendiente indica el agotamiento del OD por mililitro de semilla.
- El consumo de oxígeno disuelto en los cinco días para los blancos sin cepa debe ser < 0.2 mg/L.
- El consumo de oxígeno disuelto para el agua de dilución con cepa debe estar entre 0,6 – 1,0 mg/L, la cantidad de semilla añadida debe ser ajustada para proporcionar resultados en la verificación de glucosa-ácido glutámico de $198 \pm 30,5$ mg / L.
- Los resultados obtenidos para las diferentes diluciones pueden ser promediados si se cumple con los requisitos de valores de OD residual de mínimo 1 mg/L y un consumo de OD de por lo menos 2 mg/L después de 5 días de incubación. Este promedio se puede hacer si no hay evidencia de alguna alteración detectable. Muestras que presentan una diferencia del 30% entre el valor mayor y el menor de DBO5 pueden indicar problemas analíticos, debido a la presencia de sustancias tóxicas.
- Cuando todas las diluciones dan como resultado un oxígeno disuelto residual menor a uno ($OD < 1,0$) seleccione la botella con mayor dilución y reporte.
- El estándar debe encontrarse en 198 ± 30 mg/L.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 10 de 15

- El resultado de la DBO₅ se reporta con números enteros, si el resultado es menor a 2 se reporta como < 2 mgO₂/L.

8. DESARROLLO

8.1 Principio del Método.

El método consiste en llenar con muestra diluida y sembrada, hasta el borde de una botella hermética de tamaño de 300 mL e incubarla a la temperatura de 20°C±1°C durante 5 días. El oxígeno disuelto se mide inicialmente y después de la incubación realizada por 5 días, la DBO se calcula a partir de la diferencia entre DO inicial y final. Debido a que la DO inicial se determina poco después de que se hace la dilución, toda la captación de oxígeno que ocurre después de esta medición se incluye en la medición de DBO durante 5 días.

8.2 Toma y Preservación de Muestras.

Tome la muestra de tal manera que sea representativa del vertimiento en estudio. Utilice frascos plásticos de polipropileno de 2000 mL de capacidad. Refrigere la muestra a 4°C hasta el momento del análisis. Lleve las muestras a temperatura ambiente. Efectúe el análisis dentro de las 24 horas siguientes a la toma de la muestra. Las muestras para el análisis de DBO₅ pueden degradarse significativamente durante el almacenamiento entre la recolección y el análisis, resultando en bajos valores de DBO₅.

Si el análisis se inicia dentro de las 2 h de la recolección, el almacenamiento en frío es innecesario. Si el análisis no se inicia dentro de las 2 h de la recolección de la muestra, mantener la muestra a 4 °C o menos desde el momento de la recogida. Comenzar el análisis dentro de las 6 h de la recolección; Cuando esto no es posible porque el lugar de muestreo está alejado del laboratorio, almacenar a 4°C o menos e informar.

8.3 Limpieza de Vidriería y Material de Campo.


Remítase al instructivo lavado material de vidrio. Utilice la vidriería a la que se le haya efectuado control de calidad y reserve esta vidriería únicamente para las determinaciones de la Demanda Bioquímica de Oxígeno. La garrafa donde se prepara el agua de dilución debe lavarse antes y después de su uso con agua caliente, varias veces y enjuagar varias veces con agua ultra pura, recoger el agua para el análisis. No aplicar jabón para el lavado.

8.4 Ejecución de la Técnica.

- Antes de iniciar las lecturas, tenga en cuenta el instructivo de manejo del medidor de oxígeno.
- Realice la verificación del Oxímetro y reporte el dato en el formato de captura de datos M-S-LC-F013 Solicite las muestras mediante el formato M-S-LC-F011 deje aclimatar la muestra a 20°C±3°C.

8.4.1 Siembra del Blanco

Aliste tres botellas Winkler, rotúlelas como “Blanco” y escriba la fecha de la siembra en la botella. Adicione agua de dilución y realice la lectura de OD inicial y temperatura. Llène totalmente la botella, evitando la formación de burbujas, deje el sello hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella y el ambiente), recubra el sello con plástico o papel aluminio, para reducir la evaporación del sello

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 11 de 15

de agua durante la incubación. Registre los datos en el formato M-S-LC-F013 e incube a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días. Al quinto día lea el Oxígeno disuelto residual (ODr).

8.4.2 Siembra del blanco con adición de cepa

Aliste tres botellas Winkler, rotúlelas como “Blanco + cepa” y escriba la fecha de la siembra en la botella. Adicione 6 mL de cepa liofilizada. Para servir la cepa utilice una pipeta de punta ancha para evitar obstrucción. NO realice esta adición si se preparó el agua de dilución con la cepa.

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 (ODi). Llene totalmente la botella, evitando la formación de burbujas, deje el sello hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella y el ambiente), recubra el sello con plástico o papel aluminio, para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación. Registre los datos en el formato M-S-LC-F013 e incube a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días. Al quinto día lea el Oxígeno disuelto residual (ODr).

8.4.3 Siembra del Estándar

Aliste tres botellas Winkler, rotúlelas como Estándar, y escriba la fecha de la siembra en la botella.

Adicione 6 mL de cepa liofilizada. Para servir la cepa utilice una pipeta de punta ancha para evitar obstrucción. No realice esta adición si se preparó el agua de dilución con la cepa. Adicione 6 mL del estándar. 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 estándares (ODi). Llene totalmente la botella, evitando la formación de burbujas, deje el sello hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella y el ambiente), recubra el sello con plástico o con papel aluminio, para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación. Registre los datos en el formato M-S-LC-F013 e incube a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días. Al quinto día lea el Oxígeno disuelto residual (ODr).


8.4.4 Siembra de la Muestra

Para estimar la dilución de la muestra, se debe tener en cuenta el oxígeno disuelto medido en campo, este parámetro ayuda a determinar las diluciones que se deben realizar. En la tabla 4 se muestran los volúmenes de muestra a tomar según el tipo de matriz.

Tabla 4. VOLUMEN SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

Tipo de muestra	Volumen de muestra (mL)	Porcentaje
Residuales industriales fuertes.	0,1 -0,3	0,01%- 1%
Residuales residuales crudas y asentadas.	3 - 15	1% -5%
Efluentes tratados biológicamente.	15 - 75	5% -25%
Aguas contaminadas de los ríos.	75 - 300	25% -100%

Tomado del SM 5210 B. Prueba de DBO de 5 días (numeral 5-c).

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 12 de 15


La muestra antes de sembrarse debe pasar por el siguiente proceso:

- Ajuste la temperatura de la muestra a $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Establezca la cantidad de muestra que necesita de acuerdo a las diluciones a realizar. Agite suavemente la muestra para homogenización completa y sirva en un vaso de precipitados.
- Compruebe que el pH de la muestra esté entre 6 y 8, de no ser así ajústelo entre 7,0 y 7,2 con ácido sulfúrico 0.1 N o hidróxido de sodio 0.1 N, según sea el caso, dosificando estos reactivos con una pipeta Pasteur.
- Si la muestra presenta cloro residual disípelo de 1 a 2 horas en la luz, si esto no da resultado adicione una solución de Na_2SO_3 , como agente de cloro.
- Las muestras sobresaturadas con oxígeno disuelto se deben ajustar a temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, y agitar vigorosamente en una botella o aireando con aire comprimido filtrado y limpio. Para prevenir pérdidas de oxígeno durante la incubación.
- Aliste las botellas Winkler necesarias, entre 3 y 5 para cada una de las muestras. Rotule las botellas con el número de muestra y volumen correspondiente. Adicione a cada botella la cantidad de muestra que se ha establecido para la dilución. Si se requiere hacer dilución adicional, realícela en un balón aforado, agite y sirva en la botella la cantidad requerida. Registre en el formato M-S-LC-F013 la dilución o volumen de muestra utilizada.
- Si el volumen de la muestra corresponde a más del 67% del volumen de la botella (200 mL), los nutrientes pueden ser limitados en la muestra diluida y, posteriormente, reducir la actividad biológica. En este caso, adicione directamente los nutrientes a la botella Winkler a razón de 1 mL/L, es decir 0,3 mL de cada uno de los nutrientes (para las botellas de 300 mL).
- Adicione 6 mL de cepa liofilizada. Para servir la cepa utilice una pipeta de punta ancha para evitar obstrucción. No realice esta adición si se preparó el agua de dilución con la cepa.
- Adicione agua 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 las botellas de muestra (ODi). Si al medir el oxígeno disuelto inicial, ha descendido a menos de 6 mg/L, preparar otra botella utilizando un volumen de muestra menor.
- Llene totalmente la botella, evitando la formación de burbujas, deje el sello hidráulico (pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella y el ambiente), recubra el sello con plástico o papel aluminio. Registre los datos en el formato correspondiente e incube a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días. Al quinto día lea el Oxígeno disuelto residual (ODr). Calcule la DBO_5 con los resultados obtenidos.

Una vez finalizada la marcha analítica, al quinto día. Registre los valores de los controles analíticos en el formato cartas de control, y diligencie el formato recepción de muestras y control de análisis M-S-LC-F002, deposite los residuos en la caneca correspondiente, solicite el lavado de material, diligenciando el formato de solicitud M-S-LC-F003.

8.5 Cálculos y Resultados

El cálculo se realiza con las botellas que cumplan con: consumo de OD mayor o igual a 2 mg/L y OD residual mayor o igual a 1.0 mg/L. Efectúe los cálculos por medio de la ecuación:

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO 5 DÍAS, INCUBACIÓN Y ELECTROMETRÍA. SM 5210B.	Código: M-S-LC-I025
		Versión : 01
		Fecha:14/12/2017
		Página: 13 de 15

$$DBO_5 \text{ (mgO}_2\text{/L)} = \frac{(\text{OD Consumido} - \text{OD Consumo cepa}) * V}{V_m}$$

Dónde:

OD consumido: ODi – ODr (oxígeno disuelto inicial menos el oxígeno disuelto residual).

OD consumo cepa: ODi (agua de dilución + cepa) – ODr (agua de dilución + cepa)

V = Volumen de la botella Winkler, de 300mL.

V_m = Volumen de alícuota de la muestra.

Cuando todas las diluciones den como resultado un OD residual de <1.0 mg/L, seleccione la botella que tiene la más baja concentración de oxígeno disuelto (mayor dilución – alícuota más representativa), para realizar el cálculo y reporte el dato.

9. DIAGRAMA

Ver anexo 1

10. DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y BIBLIOGRAFÍA

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 5210 B. 22ed., New York, 2012. Capitulo 5210B.
- Polyseed Application Procedure BOD₅ Seed Inoculum. www.polyseed.com
- Instructivo Lavado material de vidrio.
- Disposición final de residuos..
- Manual de Higiene, Salud Ocupacional y Seguridad en el Laboratorio.
- Aseguramiento de calidad.
- Verificación y auditoria de datos analíticos
- Lineamientos de control de calidad analítica

11. HISTORIAL DE CAMBIOS

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
01	14/12/2017	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI.

ELABORO: Luz Adriana Ruiz Araujo Contratista Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	REVISO: Carlos M. Velásquez Ramírez Contratista Líder Técnico Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	APROBO: Nelson Omar Vargas Martínez Subdirector de Hidrología
--	---	---



ANEXO 1. Diagrama

