1. Objeto.

Determinar la demanda bioquímica de oxígeno en una muestra de agua para establecer su grado de contaminación por materia biológica, según la norma SM 5210 B Método de sonda óptica, según la norma SM 4500-O H, asegurando la entrega oportuna de resultados confiables a nuestros clientes y su satisfacción en la prestación del servicio.

2. Alcance.

Este instructivo aplica para el análisis de aguas residuales no domésticas, aguas residuales domésticas, aguas subterráneas, aguas superficiales.

3. Referencias Normativas.

- American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. STANDARD METHODS: For the Examination of Water and Wastewater, 23RD Edition, American Public Health Association 800 l Street, NW. Washington D.C., 2017. ISBN 978-087553-287-5.
- Instructivo para determinar DBO5 en aguas. Gestión de Tecnología de Negocio. Centro de Innovación y Tecnología**.** Departamento de Servicio Técnico de Laboratorio de Transporte y Transversales**.** Laboratorio deAguas y Suelos. Instituto Colombiano de Petróleo.

4. Definiciones.

- **Analito:** Especie química que se analiza.
- **Blanco:** Agua reactivo o matriz equivalente que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos disolventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra problema.
- **Calibración:** Proceso mediante el cual se establece la relación entre la indicación de un instrumento o sistema, y el valor establecido para un patrón de medición.
- **Blanco fortificado:** Es una herramienta estadística que garantiza la calidad de los resultados, y permite llevar un control sobre las pruebas y a su vez sobre los equipos.
- **Inóculo:** Cultivo heterogéneo de microorganismos aeróbicos que transforman la materia orgánica en CO2 y H2O.
- **LDO:** Oxígeno Disuelto Luminiscente.
- **Luminiscencia:** Todo proceso de emisión de luz cuyo origen no radica exclusivamente en las altas temperaturas, sino que, por el contrario, es una forma de "luz fría" en la que la emisión de radiación lumínica es provocada en condiciones de temperatura ambiente o baja.
- **Material de referencia certificado:** Material de referencia, acompañado de un certificado, en el que una o más de sus propiedades está certificada por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresa dicha propiedad, y para el que cada valor certificado está asociado a una incertidumbre con un nivel de confianza determinado.
- **Muestra:** Parte representativa de la materia objeto del análisis.
- **Oxígeno disuelto:** Es la cantidad de oxígeno que se encuentra disuelta en el agua, la cual proviene del oxígeno del aire y/o de la liberación de oxígeno de plantas acuáticas en sus procesos de fotosíntesis. En términos generales, la solubilidad del Oxígeno en el agua es directamente proporcional a la presión, e inversamente proporcional a la temperatura y a la concentración de sales disueltas.
- **Patrón:** Medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad, o uno o más valores de una magnitud para servir de referencia.
- **SM:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- **Solución de referencia:** Solución preparada a partir de un reactivo grado analítico que contiene el analito a determinar. Sólo deben ser empleados para realizar calibraciones y blanco fortificado, ya que no se encuentran presentes los componentes de la matriz que acompañan al analito en las muestras.
- **Winkler:** Botella especial para DBO de aproximadamente 300 ml.

5. Condiciones Generales.

La demanda bioquímica de oxígeno es la cantidad de oxígeno consumido durante un periodo de incubación específico, para la degradación bioquímica de la materia orgánica y el oxígeno usado para oxidar material inorgánico tal como sulfuros y/o hierro ferroso. También permite determinar el oxígeno necesario para oxidar las formas reducidas del nitrógeno (demanda nitrogenada) a menos que su oxidación se prevenga con un inhibidor.

En el desarrollo del presente instructivo se debe tener en cuenta que antes de iniciar con la incubación de las muestras, se debe analizar la demanda química de oxígeno de la muestra, aplicando el instructivo para la determinación de DQO, con el fin de determinar un rango estimativo de la concentración de DBO (30 – 80% DQO).

Así mismo, antes de analizar las muestras para DBO, se debe revisar el formato de informe de datos *In-Situ*, para conocer el valor de la concentración de oxígeno disuelto medido en campo. Esta información permite determinar los volúmenes de muestra a incubar.

En el caso de aguas residuales industriales desconocidas, se debe realizar un mayor número de diluciones, empleando diferentes rangos de concentración.

5.1. Prueba de los cinco (5) días (DBO5)

El método consiste en llenar completamente con agua de dilución una botella especial para DBO de aproximadamente 300 mL (recipientes winkler), sembrar la muestra, e incubar por 5 días a una temperatura específica (20°C ± 1°C). Medir el oxígeno disuelto al iniciar y al finalizar la incubación; la DBO se cálcula con la diferencia entre estos dos valores.

5.2. Interferencias.

➢ Si las muestras contienen metales tóxicos o cloro residual, deben recibir tratamiento especial (ver 6.1).
➢ La nitrificación se debe evitar agregando un inhibidor de nitrificación: las muestras que pueden necesitar inhibidor de nitrificación incluyen efluentes tratados biológicamente, aguas de río etc. Debe reportarse el uso de inhibidor con los resultados. El 2-cloro-6-triclorometil-piridina (TCMP) es el inhibidor preferido, pero requiere la manipulación y transferencia en forma sólida. Aliltiourea (ATU) no siempre es eficaz en la inhibición de la nitrificación dentro del periodo de incubación de 5 días, y las concentraciones por encima de
2.0 mg/L pueden aumentar la medida de DBO carbonácea. Inocule todas las muestras a las que se ha añadido inhibidor de la nitrificación. La cantidad de inóculo debe ser la necesaria para lograr resultados delas pruebas (Glucosa- Ácido Glutámico) GGA en el rango de 198 + 30.5 mg/L.
➢ Inhibición de nitrificación usando 2-cloro-6-triclorometil-piridina (TCMP): adicionar 10 mg TCMP/L a la muestra diluida o 3 mg de 2-cloro-6-triclorometil-piridina (TCMP) por cada botella de 300 mL; se puede agregar directamente a la botella o al agua de dilución. No agregue TCMP a las botellas de DBO antes de que por lo menos dos tercios estén llenos de muestra diluida.

Nota 1: TCMP se disuelve lentamente y puede flotar en la parte superior de la muestra si no se mezcla bien.

➢ Inhibición de nitrificación usando Aliltiourea (ATU): añadir 1 mL de solución ATU/L de muestra diluida o 0.3 mL/300 ml botella de ensayo. No agregue ATU a las botellas de DBO hasta que por lo menos dos tercios estén llenos de muestra diluida.
➢ Material mal lavado: para evitar interferencias por material mal lavado, seguir el instructivo general del laboratorio “Lavado de material”.

5.2.1. Muestreo, preservación y almacenamiento.

Recolectar una muestra representativa de 1000 mL en un recipiente de plástico o vidrio para hacer el análisis por duplicado. Las muestras para análisis de DBO, pueden degradarse significativamente durante el período comprendido entre la recolección de las muestras y el análisis, resultando valores bajos de DBO.
Para la preservación y almacenamiento tener en cuenta:

➢ Si el análisis se realiza antes de dos horas después de recolectar las muestras, no es necesario refrigerarlas; en caso contrario, refrigerar las muestras desde el momento de la recolección y realizar el análisis antes de 6 horas; cuando esto no es posible por la distancia entre el sitio de muestreo y el laboratorio, refrigerar y reportar en el informe esta observación (tiempo transcurrido entre la recolección y el análisis, y la temperatura de almacenamiento).
➢ Se recomienda no realizar el análisis después de 48 horas de la recolección de la muestra. Sin embargo, si éste se realiza después de las 48 horas de la toma de muestra, se debe dejar registro en la bitácora de la prueba.
➢ Las muestras compuestas se deben mantener refrigeradas a ≤4 °C durante la composición. El período límite de composición de las muestras es de 24 horas. Se deben reportar el tiempo y las condiciones de almacenamiento.

5.3. Materiales, equipos y reactivos.

5.3.1. Materiales.

➢ Botella especial para DBO de aproximadamente 300 mL
➢ Transfer pipetas

- Balón aforado de 100 y 1000 mL
- Botellón de plástico con llave dispensadora
- Vaso de precipitados
- Pipetas Aforadas de 3, 5, 10, 15 mL

5.3.2. Equipos.

- Balanza analítica
- Incubadora controlada a 20 ± 1ºC
- Agitador magnético
- Medidor HQ40d Hach
- Sonda DBO LDO®: Modelo LBOD101 Hach
- Horno de secado WTC (Binder)
- Bomba de aire Modelo AP-1688
- Plancha de agitación

5.3.3. Reactivos para la siembra de la muestra.

Descartar los reactivos si hay alguna señal de precipitación o crecimiento biológico en los recipientes.

- **Solución buffer de fosfato:** Disolver 8.5 g de dihidrógeno fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 1.7 gde cloruro de amonio (NH_4Cl), 21.75 g de hidrógeno fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y 33.4 g de hidrógeno fosfato disódico heptahidratado ($Na_2HPO_4.7H_2O$) en 500 mL de agua tipo II y/o destilada, y diluir a 1 L. El pH debe ser de 7.2. Otra alternativa es disolver 42.5 g KH_2PO_4 y 1.7 g NH_4Cl en 700 mL de agua tipo II y/o destilada. Ajustar el pH a 7.2 con 30% NaOH y diluir a 1 L.
- **Solución de sulfato de magnesio**: disolver 22.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$)en agua tipo II y/o destilada, y diluir a 1 L.
- **Solución de cloruro de calcio**: disolver 27.5 g de cloruro de calcio ($CaCl_2$) en agua tipo II y/o destilada, y diluir a 1 L.
- **Solución de cloruro férrico**: disolver 0.25 g de cloruro férrico hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$) en agua tipo II y/o destilada, y diluir a 1 L.

Nota 2: la presencia de lama indica crecimiento biológico. En ese caso descartar las soluciones. Tener encuenta en las cuatro (4) soluciones anteriores.

- **Soluciones ácido y álcali 1N**, para neutralización de muestras de residuos cáusticos o ácidos:

- **Solución de ácido sulfúrico 1N**: medir 28 mL de ácido sulfúrico concentrado y diluir a 1 L con aguadestilada y/o tipo II.
- **Solución de hidróxido de sodio 1N**: pesar 40 g de hidróxido de sodio, disolver en agua destilada y/o tipo II y diluir a 1 L.

- **Solución de sulfito de sodio:** disolver 1.575 g Na_2SO_3 en 1 L de agua destilada. Diluir a 1 L. Esta solución no es estable, preparar diariamente.
- **Inhibidor de nitrificación:**

- **2-cloro-6-(triclorometil) piridina:** usar TCMP puro o las preparaciones comerciales (inhibidor de nitrificación fórmula 2533-2% TCMP en sulfato de sodio).
- **Solución de Allythiourea (ATU):** disolver 2.0 g de Allythiourea ($C_4H_8N_2S$) en 500 mL de agua y diluir a 1 L. Almacenar a 4°C. La solución es estable por dos semanas.

- **Solución de glucosa - ácido glutámico para el Blanco Fortificado de 198 mg O_2/L ± 30.5**: Pesar 15.0 mgde ácido glutámico y 15.0 mg de glucosa, previamente secos a 103°C, por una hora, disolver en agua destilada y/o tipo II y aforar a 100 mL. Preparar inmediatamente antes de su uso a menos que la solución se mantenga en una condición estéril. Almacenar a ≤6°C. Se pueden utilizar preparaciones comerciales, pero las concentraciones pueden variar.
- **Solución de cloruro de amonio:** disolver 1.15 g 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 N/mL.

6. Contenido.

A continuación, se presentan las actividades para desarrollar el análisis de DBO en matrices acuosas.

6.1. Tratamiento de la muestra

➢ Chequear el pH: si la muestra no está en un rango de pH de 6.0 a 8.0, ajustar la temperatura de la muestra a 20±3°C y llevarla a un pH entre 6.5 y 7.5 con ácido sulfúrico 1N o hidróxido de sodio 1N de tal forma que la cantidad de reactivo no diluya la muestra en más del 0.5%.
➢ Muestras con cloro residual: si la muestra contiene cloro residual, se debe declorinar. En algunas muestras la declorinación se puede lograr dejando a la luz la muestra por 1 o 2 h, también se puede lograr durante el transporte y manipulación. En aquellas muestras en donde la declorinación toma mayor tiempo, el cloro residual se puede destruir por la adición de Na_2SO_3 como se describe a continuación:
Determinar el volumen requerido de la solución de Na_2SO_3 en una porción de 100 a 1000 ml de muestra neutralizada mediante la adición de 10 ml de ácido acético 1:1 o H_2SO_4 1:50, 10 ml de solución de yoduro depotasio (KI) (10 g/100 ml) por 1000 ml de muestra y titular con una solución de Na_2SO_3 hasta el punto final de almidón-yodo. Añadir a la muestra neutralizada el volumen proporcional de la solución de Na_2SO_3 determinado por la prueba anterior, mezclar, y después de 10 a 20 min verificar el cloro residual de la muestra.

Nota 3: el exceso de Na_2SO_3 ejerce una demanda de oxígeno y reacciona lentamente con ciertos compuestosorgánicos de cloramina que pueden estar presentes en las muestras cloradas.

➢ Muestras que contienen otras sustancias tóxicas: algunos desechos industriales, por ejemplo, desechos de platino, contienen metales tóxicos. Tales muestras a menudo requieren estudio y tratamiento especial.
➢ Muestras supersaturadas con OD: esta condición se encuentra en aguas muy frías o en aguas donde ocurre la fotosíntesis. Para prevenir la pérdida de OD durante la incubación de la muestra, reducir el OD a saturación llevando la muestra a 20 ± 3°C, agitando vigorosamente, o por aireación con aire limpio, comprimido y filtrado.
➢ Muestras que contienen peróxido de hidrógeno (H_2O_2): agitar la muestra vigorosamente, destapar losrecipientes para permitir que el H_2O_2 salga, chequear la reducción de H_2O_2 midiendo la concentración de OD, o utilizando tiras de ensayo de peróxido. El tiempo de agitación puede variar entre 1 y 2 horas dependiendo de la cantidad de peróxido de hidrógeno presente. La reacción de H_2O_2 puede considerarse completa cuando no se presentan incrementos de OD después de 30 min de haber terminado la agitación.

6.2. Preparación del agua de dilución.

➢ El agua de dilución debe estar libre de metales (Cu) y sustancias tóxicas como Cl_2, los cuales pueden interferir con la medición de DBO. El agua desionizada contiene cantidades suficientes de organismos y microorganismos que hacen que esta agua no pase el control de calidad.
➢ Colocar el volumen requerido de agua de dilución en un recipiente adecuado de vidrio o plástico. Chequear y asegurar que la concentración de OD es como mínimo 7.5 mg/L, sino adicionar oxígeno disuelto por burbujeo con aire.
➢ Adicionar por cada litro de agua, 1 mL de cada una de las siguientes soluciones: Buffer de fosfatos, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro férrico.
➢ Mezclar y mantener a temperatura de 20 ± 3º C.
➢ Preparar el agua de dilución antes del análisis.
➢ Si la variación del OD del blanco es mayor a 0.2 mg/L se debe descartar el agua. No se debe adicionar agentes oxidantes o exponer el agua a fuentes de luz UV para tratar de obtener la concentración de OD requerida.
➢ No es recomendable almacenar agua de dilución por más de 24 horas después de la adición de los nutrientes, minerales y las soluciones buffer a menos que el agua de dilución pase el control de calidad.

6.3. Preparación de la dilución

Hacer por lo menos dos o tres diluciones de las muestras que produzcan un oxígeno disuelto residual de 1.0 mg/L, y un consumo mínimo de 2.0 mg/L después de cinco días de incubación.

Cuando no se conoce la naturaleza de las muestras se puede tener en cuenta las siguientes diluciones:

Porcentaje de la muestra	**Tipo de muestra**
0.01 % - 1.0 %	Aguas industriales altamente contaminadas
1.0 % - 5.0 %	Aguas de desecho crudas y sedimentadas
5.0 % - 25.0 %	Efluentes tratados biológicamente
25.0 % - 100 %	Aguas de río contaminadas

Para diluciones preparadas en el frasco de DBO (usar pipetas volumétricas o balones volumétricos de punta ancha), al realizar las siembras tener en cuenta:

➢ Agitar bien las muestras y trasvasar la porción necesaria de muestra a un vaso de precipitado.
➢ Llenar 2/3 partes del recipiente con agua de dilución, sin generar turbulencia (desplazar por las paredes).

➢ Tomar la alícuota de muestra bajo agitación magnética para evitar pérdidas por los sólidos precipitados, y adicionar el volumen requerido a cada frasco de DBO (Winkler).
➢ Adicionar la cantidad apropiada de inóculo según el numeral 6.3 y del inhibidor de nitrificación (si es necesario).
➢ Completar el volumen de los frascos Winkler con agua de dilución, (asegurando el lavado de las paredes internas del Winkler) de tal manera que, al insertar la tapa, todo el aire sea desplazado sin dejar burbujas dentro del frasco.
➢ Agitar la muestra dando vueltas a la botella manualmente varias veces.
➢ Determinar oxígeno disuelto, según el instructivo empleado en el laboratorio.
➢ Incubar las muestras por cinco días a 20 ± 1ºC.
➢ Realizar el mismo proceso para el blanco usando agua de dilución.
➢ Asegurar que no hay aire en la botella durante la incubación, para esto, usar un sello de agua.
➢ Se recomienda usar un plástico o una tapa en la boca del frasco de DBO para reducir la evaporación durante la incubación.
➢ Después de cinco días de incubación, determinar el oxígeno disuelto final en las muestras y en el blanco.

Nota 4: Cuando la muestra tiene alta carga biológica (DQO 300 mg O2/L), realizar factores de dilución antes de sembrar la muestra.

Notas 5: Diluciones preparadas directamente en botellas de DBO: Cuando una botella contiene más del **67%** de la muestra después de la dilución **(> 201 mL)**, los nutrientes pueden estar limitados en la muestra diluida y posteriormente reducir la actividad biológica. En dichas muestras, agregue las soluciones de nutrientes, minerales y tampones directamente a la muestra diluida a una velocidad de 1 mL / L (0.30 mL / para una botella de 300 mL) o utilice soluciones preparadas comercialmente diseñadas para dosificar el tamaño apropiado de la botella.

6.4. Inoculación o siembra

➢ **Preparación de la semilla de inoculación**: Para muestras de agua residual industrial, agua superficial o subterránea que contienen una población biológica insuficiente para oxidar la materia orgánica del agua, se hace necesaria la inoculación de la siembra. A continuación, se relacionan tres fuentes que pueden emplearse como cepa de inoculación:

- **Polyseed**: pesar la cantidad necesaria de Polyseed acorde con el número de muestras que requieran inoculación y disolver en agua destilada y/o tipo II, como se indica en la Tabla 1. Colocar en agitación suave con aireación durante una (1) hora, dejar en reposo por 15 minutos para que las partículas se decanten y tomar el sobrenadante para inocular. La cantidad recomendada son 6 mL por botella. También se puede preparar con agua de dilución previamente aireada. Nota 1: emplear entre las seis (6) horas luego de su preparación.

Tabla 1. Cantidad de Inóculo de acuerdo al volumen de requerido

Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)	Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)	Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)	Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)
10	26	33	86	56	146	79	209
11	29	34	89	57	149	80	212
12	31	35	91	58	151	81	215
13	34	36	94	59	154	82	218
14	37	37	97	60	157	83	221
15	39	38	99	61	159	84	224
16	42	39	102	62	162	85	227
17	44	40	104	63	164	86	230
18	47	41	107	64	167	87	233
19	50	42	110	65	170	88	236
20	52	43	112	66	172	89	239
21	55	44	115	67	175	90	242
22	57	45	117	68	177	91	245
23	60	46	120	69	180	92	248

Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)	Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)	Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)	Polyseed (mg)	Volumen de agua (mL)
24	63	47	123	70	183	93	251
25	65	48	125	71	185	94	254
26	68	49	128	72	188	95	257
27	70	50	130	73	191	96	260
28	73	51	133	74	194	97	263
29	76	52	136	75	197	98	266
30	78	53	138	76	200	99	269
31	81	54	141	77	203	100	272
32	83	55	143	78	206		

- **Concentrado para mascotas**: se prepara apartie de concentrado para gatos marca Mirringo, se macera aproximadamente un gramo, se pesa un gramo se afora a 500 ml y se coloca en agitación por tres horas, se deja reposar aproximadamente una hora, si se utiliza el mismo dia de toman 2 ml para inicular si se va a utilizar al otro dia se toman 3 ml para inicular.

- **Agua Residual Doméstica**:

Para muestras de agua residual que contienen una población biológica insuficiente para oxidar la materia orgánica del agua, se hace necesaria la inoculación de la siembra. El material de inoculación normal es agua residual doméstica (Pozo séptico de la Universidad de los llanos).

El procedimiento de toma y almacenamiento del material de inoculación es el siguiente:

➢ Tomar 1 L de muestra del pozo séptico un recipiente plástico, filtrar la muestra usando papel filtro Whatman 41.

Nota 6: Para la toma de la muestra emplear los EPP (Guantes, gafas de protección, máscara de gases, bata manga larga) y transportar la muestra dentro de una cava.

➢ Registrar en la bitácora de DBO5 la fecha y hora de la toma del afluente, tomar un volumen de inóculo necesario para trabajar las muestras del turno, y determinar la DQO. Guardar inmediatamente el resto de afluente filtrado en el cuarto frío a 4ºC.
➢ La DQO de la muestra filtrado debe determinarse antes del uso (dejar registro en bitácora de DBO5), almacenar el inóculo a 4ºC. La muestra es estable y la DQO no varía de un día para otro, incluso más de tres días.
➢ Sacar una porción de la muestra madre de inóculo filtrado para trabajar las muestras del turno, el inóculo sobrante se desecha.
➢ En caso tal que el valor de la DQO del inóculo esté por encima de 300 mg O2/L, realizar dilución con un afluente más bajo o con agua destilada, homogenizar y determinar nuevamente la DQO.
➢ La adición del inóculo es aplicable a muestras de aguas residuales industriales sin tratar, aguas desinfectadas, aguas residuales con altas temperaturas, aguas residuales almacenadas más de 6 horas después de la recolección, aguas subterráneas, aguas naturales y aguas superficiales.

El procedimiento para la siembra del inóculo es el siguiente:

Valor de DQO Afluente Filtrado mg O2/L	Volumen de InoculomL
250-350	2
200-250	3
160-200	4

➢ Tomar el volumen del inóculo bajo agitación magnética para asegurar que en todas las botellas de DBO se adicione la misma cantidad de microorganismos. Los volúmenes de inóculo se deben adicionar según el valor de DQO.
➢ Adicionar el volumen de inóculo al frasco de dilución o al frasco de DBO después de haber realizado la dilución descrita en el numeral 6.4.
➢ No se debe adicionar el inóculo directamente a la muestra ya que esta puede contener materiales tóxicos.

➢ No filtrar el inóculo antes de su uso.
➢ Registrar el volumen de inóculo que se adiciona a cada recipiente.
➢ El consumo de oxígeno que se atribuye al blanco + inóculo de cada recipiente generalmente debe estar entre 0.6 y 1.0 mg O2/L.

6.5. Determinación del Oxígeno Disuelto (OD):

Método de luminiscencia

➢ Realizar la siembra de la muestra en un Winkler, preparar la sonda de luminiscencia y realizar las mediciones de oxígeno disuelto como se muestra a continuación.
➢ Llevar el Winkler a la incubadora a 20 ± 1ºC durante 5 días para luego medir el OD final.

➢ **Procedimiento de calibración de aire saturado de agua (100%):**

- Conectar la sonda al medidor. Asegúrese que la tuerca de bloqueo del cable está conectada firmemente al medidor.
- Encender el medidor.
- Enjuagar la tapa de la sonda con agua destilada.
- Medir 225 mL de agua destilada en una probeta y adiciónelos al frasco Winkler de 300 mL.
- Colocar un tapón en el frasco y agitar vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos para saturar de agua el aire atrapado.
- Secar con cuidado la superficie del sensor de la sonda con un trapo no abrasivo.
- Quitar el tapón del frasco Winkler e introducir la sonda en el frasco.
- Esperar aproximadamente 10 minutos a que el contenido se equilibre a la temperatura ambiente.
- Pulsar “Calibrar” y luego pulsar “Medición”.
- La pantalla mostrará "Estabilizando" y una barra de progreso de la estabilización de la sonda. Cuando la lectura se estabilice, aparecerá el valor del estándar (100%).
- Pulsar Terminado para ver el resumen de calibración.
- Pulsar “Guardar” para aceptar la calibración y volver al modo de medición.
- Si la calibración es satisfactoria, en la esquina superior izquierda de la pantalla aparecerá el mensaje “OK”. Si la calibración ha vencido o la medida del patrón de control ha fallado o ha sido aplazada, se visualizará un signo de interrogación.
- El valor de pendiente corresponde a la comparación entre la última calibración y la calibración de fábrica expresada como porcentaje. Preferiblemente la pendiente debe estar entre 90 a 110%.
- Registrar el valor en la bitácora de calibración.

Nota 1:

- La calibración de fábrica es el valor por defecto; sus coeficientes están memorizados en el chip iButton. Cada lote de cápsulas de sensor LDO está calibrado en fábrica. Su rendimiento variará ligeramente en función del uso. Las sondas se calibran inicialmente en fábrica, no obstante, se recomienda una calibración regular por parte del usuario para lograr la máxima precisión en las mediciones.
- Si la pendiente de calibración no se ajusta a los criterios de aceptación, la pantalla mostrará el mensaje “Pendiente fuera de rango”. En ese caso, dejar reposar la sonda durante unos minutos en aire saturado de agua para que alcance el equilibrio y repita el proceso de calibración.
- Por último, registre los datos en la bitácora de “DBO5” e ingrese los datos en las cartas de control en el equipo de cómputo designado para la unidad.

➢ **Procedimiento de calibración de punto cero:**

- Tomar 1 litro de solución de sulfito de sodio 2M (Na2SO3).
- Adicionar 0.03gr de cloruro de cobalto (CoCl2) a la solución de sulfito de sodio.
- Deposite la solución de sulfito de sodio y cloruro de cobalto en un recipiente.
- Homogenizar la solución.
- Conecte la sonda al medidor y asegúrese que la tuerca de bloqueo del cable esté conectada al medidor. Por último, encienda el medidor.
- Coloque la sonda LDO en el frasco que contiene la solución.
- Pulse Medición. La pantalla mostrará "Estabilizando" y una barra de progreso de la estabilización de la sonda. Cuando la lectura se estabilice, aparecerá el valor del estándar, el cual, debe estar entre 0.0 – 0.2mg/L
- Saque la sonda del frasco y enjuáguela con abundante agua tipo II para remover cualquier remanente de sulfito de sodio.
- Por último, registre los datos en la bitácora de “DBO5” e ingrese los datos en las cartas de control en el equipo de cómputo designado para la unidad.

Nota 7: Puede llevar hasta 30 minutos poder observarse un punto de 0 mg/l. Un valor negativo de la concentración de oxígeno disuelto indica que todavía no se ha conseguido 0 mg/l.

Nota 8: Medir el OD durante los 30 minutos posteriores a la dilución de las muestras.

Nota 9: Si la muestra contiene materiales que reaccionen rápidamente con el oxígeno disuelto, determinar el oxígeno disuelto inicial inmediatamente después de llenar el frasco Winkler con la muestra diluida.

Nota 10: Si el consumo inicial de oxígeno disuelto es insignificante, el tiempo gastado entre la preparación de la dilución de la muestra y la determinación del oxígeno disuelto inicial, no es crítico.

Nota 11: Determinar el contenido de oxígeno disuelto inicial y final en el blanco, blanco + inóculo, muestras y en la solución de referencia del blanco fortificado.

Nota 12: El oxígeno disuelto final se debe analizar 5 días ± 6 horas después de la incubación.

Nota 13: Para prevenir la producción fotosintética de OD, incubar en la oscuridad a 20 ± 1ºC los frascos que contienen las diluciones de las muestras, y el blanco del agua de dilución.

6.6. Cálculos.

6.6.1. Si NO se utiliza inóculo:

Calcular la DBO a los 5 días de incubación utilizando la siguiente ecuación:

$$DBO5\ (mgO2/L) = \frac{(OD_1 - OD_2) \times V_{frasco}}{V_{muestra}} \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde:
OD1 = Oxígeno disuelto inicial en mgO2/L.
OD2 = Oxígeno disuelto final en mgO2/L.
V muestra= Volumen de la muestra en L.
V frasco= Volumen del frasco en L.

6.6.2. Si se utiliza inóculo:

Calcular la DBO a los 5 días de incubación utilizando la siguiente ecuación:

$$DBO_5\ (mgO_2/L) = \frac{[(OD_1 - OD_2) - (B_1 - B_2) * f] \times V_{frasco}}{V_{muestra}} \quad \textbf{Ec. 2}$$

OD1 = Oxígeno disuelto inicial en mgO2/L. OD2 = Oxígeno disuelto final en mgO2/L.

B1 = OD del control de inóculo antes de la incubación en mg/L.

B2 = OD del control de inóculo después de la incubación en mg/L. V muestra= Volumen de la muestra en L.

V frasco= Volumen del frasco en L.

f = proporción de inóculo en la muestra si el inóculo se agrega directamente a la botella Winkler.

f = (volumen de inóculo en la muestra diluida) / (volumen inóculo en el control “blanco + inóculo”).

Nota 14:

- Si el agotamiento de OD es <2.0 mgO2/L y la concentración de la muestra es del 100% (sin dilución, excepto para soluciones de semillas, nutrientes, minerales y tampón), el agotamiento real de OD corregido por semillas se puede reportar como DBO incluso si es <2.0 mgO2/L.
- Cuando todas las diluciones dan como resultado un OD residual <1.0, seleccione la botella con la mayor concentración de OD (generalmente la mayor dilución). Calcule y reporte el resultado de DBO5 como mayor que (>), según la ecuación 2 (sin

restar el blanco).

- Si todas las diluciones producen un agotamiento de OD <2.0 mgO2/L y la muestra se diluyó, seleccione la botella con el mayor volumen de muestra (la menor dilución) y calcule e informe el resultado de DBO5 como si la dilución hubiera agotado 2.0 mgO2/L, como menos que (<), según la ecuación 2 (sin restar el blanco).
- En los cálculos anteriores, no realice correcciones para la absorción de OD por el blanco de agua de dilución durante la incubación.

6.7. Controles de calidad requeridos.

Se deben verificar los siguientes controles:

➢ Calibración de aire saturado de agua (100%) y de punto cero. Cada vez que se vaya a leer el lote de muestras y se realiza de acuerdo a el numeral 6.5 Determinación de oxígeno disuelto (OD) por el método de luminiscencia.

➢ Mínimo residual de oxígeno disuelto y mínima variación del OD: la variación entre el OD inicial y final (consumo de oxígeno) debe ser mínimo de 2.0 mgO2/L, y el oxígeno disuelto final (oxígeno residual) no debe ser inferior a 1.0 mgO2/L, lo cual es aplicable para las muestras y los controles (CC). Al menos 1.0 mgO2/L debe permanecer durante toda la prueba para asegurar que la falta de oxígeno no afecte la velocidad de oxidación. Al usar electrodos de membrana para la medición de oxígeno, realizar pruebas de calibración frecuentes para asegurar lecturas precisas de oxígeno.

➢ Chequeo de glucosa - ácido glutámico (GGA): este procedimiento es básico para establecer la precisión y la exactitud del test de DBO, y para medir la calidad del inóculo. Adicionar suficiente cantidad del estándar GGA, para obtener 3.0 mg glucosa/L y 3.0 mg ácido glutámico/L (20 mL GGA/L ó 6 mL GGA/300 mL de botella). Los promedios de los resultados de DBO de las tres diluciones deben ser de 198 ± 30.5 mg/L. Si los valores no se encuentran en este rango, se deben evaluar las posibles fallas y hacer los respectivos correctivos. Valores altos de DBO pueden deberse a inadecuados volúmenes de inóculo, contaminación del agua de dilución o procesos de nitrificación; y valores bajos de DBO a un inóculo pobre en población microbiana o a la presencia de material tóxico. Si persisten los bajos valores de DBO, preparar una nueva mezcla de glucosa-ácido glutámico, y comprobar las fuentes de agua de dilución y el origen del inóculo. Llevar el control de la solución en un gráfico de control.

➢ Chequeo del agua de dilución: en cada bache de muestras incubar uno o varios blancos de agua de dilución que contenga nutrientes, minerales y soluciones buffer, sin inóculo ni inhibidor de nitrificación, este sirve para chequear la calidad del agua y la limpieza de los frascos Winkler. Determine el OD inicial y final. La variación entre el OD inicial y final, no debe ser más de 0.2 mg/L, y preferiblemente no más de 0.1 mg/L. Graficar en la carta de control el consumo de OD del blanco de dilución.

➢ Verificación de la MCC: con cada lote de muestras analizar una muestra preparada con la concentración del Mínimo Nivel de Reporte (MRL). El criterio de criterio de aceptación del MRL es del ± 50% de error.

➢ Chequeo del agua de dilución + inóculo: la variación entre el OD inicial y final (consumo de oxígeno) debe ser mínimo de 2.0 mgO2/L, y el oxígeno disuelto final (oxígeno residual) no debe ser inferior a 1.0 mg O2/L. En cada bache de muestras incubar un blanco de agua de dilución que contenga nutrientes, minerales y soluciones buffer e inóculo, este sirve para chequear el consumo del inóculo. La variación entre el OD inicial y final (consumo de oxígeno) generalmente debe estar entre 0.6 a 1.0 mg O2/L.

➢ Promedio de diluciones: los resultados de las diluciones realizadas a las muestras se pueden promediar, siempre y cuando cumplan con un OD residual > 1.0 mg/L y un consumo de OD > 2.0 mg/L luego de los 5 días de incubación; el porcentaje de diferencia relativa (RPD) admitida en el resultado de DBO5 entre la mayor y menor dilución de la muestra es del 30%.

6.8 Incertidumbre

La estimación de la incertidumbre para el análisis del DBO5 fue desarrollada de acuerdo al instructivo general “Estimación de Incertidumbres”.

6.9 Reporte de resultados

Con el reporte de los resultados, informar lo siguiente:

➢ El promedio de los resultados de pruebas para todas las botellas calificadas en cada serie de dilución.

➢ Informar el resultado como DBO5 si la nitrificación no fue inhibida; si la nitrificación fue inhibida, informar el resultado como DBO Carbonácea (CBOD5).

➢ Las muestras con grandes diferencias entre la DBO calculada para diferentes diluciones (por ejemplo, si la diferencia entre cada dilución es >30%), ya que pueden indicar una sustancia tóxica o problemas analíticos. Cuando el efecto se vuelve repetitivo, investigar para identificar la causa. La toxicidad se debe declarar solo después de una investigación exhaustiva con métodos respirométricos o equivalentes.

➢ Identificar los resultados en los informes de prueba cuando ocurra alguna de las siguientes condiciones en los controles de calidad:

- El promedio del consumo de OD del blanco de agua de dilución es > 0.2 mgO2/L,
- La verificación GGA cae fuera de los límites aceptables,
- Las réplicas de prueba muestran más del 30% de diferencia entre los valores más altos y más bajos,
- Ninguna de las muestras de control de semillas cumple con los criterios anteriores, o
- Todas las diluciones dan como resultado un residual de OD < 1.0 mgO2/L.

Una vez realizados los cálculos y la revisión, para asegurar la calidad y confiabilidad de los mismos, el valor obtenido debe ser reportado, teniendo en cuenta el instructivo general “Manejo de cifras significativas”.

Si durante la ejecución del análisis se presenta una situación anómala y/o se tiene información relevante que facilite la interpretación del resultado, se debe realizar la nota aclaratoria en el sistema y en la bitácora de análisis.

7. Flujograma

No aplica

8. Documentos de Referencia

- Bitácora del análisis
- Bitácora de Equipos (Balanza, Incubadora, Sonda DBO LDO)
- Hoja de Excel, equipo de reporte de resultados.

9. Listado de anexos:

Este documento no tiene anexos

10. Historial de Cambios

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	22/02/2019	Documento Nuevo	*Daissy Sierra. Analista de lab.*		*Marco A. TorresDirector ICAOC*
02	13/03/2019	Correcciones estructurales y de redacción.	*Daissy Sierra. Analista de lab.*	*Karen Mendoza Responsable unidad*	*Mario GutiérrezProf. de Calidad*
03	15/05/2019	Se adicionó en la determinación de oxígeno disuelto y en los controles de calidad, los procedimientos calibración de aire saturado (100%) y de punto cero.	*Alexander Montes Responsable de unidad.*	*Marlene EstradaLíder técnico*	*Mario GutiérrezProf. de Calidad*
04	13/08/2021	Se adicionó inoculación con polyseed y concentrado para mascotas y se eliminó muestra fortificada ya que el SM no lo pide como control.	Joan Patiño *Responsable Unidad*	Karen Mendoza *Prof. Calidad*	Juan Manuel Trujillo *Director CCA*
05	03/08/2022	Corrección de la nomenclatura del blanco fortificado y del alcance.	Jairo Novoa *Analista de lab.*	Karen Mendoza *Prof. Calidad*	Juan Manuel Trujillo *Director CCA*