



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 1 de 17

1. OBJETIVO

Establecer la metodología para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno durante cinco días medido con electrodo de membrana de sensores polarográficos y sonda óptica de luminiscencia. SM 5210B.

2. ALCANCE

Este método inicia desde las definiciones de la técnica analítica, ejecución de la misma, hasta los cálculos y resultados; es aplicable a aguas superficiales, residuales, efluentes y aguas contaminadas. El método 5210B 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 3300 mg O₂/L de DBO.

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

Resultados de verificación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno.

CUADRO PARÁMETROS DE CONFIRMACIÓN DEL MÉTODO				
CÓDIGO DEL INSTRUCTIVO DE ENSAYO: M-S-LC-I025 INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA				
FECHA DE INFORME: 21 de octubre 2018.				
PARÁMETRO	VALOR		UNIDADES	OBSERVACIÓN
	YSI	HACH		
LÍMITE DE DETECCIÓN	2	2	mg O ₂ /L	Corresponde al límite de cuantificación
PRECISIÓN EN TERMINOS DE % CV	7,72	9,31	%	Estándar de concentración baja 2.0 mg O ₂ /L
	3,74	2,84	%	Estándar de concentración baja 10.0 mg O ₂ /L
	3,66	3,52	%	Estándar de concentración media 1650 mg O ₂ /L
	6,22	5,93	%	Estándar de concentración alta 3300 mg O ₂ /L
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	9,88	9,49	%	Estándar de concentración baja 10.0 mg O ₂ /L
	8,69	6,36	%	Estándar de concentración media 1650 mg O ₂ /L
	6,28	5,63	%	Estándar de concentración alta 3300 mg O ₂ /L
RANGO DE TRABAJO (Lectura Directa)	NA	NA	-----	Sin dilución de la muestra
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO	2 - 3300	2 - 3300	mg O ₂ /L	Con la mayor dilución posible o aceptable
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	118,14	121,18	%	Para M ₁ Ab 3 mg O ₂ /L
	114,05	113,77	%	Para M ₁ Aa 10 mg O ₂ /L
INCERTIDUMBRE	15,6	16,3		Estándar de concentración baja 198 mg O ₂ /L



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 2 de 17

3. DEFINICIONES

- Blanco de reactivos o Blanco de Método (MB): para esta técnica se utiliza agua de dilución, o agua de nutrientes.
- SM: Standard method. Métodos publicados (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater).
- Oxígeno disuelto residual (D1-D2): Oxígeno disuelto de muestra diluida después de 5 días de incubación a 20 ° C, en mg / L.
- 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.
- 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 Dióxido de Carbono (CO₂) y agua (H₂O).
- Cepa liofilizada (Polyseed): cultivo microbiológico específico comercial, utilizado como cepa en la prueba de demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅).
- Solución buffer: solución con un pH definido y estable que permite regular el pH.
- Electrodo de membrana con sensores polarográficos: 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.
- Sonda óptica sensible al oxígeno: instrumento de inmersión que utiliza el método óptico de medición de luminiscencia. El método de luminiscencia garantiza que la medición no se vea afectada por ningún tipo de interferencia.
- Sello hidráulico: pequeña película de agua para impedir el intercambio de oxígeno entre la botella winkler y el ambiente.

4. ASPECTOS DE SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO

Antes de iniciar el análisis químico, revisar el Manual del sistema en seguridad y salud en el trabajo SGSST. - E-SGI-ST-M001 y las hojas de seguridad de los reactivos. 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

5.1 Equipos

- Balanza analítica de cuatro cifras decimales.
- Horno a 103 °C ± 1°C.
- Medidor de oxígeno (electrodo de membrana con sensores polarográficos o sonda óptica de luminiscencia).
- Incubadora con temperatura controlada 20°C ± 1°C.
- pH metro.
- Aireador.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 3 de 17

- Plancha de agitación.

5.1.1 Verificación de equipos

Antes de operar los equipos verificar que se encuentran en óptimas condiciones, realizar las verificaciones de calibración de los equipos. Utilizar agua des-ionizada tipo II para la verificación de la calibración de los medidores de oxígeno y proceder según lo indicado en los instructivos de manejo de equipos. Diligenciar el formato M-S-LC-F007 de control diario de manejo del equipo.

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 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, vidriería y material diligenciando el formato M-S-LC-F039. Preparare los reactivos con anterioridad, Registre la preparación de los reactivos en el formato M-S-LC-F064 Control de preparación de soluciones. Utilice reactivos de alta pureza que sean de grado analítico y agua grado reactivo. Agua ultra pura (UP). Tipo I.

- **Solución buffer de fosfato.**

Disolver 4,25 g de fosfato mono-potásico (KH_2PO_4), 10,875 g de fosfato di-potásico (K_2HPO_4), 16,7 g de fosfato di-sódico (Na_2HPO_4). $7\text{H}_2\text{O}$, y 0,85 g de NH_4Cl en aproximadamente 250 mL de agua ultra-pura, llevar a volumen de 500 mL. El pH del buffer preparado debe ser $7,2 \pm 0,3$ sin ajuste adicional. Alternativamente, disuelva 21,25 g KH_2PO_4 y 0,85 g de NH_4Cl en aproximadamente 350 ml de agua ultra-pura. Ajustar el pH a 7,2 con NaOH al 30% y diluir a 500 mL. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descarte este reactivo.

- **Solución de sulfato de magnesio heptahidratado.**

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

- **Solución de cloruro de calcio.**

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

- **Solución de cloruro de hierro (III).**

Disolver 0,125g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua ultra-pura, llevar a volumen de 500 mL. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descarte este reactivo.

- **Agua de fuente para preparar agua de dilución de DBO:** Utilice agua ultra pura tipo II para preparar el agua de dilución y hacer diluciones de muestra.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 4 de 17

- **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, 14 mL de ácido sulfúrico concentrado; diluya a 500 mL. Para la solución de trabajo, prepare una solución al 0.1 N.
- **Hidróxido de Sodio 1 N.**
Disolver 20 g de hidróxido de sodio en agua ultra-pura y diluya a 500 mL. Para la solución de trabajo, prepare una solución al 0.1 N.
- **Reactivo declorador.**
Solución de Sulfito 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).
Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)¹: Disuelva 1,750g de tiosulfato de sodio en agua y lleve a volumen en balón aforado de 500mL. Prepárese semanalmente.
- **Cepa liofilizada (Polyseed)**
Mezcla de bacterias de amplio espectro diseñada específicamente como inóculo de semillas para la prueba de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5). PolySeed debe almacenarse entre 18-25 ° C. Si PolySeed se ha almacenado fuera de este rango, la actividad microbiana puede verse disminuida.

Pesar la cantidad necesaria de cepa liofilizada para el volumen requerido. Ver tabla: Cantidad de Polyseed de acuerdo al volumen necesario. Si requiere un volumen considerable como 500 mL, abra la cápsula PolySeed y vierta el contenido en 500 ml de agua de dilución (agua de nutrientes para DBO). De lo contrario puede pesar la cantidad necesaria por ejemplo para 200 ml es necesario pesar 0,076 g de cepa Polyseed.

La solución PolySeed permanecerá activa durante hasta 6 horas. Si la prueba dura más de 6 horas, es necesario preparar una solución nueva.
- **Glucosa**
Pesar aproximadamente 1 g de glucosa $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ y secar en horno a 103 ± 1 °C. Dejar enfriar en desecador y pesar a 0.150g.
- **Ácido Glutámico**
Pesar aproximadamente 1 g de Acido glutámico $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ y secar en horno a 103 ± 1 °C. Dejar enfriar en desecador y pesar a 0.150g.

5.3.1. Preparación de la solución estándar: solución ácido glutámico – glucosa (GGA)

En vasos de precipitados colocar \approx 1g de ácido glutámico grado reactivo y en otro \approx 1g de glucosa grado reactivo, secar durante una hora en el horno a 103 ± 1 °C. Dejar enfriar dentro del desecador, hasta temperatura ambiente. En un vaso de precipitado pequeño pesar 0,150 gramos de ácido glutámico y en otro 0,150 gramo de glucosa. Disolver con agitación. Colocar 800 mL de agua ultra-pura en un balón aforado de 1 litro, transferir cuantitativamente los 0,150 g de ácido glutámico disuelto, enjuague varias veces el vaso que lo contiene. Transferir cuantitativamente los 0,150 g de glucosa disuelta, enjuague varias veces el vaso que lo contiene. Complete a volumen de 1 L con agua ultra-pura. Homogenice invirtiendo el balón varias veces. Esta solución se debe preparar fresca inmediatamente antes de utilizar, almacene la solución en un estado estéril. Guarde la mezcla de glucosa-ácido glutámico a ≤ 6 °C sin congelar en un frasco schott perfectamente limpio. La solución estándar es útil refrigerada durante 5 días.

5.3.2. Preparación de la cepa: PolySeed®

¹ Agente declorador: referenciado en el Standard methods for the examination of water and wastewater 23 st edition pág 2. (4500 – NH_3 3d).



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 5 de 17

Pesar 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 de muestra, a criterio del analista). La cepa se prepara con agua de dilución (agua de nutrientes para la DBO₅) y se debe colocar en agitación muy suave; se airea la solución de PolySeed durante 1 hora utilizando una bomba de acuario mientras se mezcla con un agitador magnético. Después de airear y agitar durante 1 hora, se retira el agitador magnético, y se deja que la solución de PolySeed repose durante 15 minutos (en el vaso de precipitado); una vez decantado el salvado, sepárelo vertiendo lentamente la solución en un vaso de precipitado limpio, posteriormente transfiera 3,5 mL del sobrenadante de la cepa Polyseed a cada botella Winkler para la determinación de DBO₅. La solución PolySeed permanecerá activa durante hasta 6 horas. Si la prueba dura más de 6 horas, es necesario preparar una solución nueva.

Cantidad de cepa Polyseed de acuerdo al volumen necesario en el análisis.

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

En la Tabla. Cantidad de cepa Polyseed de acuerdo al volumen necesario en el análisis. Para estimar el volumen de cepa requerida, se multiplica el volumen que se adiciona a cada botella (3,5 mL) por el número total de botellas requeridas en el análisis, se debe tener en cuenta las tres botellas para el control de la cepa, (vol. de 20 mL, 25 mL, 28 mL), tres botellas de los estándares cada una con 3,5 mL de cepa Polyseed, y la cantidad de botellas winkler 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 tipo II, la necesaria para el análisis, teniendo en cuenta que el gasto aproximado es de 300 mL por cada botella Winkler a utilizar: 3 botellas para el blanco (agua de dilución), 3 botellas para el control de la cepa (agua de dilución + cepa) la cual permite determinar el factor del control de la semilla (FCS), y entre 3 - 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 $20 \pm 3^\circ\text{C}$. midiéndola con el medidor de oxígeno.
- Por cada litro de agua agregar 1 mL de cada una de las siguientes soluciones: Solución tampón de fosfato, Solución de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Solución de cloruro de calcio (CaCl_2), y Solución de Cloruro de hierro (FeCl_3). Mezclar bien.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 6 de 17

- Airee el agua por dos horas si la cantidad supera los 10 Litros, de lo contrario aire como mínimo durante 1 hora el agua de dilución para que la concentración de oxígeno se acerque al punto de saturación, utilizar la bomba de aireación, que se encuentra disponible en el lugar de trabajo. Verifique que las mangueras estén en buen estado, limpias y libres de crecimiento microbiano. Asegure que la concentración de oxígeno disuelto se encuentre entre $6 \text{ mgO}_2/\text{L} - 7 \text{ mgO}_2/\text{L}$ antes de usar el agua para las pruebas de DBO_5 . (El oxígeno disuelto puede variar por la temperatura)
- 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 DBO_5 .

NOTA: antes de preparar el agua de dilución en la garrafa, enjuague varias veces la garrafa; primero con agua de la llave y posteriormente con agua tipo II varias veces, para asegurar la limpieza del garrafón.

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.

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 DBO. Para evitar la pérdida de oxígeno durante la incubación de tales muestras, reducir el oxígeno disuelto (OD) 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 DBO_5 aparecerá como DBO_5 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 des-ionizada 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.

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 (DBOC_5); cuando no se inhiba, se deben reportar los



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 7 de 17

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. Si el cloro residual no se disipa en un tiempo razonablemente corto, remuévalo agregando una solución de tiosulfato de sodio (Na₂SO₃). Determine el volumen requerido de solución de Na₂SO₃ en una porción de 100 a 1000 ml de muestra neutralizada agregando 10 ml de ácido 1+1 acético o 1+ 50 H₂SO₄ y 10 ml de solución de yoduro de potasio (KI) (10 g / 100 ml) por muestra de 1000 ml, luego valorar con solución de Na₂SO₃ utilizando como indicador del punto final almidón-yodo para el residuo. Agregar a la muestra el volumen proporcional de solución de Na₂SO₃ determinado por la prueba anterior, mezcle y verifique el cloro residual después de 10 a 20 min. (NOTA: El exceso de Na₂SO₃ ejerce una demanda de oxígeno y reacciona lentamente con ciertos compuestos orgánicos de cloramina que pueden estar presentes en las muestras cloradas). No siembre muestras cloradas sin declarar.

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). ²Utilice 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 de cloración ejerce una demanda de oxígeno.

Importancia de la Temperatura en la cuantificación de la DBO₅. La temperatura del agua es un parámetro importante, por su influencia, en el desarrollo de los microorganismos, en las reacciones químicas y las velocidades de reacción. Por esto es necesario que la siembra se realice entre los 20±3 °C con temperatura de incubación de 20 °C ± 1.0 °C, con el propósito de reproducir las condiciones ambientales adecuadas para ejecución de la técnica.

Influencia del pH del Medio sobre las mediciones de DBO₅. Valores extremos de pH son perjudiciales para las condiciones microbiológicas del agua, bajo estas condiciones la degradación de los compuestos orgánicos queda inhibida o incluso llega a detenerse. Si la muestra no se encuentra entre 6.0 y 8.0 unidades de pH; es necesario previamente tratar la muestra para llevarla a un rango de pH adecuado entre 6.5 y 7.5.

Influencia de las condiciones de la cepa liofilizada PolySeed sobre las mediciones de DBO₅. La cepa debe almacenarse entre 18-25 °C. Si la cepa PolySeed se ha almacenado fuera de este rango, la actividad microbiana puede verse disminuida. La cepa PolySeed debe almacenarse en un área seca sin presencia de humedad. Si la cepa PolySeed se almacena cerca de una fuente de humedad, la actividad microbiana puede verse disminuida de igual forma debe almacenarse lejos de cualquier fuente de calor y luz. Esto incluye hornos, autoclaves, y luz solar directa. NOTA: Al almacenar PolySeed, asegúrese de que la botella esté bien cerrada. Si la botella no se ha mantenido cerrada, las condiciones ambientales pueden afectar negativamente a la actividad microbiana.

6.1 Condiciones Ambientales

El lugar del análisis debe ser un sitio ventilado, libre de polvo, libre de vapores ácidos o de una atmósfera química altamente corrosiva.

² Agente de cloración: referenciado en el Standard methods for the examination of water and wastewater 23 st edition pág 2 (4500 – NH₃ 3d)



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 8 de 17

Las condiciones ambientales del área donde se realiza la técnica son vigiladas a través del termohigrómetro y son registradas en el formato de condiciones ambientales M-S-LC-F021.

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 verificación para el buen funcionamiento del Medidor de oxígeno, antes de realizar el análisis. Tenga en cuenta la temperatura y la altitud del laboratorio para la correcta verificación del medidor de oxígeno; reporte el porcentaje de saturación del medidor de oxígeno. Ver instrucciones de manejo del equipo en los instructivos de manejo M-S-LC-I005 medidor de oxígeno YSI modelo 52 y M-S-LC-I040 medidor de oxígeno HACH-HQ40d. Estos controles son necesarios para asegurar las lecturas del Oxígeno Disuelto.
- En ningún caso efectúe el análisis en más de 24 h después de la recolección de la muestra. Se extiende el plazo regulatorio de 48 h solamente cuando las muestras no alcancen a llegar al laboratorio debido a la distancia de monitoreo.
- Realizar la lectura del OD final después de 5 d \pm 6 h de incubación, determine OD en todas las diluciones, blancos, controles y muestras.
- Tener en cuenta los siguientes aspectos a la hora de reportar los análisis: el Oxígeno Disuelto de agotamiento debe ser ≥ 2 mg/ L y el Oxígeno disuelto residual debe ser ≥ 1 mg/L después de 5 días de incubación para producir datos válidos. De esta forma se asegura una medida significativa del consumo de oxígeno y una tasa de oxidación de los componentes.
- Verificar el ácido glutámico y glucosa (AGG): la inspección o verificación de la glucosa y ácido glutámico es la base principal para el establecimiento de la exactitud y precisión de la prueba de DBO₅, así como la principal medida de la calidad de la semilla y el procedimiento de preparación. Se procede como indica el numeral de preparación de solución estándar y se procede a realizar la siembra como se indica, para el chequeo o inspección de la solución estándar.

La precisión y desviación en la DBO₅ resulta de promediar las tres botellas, después de la corrección para dilución y siembra, esta se debe encontrar en los límites de control establecidos por el Laboratorio de Calidad Ambiental, en las cartas de control, 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. Con cada grupo o lote de muestras, es necesario procesar en un mismo día, un estándar por triplicado. Si los resultados de alguna prueba AGG están fuera del rango aceptable de los límites de control, señálelos claramente en todos los registros de datos, investigue el origen del problema y haga las correcciones apropiadas.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 9 de 17

- Registre los resultados en la CARTA DE CONTROL DE EXACTITUD de la técnica analítica. Tendencias: si siete datos sucesivos están en el mismo lado de la línea central, interrumpa el análisis e informe al líder físico-químico para corregir el problema. si dos de cada tres puntos sucesivos superan niveles de advertencia superior e inferior (LIA-LSA), este atento, si el siguiente punto está dentro de límite de alerta, continúe con los análisis; si el siguiente punto excede (LIA-LSA), informe al líder físico-químico.
- Verificación de la calidad del agua: el agua de dilución contiene nutrientes, minerales y solución buffer, pero sin semilla, este blanco de agua de dilución sirve como control de calidad del agua de dilución y de la limpieza de las botellas de incubación. Determine el OD inicial y final para cada botella y el promedio de los resultados, la absorción promedio de OD en 5 días no debe ser mayor de 0,20 mg / L y preferiblemente no mayor de 0,10 mg / L, antes de realizar correcciones de semillas. Si el blanco promedio de agua de dilución es de 0,20 mg / L, registre los datos e identifique claramente dichas muestras.
- Control de la semilla: se debe determinar la DBO de la suspensión de la semilla PolySeed como para cualquier otra muestra. Este procedimiento es el control de la semilla. Preferiblemente hacer 3 diluciones de la semilla como se indica en la siembra de control de la 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. Las diluciones de semilla que muestren una gran variedad de agotamiento por mililitro de semilla ($\pm 30\%$) sugiere la presencia de sustancias tóxicas o grandes partículas en la suspensión de la semilla; verifique la fuente de semilla o cámbiela.
- Es importante que el volumen de solución PolySeed reduzca el DO $\geq 50\%$. Esto indica buena actividad microbiana en la solución PolySeed.
- 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 es de 3.5 mL en cada botella winkler o debe ser ajustado para proporcionar resultados en la verificación de glucosa-ácido glutámico de 203 ± 37 mg O₂ / L, para el equipo de membrana YSI y 203 ± 39 mg O₂ / L para el equipo HACH por luminiscencia de sonda óptica, control establecidos por el Laboratorio de Calidad Ambiental.
- 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. Las muestras que presentan grandes diferencias entre las DBO₅ para diferentes diluciones, por ejemplo, diferencias mayores a un 30%, puede indicar la presencia de una sustancia tóxica o problemas. Cuando el efecto se vuelve repetitivo, investigar e identificar la causa. **Promedie las diluciones de la muestra que se encuentran entre el 30% de la diferencia.**
- Cuando todas las diluciones dan como resultado un **oxígeno disuelto residual** menor a uno (OD<1,0) seleccione la botella con mayor dilución (menor volumen sembrado) y reporte.
- El estándar debe encontrarse en 203 ± 37 mg O₂ / L, para el equipo de membrana YSI y 203 ± 39 mg O₂ / L para el equipo HACH por luminiscencia de sonda óptica, control establecidos por el Laboratorio de Calidad Ambiental.
- Si todas las diluciones dan como resultado un **agotamiento de OD < 2,0 mg / L** y la muestra se diluyó, seleccione la botella con el mayor volumen de muestra (la de menor dilución) y reporte como si la dilución tuviera un agotamiento de 2,0 mg / L.
- El resultado de la DBO₅ se reporta con números enteros, si el resultado es menor a 2 se reporta como < 2 mgO₂/L.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 10 de 17

8. DESARROLLO

8.1. Principio del método.

La técnica de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5), es una prueba utilizada para determinar los requerimientos 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 DBO_5 a pH de 6 a 8, con temperatura de incubación de $20\text{ °C} \pm 1.0\text{ °C}$, 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 DBO_5 , 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 tóxica de la muestra.

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 $20\text{°C} \pm 1\text{°C}$ durante 5 días. El oxígeno disuelto se mide inicialmente y después de la incubación realizada por 5 días, la DBO_5 se calcula a partir de la diferencia entre OD inicial y final. Debido a que la OD 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.

Para la determinación de oxígeno disuelto (OD) se empleará el método de membrana y el método óptico.

- **Principio método de electrodo de membrana³:** Los electrodos de membrana polarográfica o galvánica sensibles al oxígeno están compuestos de dos electrodos de metal sólido en contacto con el electrolito de soporte separado de la solución de prueba por una membrana selectiva. La diferencia básica entre los sistemas galvánicos y polarográficos es que en el primero la reacción del electrodo es espontánea (similar a la de una pila de combustible), mientras que la segunda requiere una fuente externa de voltaje aplicado para polarizar el electrodo indicador. Las membranas de polietileno y fluorocarbono se usan comúnmente porque son permeables al oxígeno molecular y son relativamente resistentes.

En todos estos instrumentos, la "corriente de difusión" es linealmente proporcional a la concentración de oxígeno molecular. La corriente medida se puede convertir fácilmente en unidades de concentración (por ejemplo, mg / l) mediante varios procedimientos de calibración. Los electrodos de membrana tienen un coeficiente de temperatura relativamente alto en gran parte debido a los cambios en la permeabilidad de la membrana.

³ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 23 RD editions, United States of America 2017. Capítulo 4500-O G. Membrane-Electrode Method



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 11 de 17

- **Principio método de sonda óptica⁴:** la sonda óptica utiliza sensores de oxígeno basados en luminiscencia para medir las características de emisión de luz de una reacción luminiscente; el oxígeno apaga cuantitativamente la luminiscencia. El cambio en la vida útil de la señal de luminiscencia se relaciona con la concentración de OD⁵.

Las mediciones basadas en la vida útil utilizan luces moduladas azules y rojas emitidas por dos fuentes de diodos emisores de luz (LED). La luz azul incide sobre el material luminiscente en la tapa del sensor de la sonda, que libera luz roja cuando se excita. El oxígeno apaga esta luz roja, causando un cambio de fase en la señal de retorno detectada por un fotodiodo. Cuanto mayor sea la concentración de oxígeno, más rápido se apagará la luz roja y más lenta será la luz roja detectada por el diodo. La sonda mide cuánto tiempo tarda el material luminiscente en volver a un estado relajado. Entre la luz azul, un LED por separado emite luz roja en la tapa del sensor de la sonda, sirviendo como un estándar interno. La sonda calcula la concentración de OD comparando las medidas de vida de las emisiones de luz azul y roja.

Interferencias en el método óptico: el dióxido de cloro interfiere con esta reacción en concentraciones porcentuales. La incrustación debida a bacterias o al crecimiento de algas puede evitar la penetración de oxígeno. Las bacterias y las algas también pueden generar o consumir oxígeno, lo que da como resultado lecturas erróneas; esto se puede minimizar enjuagando la sonda entre las lecturas para mantener limpio el sensor. Los aceites pueden obstruir la membrana y la tapa del sensor, lo que impide que el oxígeno se difunda al sensor; el enjuague frecuente entre mediciones puede minimizar este problema. Diversos alcoholes y disolventes orgánicos podrían dañar los materiales de la sonda y dañar permanentemente la sonda.

Para el uso adecuado de los equipos se tendrá en cuenta los instructivos de manejo de cada uno de los equipos de medición de oxígeno: electrodo de membrana YSI # 1, sonda óptica. HACH - HQ40d18.

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 ≤ 6 °C hasta el momento del análisis.

Las muestras para el análisis de DBO₅ pueden degradarse significativamente durante el almacenamiento entre la recolección y el análisis, dando como resultando valores de DBO₅ bajos.

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 ≤ 6 °C o menos desde el momento de la recolección. 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 ≤ 6 °C, comience el análisis dentro de las 24 horas de recolección. El tiempo recomendado es de 24 horas; sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) permite un tiempo de espera de 48 horas.

Muestras compuestas: limite el período de composición a 24 h, y mantenga las muestras a ≤ 6 °C durante el proceso de composición. Almacene para el mismo tiempo y temperatura las muestras tomadas, aunque en este caso, el tiempo de espera comienza cuando finaliza el período de composición.

8.3. Limpieza de vidriería y material de campo.

Remítase al instructivo de lavado de 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.

⁴ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 23 RD editions, United States of America 2017. Capítulo 4500 -O H. Optical-Probe Method

⁵ S COTT, E. 2007. Medición basada en luminiscencia de oxígeno disuelto en aguas naturales. Conferencia, del 4 al 5 de junio. Hach Environmental, Loveland, Colo.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 12 de 17

La garrafa donde se prepara el agua de dilución debe lavarse antes y después de su uso con agua des-ionizada tipo II, si es necesario enjuague con agua caliente varias veces. 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 (electrodo de membrana con sensores polarográficos o sonda óptica de luminiscencia).
- Registre los valores de condiciones ambientales en el formato M-S-LC-F021 y lleve el registro de temperatura de la incubadora antes de incubar en el formato Formato control de temperaturas de equipos M-S-LC-F062.
- Saturar de 300 a 500 mL de agua ultra-pura tipo II por aireación durante 15 minutos a temperatura constante. Colocar el electrodo y agitar. Gire el interruptor en O2-TEMP hasta que establezca la temperatura y el oxígeno; deje entre 15 - 30 minutos para que el sistema se equilibre, verifique el equipo de acuerdo al Instructivo de manejo del medidor de oxígeno YSI modelo 52; para el laboratorio del IDEAM el porcentaje es del 73% para una altitud de 2577m y una presión de 555 mm Hg. Siga las instrucciones de manejo de equipos para la verificación de calibración de los medidores de oxígeno HACH y YSI.
- Recuerde que al quinto día se debe volver a verificar el equipo con agua ultra-pura tipo II saturada por medio de aireación, reporte el dato en el formato de captura de datos M-S-LC-F013, diligencie el formato de control diario de manejo del equipo; formato M-S-LC-F007.
- Solicitar las muestras para análisis mediante el formato M-S-LC-F011, deje aclimatar la muestra a $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

8.4.1 Siembra del Blanco

Alistar tres botellas Winkler, identificar cada botella como "Blanco" y escribir la fecha de la siembra en la botella. (dd-mm-aaaa). Adicionar agua de dilución y realizar la lectura de OD (D1) inicial y temperatura. Llenar totalmente las botellas, evitando la formación de burbujas, dejar sello hidráulico, recubrir el sello de agua con plástico, papel aluminio o una tapa; para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación. Registrar los datos en el formato M-S-LC-F013 e incubar a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días. Después de $5 \text{ d} \pm 6 \text{ h}$ de incubación, determinar el oxígeno disuelto residual (D2) en todos los blancos.

8.4.2 Control de la cepa Polyseed.

Alistar tres botellas Winkler, identificar cada botella como "Control de cepa" escribir la fecha de la siembra en la botella y el volumen adicionado de cepa a cada botella winkler. Adicionar 20 mL, 25 mL, y 28 mL de cepa liofilizada Polyseed a cada botella; para servir la cepa utilizar una probeta de 25 mL y 50 mL respectivamente. Adicionar agua de dilución solamente hasta la mitad del cuello de la botella, para que al introducir el electrodo o sonda óptica no haya pérdida de muestra.

Leer el oxígeno inicial (D1) de los controles. Llenar totalmente las botellas, evitando la formación de burbujas, dejar sello hidráulico, recubrir el sello de agua con plástico, papel aluminio o una tapa; para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación. Registrar los datos en el formato M-S-LC-F013 Captura de datos DBO₅; e incubar a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días. Después de $5 \text{ d} \pm 6 \text{ h}$ de incubación, determinar el oxígeno disuelto residual (D2).

8.4.3 Siembra del estándar

Alistar tres botellas Winkler, identificar cada botella como Estándar, y escribir la fecha de la siembra en la botella. Adicionar 3,5 mL de cepa liofilizada a cada botella; para servir la cepa utilice una pipeta de punta ancha de 20 ml graduada o una transfer-pipeta para evitar obstrucción. Adicionar 6 mL del estándar con pipeta aforada a cada botella y llenar las botellas con agua de dilución solamente hasta la mitad del cuello de la botella, para que al introducir el electrodo o sonda óptica no haya pérdida de muestra.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 13 de 17

Leer el oxígeno inicial (D1) de los controles. Llenar totalmente las botellas, evitando la formación de burbujas, dejar sello hidráulico, recubrir el sello de agua con plástico, papel aluminio o una tapa; para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación. Registrar los datos en el formato M-S-LC-F013 Captura de datos DBO₅; e incubar a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco días. Después de $5 \text{ d} \pm 6 \text{ h}$ de incubación, determinar el oxígeno disuelto residual (D2).

8.4.4 Siembra de la muestra

Para estimar la dilución de la muestra, se puede tener en cuenta el oxígeno disuelto medido en campo, este parámetro ayuda a hacer una estimación de las diluciones que se deben realizar. En ausencia de conocimiento previo, utilizar los siguientes volúmenes en aguas residuales cuando prepare diluciones.

Volúmenes de muestra a tomar en aguas residuales.

Tipo de muestra	Volumen de muestra (mL)	Porcentaje
Residuales industriales fuertes.	0,1 -0,3	0,01%- 1%
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).

La muestra antes de sembrarse debe pasar por los siguientes pretratamientos:

- Ajustar la temperatura de la muestra a $20^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. Establecer la cantidad de muestra que se necesita de acuerdo a las diluciones a realizar. Agitar suavemente la muestra para homogenizarla completamente.
- Verificar que el pH de la muestra esté entre 6 y 8, de no ser así, servir la muestra homogenizada en un vaso precipitado y ajustar el pH entre 6,5 y 7,5 utilizando una solución de ácido sulfúrico o hidróxido de sodio lo suficientemente fuerte como para no diluir la muestra en 0,5%, dosificar 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 , o Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como agentes decloradores.
- 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.
- Alistar las botellas Winkler necesarias, entre 3 y 5 para cada una de las muestras. identificar 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 directa en la botella winkler. Si se requiere hacer una dilución adicional; debido a la contaminación de la muestra realícela en un balón aforado, agite y sirva en la botella la cantidad requerida. Registrar los datos en el formato M-S-LC-F013.
- 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).
- Adicionar 3,5 mL de cepa liofilizada. Para servir la cepa utilice una pipeta de punta ancha para evitar obstrucción.
- Adicionar agua solamente hasta la mitad del cuello de la botella, para que al introducir el electrodo o sonda óptica no haya pérdida de muestra. Lea el oxígeno inicial (ODi) de las botellas de muestra Si al medir el



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 14 de 17

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, recubra el sello de agua con plástico, papel aluminio o una tapa; para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación. Registre los datos en el formato M-S-LC-F013 Captura de datos DBO₅ e incubar a 20±1°C por cinco días. Después de 5 d ± 6 h de incubación, determinar el oxígeno disuelto residual (D2).
- Las mediciones de oxígeno inicial y final se pueden realizar usando el electrodo de membrana YSI o la sonda óptica de luminiscencia HACH. Calcule la DBO₅ con los resultados obtenidos.
- Una vez finalizada la marcha analítica al quinto día, deposite los residuos en la caneca correspondiente, solicite el lavado de material, diligenciando el formato de solicitud M-S-LC-F003. Registrar los valores de los controles analíticos en la carta de control, y diligenciar el formato de recepción de muestras y control de análisis M-S-LC-F002.

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:

$$DBO_5 \text{ (mgO}_2\text{/L)} = \frac{(D1 - D2) - ((S)V_s)}{P}$$

Dónde:

D1 = Oxígeno Disuelto inicial de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación, mg/L (oxígeno disuelto inicial).

D2 = Oxígeno Disuelto de la muestra diluida después de 5 días de incubación a 20°C, mg/L (oxígeno disuelto final).

S = Absorción de oxígeno de la semilla, ▲OD / mL suspensión de semilla añadida por botella.

V_s = Volumen de la semilla en la botella Winkler, de 300mL.

P = Fracción volumétrica decimal de la muestra utilizada; dilución 1/P factor.

D1-D2 = Agotamiento deberá ser ≥ 2

S V_s = Factor control de semilla FCS debe estar (~ entre 0.6 -1).

P= Volumen de la muestra / 300 mL.

Para la determinación de S, se indica que el cálculo se realiza: restándole al oxígeno disuelto inicial el oxígeno disuelto final (D1-D2) el cual es el agotamiento del oxígeno, este resultado se divide por el volumen de control de la cepa.

Ejemplo: el oxígeno inicial del control de la cepa dio como resultado 6,77 y el oxígeno final 3,07; la resta da como resultado 3,70, a ese resultado lo divido por el volumen del control de la cepa Polyseed que dio los anteriores consumos de oxígeno; lo divido por 20; obteniendo como resultado: 0,185, que es igual a S.

Es decir que S ▲OD / mL = 0,185.

Para obtener V_s; se multiplica S por el volumen de la cepa adicionada en cada botella winkler; que es de 3,5 mL de cepa Polyseed, es decir que el resultado de V_s = 3,5 * 0,185 = 0,647.

Este cálculo se realiza para cada uno de los volúmenes de la cepa utilizados en el control de la misma, se debe realizar para 20 mL, 25 mL, 28 mL. Utilice la hoja Excel diseñada, que se encuentra en la carpeta de carta de control de la DBO₅.



**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 15 de 17

Los cálculos de S(Vs) hace referencia a la corrección del factor del control de la semilla (FCS) que se debe restar a las muestras y estándar de control, este valor debe estar en 0.6 mg /L -1 mg /L.

Reporte los resultados de DBO₅ mg O₂ / L con números enteros. Redondeando el resultado; ejemplo si el resultado es 3,5 se aproxima a 4 mg O₂ / L de DBO₅. 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 reporte el dato.

Digite el registro de resultados aprobados por la auditoria analítica y el oficial de calidad en la base de datos del IDEAM.

9. DIAGRAMA

Ver anexo 1.

10. DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y BIBLIOGRAFÍA

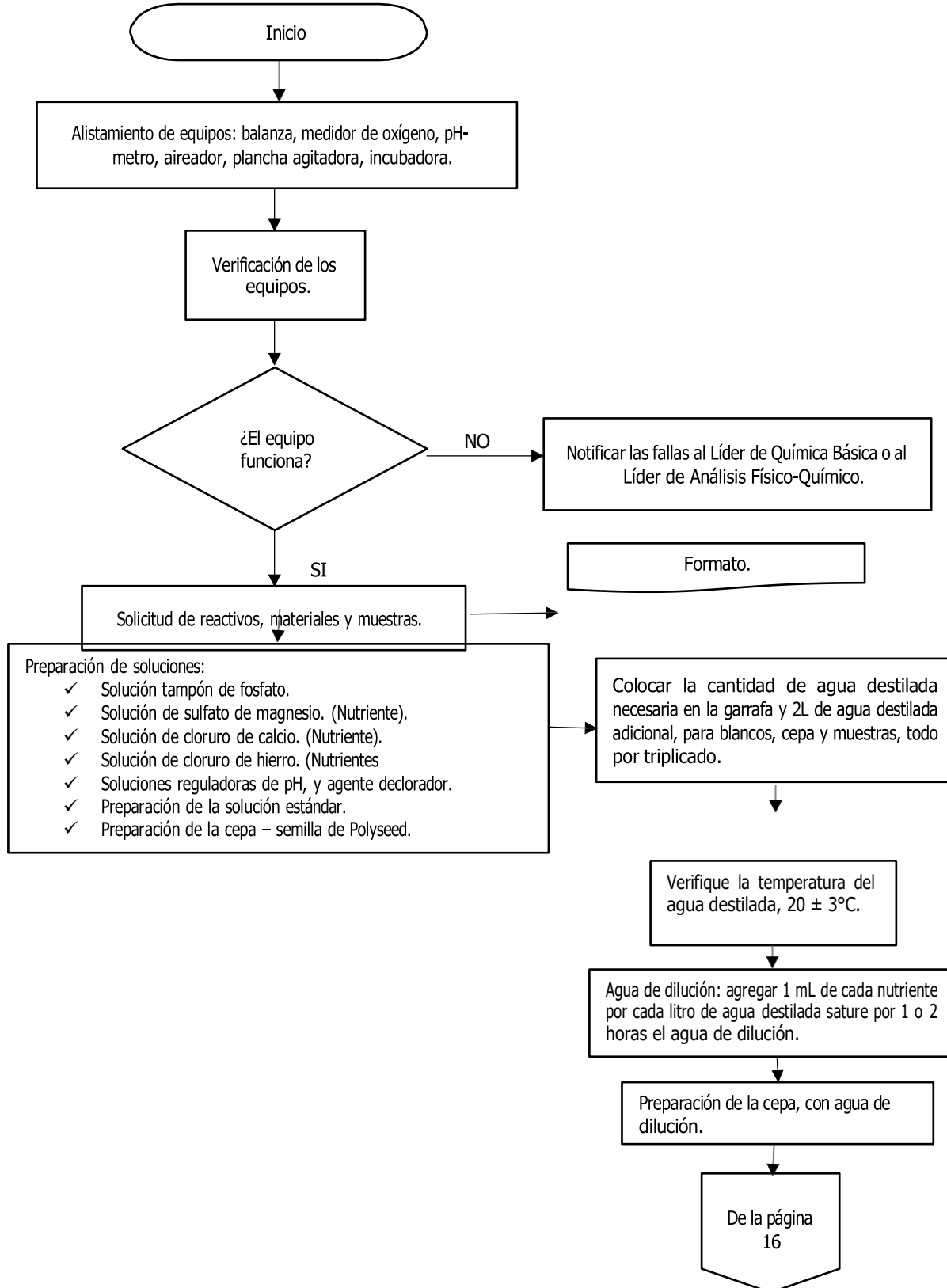
- APHA AWWA WEF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23 RD edition 2017 American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Capitulo 5210B.
- Polyseed Application Procedure BOD₅ Seed Inoculum. www.polyseed.com
<http://www.polyseed.com/main/polyseed.php>
- M-S-LC-I005 Instructivo de Manejo Medidor de Oxígeno YSI modelo 52. Versión.2.
- M-S-LC--I040 Instructivo de Manejo Medidor de Oxígeno HACH-HQ40d18.
- M-S-LC- I039 Instructivo de Manejo Incubadora MEMMERT 750 PLUS.
- Informe de verificación para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno durante 5 días. S.M. 5210. B.

11. HISTORIAL DE CAMBIOS

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
01	14/12/2017	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI.
02	20/10/2018	Actualización del documento con la nueva versión 23 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
03	21/10/2020	Nueva versión producto de la actualización de la documentación del Sistema Integrado de Gestión.
04	03/07/2025	Se actualiza el Formato de acuerdo con el memorando enviado por la OAP memorando 20251100097283 lineamientos para la actualización documental en el marco de la implementación del aplicativo suite visión. El código pasa de M-S-LC-I025 a SLC-I025.

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

ANEXO 1. Diagrama





**INSTRUCTIVO DE ENSAYO.
DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO 5 DÍAS, SM 5210B.**

Código: SLC-I025

Versión: 04

Fecha: 03/07/2025

Página: 17 de 17

A la página
17

Pre-tratamiento de la muestra: Ajuste la temperatura de la muestra a $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Establezca la cantidad de muestra necesaria de acuerdo a las diluciones a realizar, para ello tenga en cuenta el oxígeno disuelto medido en campo.

Agite suavemente la muestra para homogenización, sirva en un vaso de precipitado.

Verificación
del pH.

¿El pH de
la muestra
está entre
6 y 8?

No

Ajústelo entre 6.5 y 7.5 con ácido sulfúrico o hidróxido de sodio según sea el caso, dosificando estos reactivos con una pipeta Pasteur.

Si

Proceda a realizar las siembras correspondientes de Blancos, blancos con adición de cepa liofilizada, Siembra del estándar con adición de cepa liofilizada, y siembra de muestras con adición de cepa liofilizada, identifique cada botella, y coloque la fecha de siembra.

Registre la dilución o volumen de muestra utilizada. Y los datos requeridos en el formato.

Al quinto día lea el Oxígeno disuelto residual (D2). Calcule la DBO_5 $\text{mg O}_2/\text{L}$ con los resultados obtenidos. Registrar en las cartas de control los resultados de los estándares de cada lote de muestras analizadas.

Lea el oxígeno inicial de las botellas de muestra (D1). Tape herméticamente e incube a temperatura $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días.

Verifique el medidor de Oxígeno con el agua de dilución saturada, reporte el porcentaje de saturación del equipo.

Una vez finalizada la marcha analítica, Registre los valores de los controles analíticos en las cartas de control, entregue el formato M-S-LC-F013 de captura de datos al Líder Fisicoquímico para su aprobación. (Tenga en cuenta que se deben incluir las diluciones realizadas en el reporte). 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. Digite el registro de resultados aprobados en la base de datos del IDEAM.

Fin.