1. DESCRIPCIÓN

La DBO (demanda bioquímica de oxígeno) es una medida de oxígeno requerido para la estabilización química y biológica de la materia orgánica en un intervalo de tiempo específico, encaminado a definir la fracción orgánica de las aguas residuales.

Entre más sea la cantidad de materia orgánica vertida a un cuerpo de agua, mayor será la necesidad de agua para su descomposición, por lo tanto, habrá una baja en el oxígeno disuelto, creando condiciones que van en detrimento de la vida acuática y otros usos benéficos.

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

La prueba analítica de la DBO estima la cantidad de oxígeno que se requiere para oxidar la materia orgánica de una muestra de aguas residuales, por medio de una población microbiana heterogénea. La información obtenida en la prueba de la DBO es de la materia orgánica biodegradable que se encuentra en el agua residual.

Materia + O_2 + nutrientes--------- CO + Nuevas + Residuos
Células biodegradables

La cantidad de oxígeno utilizado por unidad de volumen en la mezcla de desecho, puede usarse como medida relativa de la concentración de materia orgánica, ya que la cantidad de oxígeno utilizado está en función del grado de desarrollo de la reacción bioquímica, así como de la cantidad original de materia orgánica, la DBO es una función directa de tiempo. Se ha encontrado por experiencia, que un porcentaje razonablemente grande de la DBO total se logra en cinco (5) días de incubación.

2. ALCANCE

Este método es aplicable en las matrices acuosas superficiales, marinas y residuales tanto industriales como domésticas, en concentraciones a partir del MRL (definido experimentalmente) en adelante.

3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

3.1 Principio

El método se desarrolla de la siguiente manera, a una muestra en dos botellas Winkler bajo las siguientes condiciones: estar a 20±3°C, aireadas, diluidas (si es necesario) y que el líquido ocupe todo el volumen de las botellas, se incuba una a 20°C y a la otra se le agregan 1 mL de sulfato de manganeso más 1 ml de álcali-yoduro azida, tapar y agitar vigorosamente, dejar reposar 5 minutos y agregar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitar de nuevo y tomar una alícuota de 50 mL y titularla con tiosulfato de sodio 0,025N obteniendo así un oxígeno inicial, dentro de cinco días se repite el proceso a la muestra incubada obteniendo un oxígeno final. Este método aplica para aguas potables, subterráneas, superficiales, lluvias, lavado de frutas, residuales y marinas.

3.2 Interferencias

El cloro residual puede ser una interferencia, se puede inhibir dejando la muestra en reposo durante dos (2) horas después de tomada la muestra. Si el cloro residual no se disipa en el tiempo mencionado, puede ser eliminado mediante el "***proceso de eliminación de cloro****"; igualmente se puede determinar por medio de titulación potenciométrica usando la solución titulante (Oxido de Fenilarsina) el cual valorara la muestra con adición de KI (Yoduro de potasio) y NaOH 1N (hidróxido de sodio).

Compuestos nitrificantes pueden desarrollarse con el almacenamiento del agua de dilución.

***Proceso de eliminación de cloro:** Para una porción entre 100 – 1000 ml de muestra, adición 10 ml de acido acético 1:1 y 10 ml de solución de KI (preparada así: 10g/100ml) por cada 1000 ml de la muestra; seguido a esto titular con solución de Na_2SO_3 hasta punto final de almidón-yodo, y adicionar un exceso equivalente al volumen gastado.

4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

Las muestras para el análisis de la DBO pueden degradarse significativamente mientras están almacenadas, entre su recogida y el análisis, y como resultado producir valores de la DBO bajos. Hágase mínima la reducción de la DBO enfriando la muestra a 4°C durante su almacenamiento. Sin embargo, aún a baja temperatura, redúzcase el tiempo de almacenamiento a un mínimo de tiempo. Si se va a iniciar el análisis en el plazo de dos (2) horas a partir de la toma de la muestra el almacenamiento en frío es innecesario. En ningún momento se debe empezar el análisis después de cuarenta y ocho (48) horas después de la toma de la muestra o bajo la responsabilidad del usuario.

5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Titulador Potenciométrico con electrodo de platino.
- Incubadora DBO.
- Vidriería volumétrica en general.
- Aireador.
- Botellas Winkler 250-300 mL.
- Piedras de aireación.
- Medidor de Iones (pH).
- Papel aluminio Reynolds.
- Balanza analítica.
- Manguera.

6. REACTIVOS

- Agua Destilada, filtrada bajo filtros de arena y carbón activado, clorada, regulada con permanganato de potasio y desionizada.
- Sulfato de manganeso monohidratado.
- Yoduro de potasio.
- NaOH.
- NaN_3.
- H_2SO_4 Concentrado.
- $Na_2S_2O_3.5H_2O$.
- Dicromato de potasio.
- Acido L glutámico.
- Glucosa (+) anhidra.
- KH_2PO_4.
- K_2HPO_4 anhidro.
- Na_2HPO_4.
- NH_4Cl.
- $MgSO_4.7H_2O$.
- $CaCl_2$ granulado.
- $FeCl_3.6H_2O$.
- Na_2SO_3
- Inhibidor de la nitrificación (TCMP)
- Cápsulas de inóculo marca POLYSEED.

7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución tampón de fosfato:** Disolver 8,5g de KH_2PO_4, 21,75 g de K_2HPO_4, 33,4g de $Na_2HPO_4{\cdot}7H_2O$, y 1,7g de NH_4Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada y diluir a 1 L. El pH debe ser 7,2 sin posteriores ajustes. Si se presenta alguna señal de crecimiento biológico, descartar este o cualquiera de los otros reactivos.

- **Solución de sulfato de magnesio:** Disolver 22,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua destilada y diluir a 1L.
- **Solución de cloruro de calcio:** Disolver 27,5g de $CaCl_2$ en agua destilada y diluir a 1L.
- **Solución de cloruro férrico:** Disolver 0,25g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en agua destilada, diluir a 1L
- **Soluciones ácida y alcalina 1N:** Para neutralización de muestras cáusticas o ácidas.
  - **Ácido:** A un volumen apropiado de agua destilada agregar muy lentamente y mientras se agita, 28 mL de ácido sulfúrico concentrado; diluir a 1L.
  - **Álcali:** Disolver 40g de hidróxido de sodio en agua destilada y diluir a 1L.
- **Sulfato de manganeso:** Pesar 480 g de $MnSO_4.4H_2O$ o 400 g de $MnSO_4.2H_2O$ o 364 g $MnSO_4.H_2O$ adicionarlos en agua destilada, filtrar y diluir a 1 L. La solución no debe dar coloración con almidón cuando se añada a una solución acidificada de yoduro de potasio.
- **Alcali-yoduro azida:** 500 g de NaOH (o 700 g de KOH), 135 g de NaI (o 150 g de KI) en agua destilada y diluir a 1L. Añadir 10 g de NaN_3 disueltos en 40 mL de agua destilada. No debe dar color con solución de almidón cuando acidifique.
- **Solución sulfito de sodio (Na_2SO_3):** Disolver 1,575 g de Na_2SO_3 en 1000 ml en agua de grado reactivo. Esta solución es inestable; preparar diariamente.
- **Solución de cloruro de amonio (NH4Cl):** Disuelva 1,15g de NH4Cl en aproximadamente 500 ml de agua de grado reactivo, ajuste el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio (NaOH), diluir a 1L, La solución contiene 0,3 mg N/ml.
- **Tiosulfato de sodio 0,025N (titulante):** 6,205 g de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ disueltos en agua destilada. Añadir 1,5 mL de NaOH (0,4 g de NaOH) diluir a 1L. Este reactivo tiene que estandarizarse para comprobar su concentración, para estandarizar se toman 10 mL de dicromato de potasio 0,025N, 150 mL de agua destilada, 2 g de yoduro de potasio, 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se deja reposar 5 minutos en oscuridad y luego se titula con el tiosulfato de sodio hasta coloración transparente, la normalidad del tiosulfato de sodio se calcula con la siguiente fórmula: ***N = 10x0,025/Volumen gastado***, donde el 0,025 corresponde a la normalidad del dicromato de potasio, este ensayo se debe hacer tres (3) veces y promediar los resultados.
- **Preparación del agua de dilución:** Utilice la cantidad de agua destilada o desionizada necesaria para trabajar según el volumen de las botellas a usar. Determine si el oxígeno disuelto del agua esta al menos en 7,5 mg/L antes de su uso, de lo contrario, airee a una temperatura de 20±3°C para saturarla. Agregar por cada litro 1 ml de cada una de las siguientes

soluciones: tampón fosfato, $MgSO_4$, $CaCl_2$, y $FeCl_3$. Se debe preparar el agua de dilución inmediatamente antes de su uso.
Cuando se requiere inocular el agua de dilución, agregar de 10 a 15 ml de solución de inoculo por cada 300 ml de muestra.

- **Preparación del inoculo:** Disolver una capsula de POLYSEED en 500 ml de agua de dilución, agitar por una hora y dejar decantar. Mantener en constante agitación durante su utilización. El uso del inóculo se limita a matrices superficiales, potables, subterráneas y marinas.

8. PROCEDIMIENTO

- Ingreso de la muestra al laboratorio, se agita vigorosamente.
- La sección 5210 B numeral 4 del Standard Methods "Preparatory Procedure" proporciona las pautas necesarias para los pretratamientos de las muestras, se deben seguir estos procedimientos cuando apliquen.
- Realizar lectura de pH para conocer si está dentro del intervalo de trabajo teórico (6,0-8,0), si no lo está, se ajusta la temperatura a 20±3°C y se lleva a pH 6,5-7,5 con H_2SO_4 o NaOH diluidos. No diluir la muestra más de 0,5%.
- Estimar el grado de contaminación del líquido para realizar o no las respectivas diluciones de análisis, si se tiene una idea de la contaminación más precisa, consultar la tabla 1 de diluciones. Realizar al menos tres diluciones. Se permiten dos diluciones si la experiencia con las muestras asegura al menos una botella con mínimo aceptable de consumo de oxigeno residual. El laboratorio evalúa la posibilidad de más de tres diluciones cuando no haya información histórica de la muestra. Un análisis rápido de DQO, permite correlacionar los resultados y servir como guía para determinar diluciones.
- Preparar agua de dilución si es necesario (como se describe en la preparación de reactivos).
- Llevar la muestra y el agua de dilución a una temperatura aproximadamente 17°C.
- Inocular si es necesario. Adicionalmente se prepara una muestra de sólo agua de dilución inoculada para determinar el oxígeno consumido por el inóculo siguiendo el procedimiento del laboratorio.
- Realizar la dilución, si se requiere, en 300 mL y llevar esta a una escala de tres (3) utilizando una probeta graduada de 1000mL: 10mL ± 5 mL, por ejemplo: si la dilución es de 50 mL de muestra en 300 mL de agua de dilución, se añaden 150 mL de muestra previamente agitada y con el pH regulado a la probeta y se completa con agua de dilución hasta marcar 900 mL.
- Se tiene un límite inferior de dilución directa de la muestra en la probeta, este es 9 mL, correspondiente a una dilución de 3 mL de muestra en 300 mL de agua de dilución (adicionar 9 mL y llevar hasta 900 mL). Si la muestra requiere una dilución menor que esta, tomar una pequeña alícuota

de ella y diluirla en un balón volumétrico con agua destilada normal y tomar una cantidad igual o mayor de 9 mL que contenga el volumen deseado a diluir en 300 mL, llevarlo a escala de tres (3) y diluirlo en la probeta, por ejemplo: se quiere realizar una dilución de 0,5 mL en 300 mL, se toman 20 mL de muestra y se llevan a 100 mL en un balón volumétrico con agua destilada, se toman 7,5 mL (equivalentes a 0,5 mL de muestra X 3) se llevan a la probeta y se completa a 900 mL con agua de dilución. Las diluciones pueden ser preparadas directamente en las botellas. Posteriormente almacenar en la incubadora en ausencia de luz.

- Se procede a airear la muestra durante un tiempo mínimo de 5 minutos.
- En dos botellas Winkler limpias y secas (una de ellas cubierta totalmente de papel aluminio para incubarla sin presencia de luz) con ayuda de una manguera de longitud media de diámetro un poco menor a la boca de las botellas, adicionar por succión y rápidamente la muestra aireada en cada una de ellas hasta rebosar, tapar rápidamente, este procedimiento se debe realizar mientras la muestra se encuentre en un intervalo de temperatura de 20±3°C, guardar la botella elegida en la incubadora a 20 °C, se debe dejar un sello hidráulico en la tapa de la botella (si es posible) para evitar el intercambio de oxígeno con el ambiente y titular el oxígeno disuelto de la otra (ODI) utilizando el método químico descrito en el numeral 3.1.
- Después de cinco (5) días de incubación, se titula el oxígeno restante (ODF) de la botella guardada utilizando el método químico descrito en el numeral 3.1.

Parámetros de tritación:

V incremento	0,05 ml
Veloc.titr.	max. ml/min
Deriva v.med.	20 mV/min
Tiempo espera	38 s
V inicial:	no
Pausa	15 s
Entrada de med:	2
Temperatura	29,9 °C

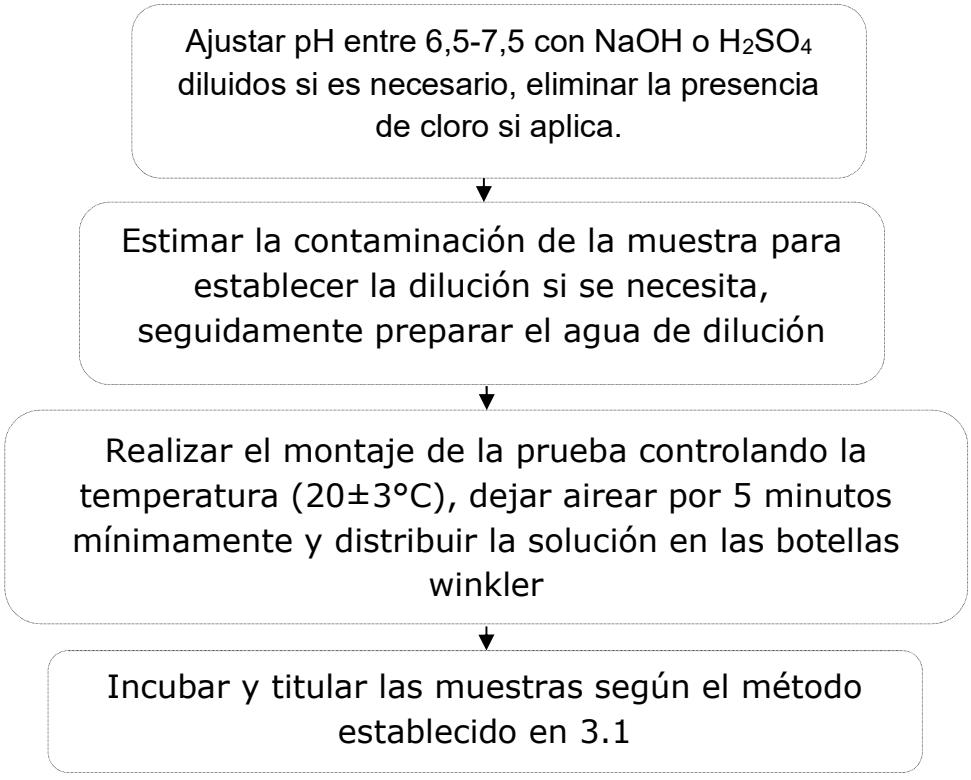
Condiciones de parada:

V parada:	abs
V parada	20 ml
Parada U	no mV
EP parada	1

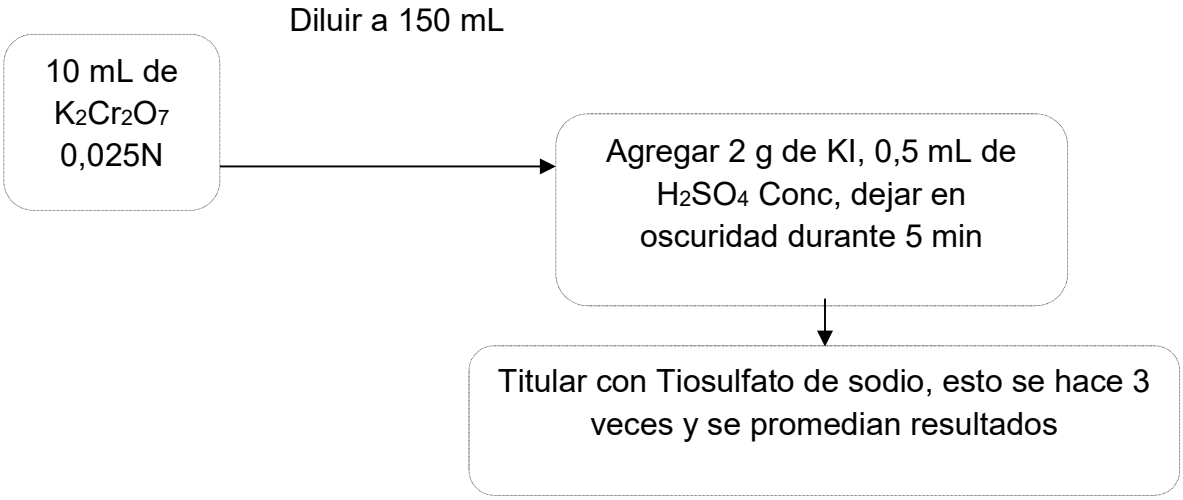
Veloc.rell.	max. ml/min
Estadística:	
Status:	no
Evaluación:	
Criterio de EP	50 mV
Reconoc.EP:	todo
EP fijado 1 U	no mV
pK/HNP:	no
Preselecciones:	
Llamada ident:	todo
Llamada peso:	todo
Puls.activación:	no

9. ALGORITMOS

MONTAJE DE LA PRUEBA



ESTANDARIZACIÓN DEL TIOSULFATO



10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

La demanda bioquímica de oxígeno puede determinarse por la siguiente ecuación:

DBO mg/L = (ODI-ODF)/P

Donde P es la fracción volumétrica (Volumen de mta. /Volumen de la solución).

El volumen de la solución es el volumen de la botella winkler.

Reemplazando P se tiene que:

DBO = (ODI-ODF)/(volumen de muestra)/300mL

Haciendo una organización de la ecuación queda:

DBO = (ODI-ODF) x 300 mL/Volumen de muestra

Cuando se hacen diluciones de la muestra diluida, esta se debe tener en cuenta en la ecuación.

Cuando se utiliza inóculo se debe restar de la DBO obtenida el consumo de oxígeno correspondiente al inóculo.

Se debe lograr que el agua de dilución tenga un consumo o captación (ODI-ODF) no mayor de 0,2 mg/L, además el oxígeno disuelto final (ODF) de la muestra diluida debe estar comprendido entre 1 mg/L y 8 mg/L preferiblemente.

Estandarización del tiosulfato 0,02N:

$$\text{Normalidad del TIO} = \frac{\text{Volumen de } K_2Cr_2O_7 \text{ 0,025 N titulado, mL}}{\text{Volumen de TIO empleado, mL}} \times 0{,}025$$

11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

La diferencia entre el oxigeno inicial y final debe ser preferiblemente mayor o igual a 2 mg/L para aguas inoculadas, y mayor o igual a 1 mg/L para residuales.

11.1 Control del agua de dilución: El agua de dilución no se debe almacenar cuando la DBO se va a determinar sin inhibir la nitrificación, ya que pueden desarrollarse organismos nitrificantes durante este tiempo. Además, se debe determinar el oxígeno disuelto inicial y el final (después de 5 días de incubación), por diferencia determinar la DBO del agua de dilución y mirar que su captación o consumo no exceda de 0,2 mg/L. Si el criterio no se cumple, mejore la calidad del agua purificándola o utilice agua de una segunda fuente que proporcione mejores condiciones.

11.2 Patrones de seguimiento: Se deben procesar regularmente patrones de referencia que abarquen distintos intervalos del método, se tienen establecidos que: estándar de ácido L glutámico mas glucosa 1+1, 30 mg/L equivalen teóricamente a una DBO de 19,8 ±3,05 mg O_2/L, estándar de ácido L glutámico mas glucosa 1+1, 300 mg/L equivalen teóricamente a una DBO de 198 ±30,5 mg O_2/L, estándar de ácido L glutámico mas glucosa 1+1, 3000 mg/L equivalen teóricamente a una DBO de 1980 ±305 mg O_2/L.

Cada lote ≥ 10 muestras a analizar, se debe:

- Analizar 2 blancos de agua de dilución. Si el blanco de agua de dilución promedio es > 0.2 mg/L, registre los datos e identifique claramente dichas muestras en los registros de datos.
- Analizar 3 patrones de 198 mg/L. % Error aceptado para el promedio ≤ 15.4%.
- Analizar el MRL por duplicado. Error aceptado ≤ 50%.
- Analizar un duplicado de muestra.

Se recomienda seguir el índice de dilución abarcando el rango del volumen tomar para completar a 300 mL según la tabla 1.

Tabla 1. DBO MEDIBLE CON DIVERSAS DILUCIONES DE MUESTRA EN BOTELLAS WINKLER DE 300 mL

Intervalo de DBO	Volumen de dilución (mL)
30000-105000	0.02
12000-42000	0.05
6000-21000	0.10
3000-10500	0.20
1200-4200	0.50
600-2100	1.00
300-1050	2.00
120-240	5.00
60-120	10.0
30-105	20.0
12-42	50.0
6-21	100
0-7	300

Según la literatura para una DBO confiable, el consumo de oxígeno debe ser de 2 mg/l, por lo tanto para la ecuación anterior se supone que (ODI-Odf)= 2 mg/l, así despejamos el volumen de muestra a diluir. Para hacer las diluciones se toma un valor por encima y un valor por debajo del valor dado, con estos valores se hacen dos diluciones teniendo en cuenta que si se usa el método yodométrico se deben hacer las mismas diluciones para incubación durante 5 días. Hay que tener presente que en ciertos casos hay que hacer diluciones a las diluciones.

12. MANTENIMIENTO

Se debe mantener el electrodo de platino con KCl 3M fresco y con buen volumen interno al igual que el respectivo émbolo.

13. BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps Wc, Braunt-Howland Eb, Baxter Te. Eds. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 24th Ed. Washington Dc: APHA PRESS;2023. Sección, SM 5210 B, 4500-O C.

14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/10/2010	300-03-10-23-1426	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-24: MÉTODO ANALÍTICO TITULACIÓN AUTOMÁTICA PARA DBO.
25/06/2011	300-03-10-23-0686	02	Se cambió el nombre del documento y en el ítem de bibliografía se modificó el dato del "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 20 ed., New York, 1999" por la de "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA – AWWA – WEF. 21 ed. 2005". DBO5: Incubación a 5 días y Modificación de Azida, SM 5210 B, 4500-O C.
08/03/2013	300-03-10-23-0294	03	Se adicionó el uso del inóculo a muestras de bajo contenido de DBO.
11/10/2013	300-03-10-23-1727	04	Se actualiza la referencia del Standard Methods Ed. 22.
10/04/2014	300-03-10-23-0523	05	Cambio en la parte de Algoritmo (Punto 8) en la especificación del ácido (H2SO4) para corrección del pH de la muestra a analizar; se cambió la frecuencia del control patrón de la prueba en el numeral 10.2 – Patrones de Seguimiento y se eliminó el porcentaje de recuperación al momento de la estandarización del Tiosulfato, como ítem de seguimiento y control.
24-06-2015	300-03-10-23-0789	06	En el punto tres *TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO,* se ajustó el tiempo para la realización del análisis, el cual queda: En ningún momento se debe empezar el análisis después de cuarenta y ocho (48) horas de tomada la muestra o bajo responsabilidad del usuario.
04/05/2016	300-03-10-23-0486	07	Se incluyó y corrigió lo siguiente: el intervalo de pH de trabajo de las muestras a 6.0-8.0 y la manera de ajustarlo, el intervalo de temperatura de siembra a 20±3°C, la inclusión del sello hidráulico en las botellas, el volumen mínimo de dilución por botella a 1%.
09/06/2016	300-03-10-23-0649	08	Se ajustan los volúmenes de adición de sulfato de manganeso y alkali-yoduro según el standard Methods Ed 22. Se anexa en el procedimiento: La sección 5210 B numeral 4 del Standard Methods Ed 22 "Preparatory Procedure" proporciona las pautas necesarias para los pretratamientos de las muestras, se deben seguir estos procedimientos cuando apliquen. Se elimina Skoog como referencia bibliográfica. Se estandarizará el tiosulfato cada mes.
05/10/2016	300-03-10-23-1303	09	Se actualiza el logo corporativo.
06/10/2017	300-03-10-23-1270	10	Se documenta la manera en que se puede analizar el cloro residual en la muestra para identificar interferencias.
10/11/2017	300-03-10-23-1429	11	Se detalla la elaboración y control del agua de dilución.

15/08/2018	300-03-10-23-1436	12	De acuerdo al Standard Methods Ed.23 de 2017 se especifican los siguientes cambios: En la sección de INTERFERENCIAS se indica que si el cloro residual no se disipa en el tiempo mencionado, puede ser eliminado mediante el "proceso de eliminación de cloro*", el cual también se especifica. Por otro lado, se ajusta el ALGORITMO de acuerdo a la eliminación de cloro. En la sección de REACTIVOS se adiciona el Na_2SO_3 y el inhibidor de nitrificación (TCMP). En la sección de PREPARACIÓN DE REACTIVOS se especifica la preparación de: - Solución de sulfito de sodio. - Solución de cloruro de amonio. En la sección de SEGUIMIENTO Y CONTROL se cambia la frecuencia de realización de este, así: "cada lote ≥ 10 muestras". Además, se adiciona la realización de un estándar igual al MRL como parte del control periódico.
19/11/2019	300-03-10-23-1429	13	En la sección 3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO se eliminó el numeral 3.2 Definición, y se tomó información de allí para engrosar lo especificado en el numeral 1. DESCRIPCIÓN, el cual se modificó parcialmente. Se adicionó la sección 2. – ALCANCE del método, así: "Este método es aplicable en las matrices acuosas superficiales, marinas y residuales tanto industriales como domésticas, en concentraciones a partir del MRL (definido experimentalmente) en adelante". Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-24 a D-7.2-20 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017.
18/07/2020	300-03-10-23-0792	14	Se elimina el estándar de 20 mg/L como control de los lotes de análisis. Se ajustan los criterios de aceptación de exactitud según standard methods ed 23.
06/10/2020	300-03-10-23-1125	15	Se ajustaron los controles de calidad a los solicitado en el standard methods ed 23.
18/01/2022	300-03-10-23-2981	16	Se ajustaron los controles de calidad: se incluye el análisis del MRL y análisis de muestra por duplicado. Se incluye en el procedimiento: Realizar al menos tres diluciones. Se permiten dos diluciones si la experiencia con las muestras asegura al menos una botella con mínimo aceptable de consumo y oxigeno residual. El laboratorio evalúa la posibilidad de más de tres diluciones cuando no haya información histórica de la muestra. Un análisis rápido de DQO, permite correlacionar los resultados y servir como guía para determinar diluciones. Las diluciones pueden ser preparadas directamente en las botellas. Posteriormente almacenar en la incubadora en ausencia de luz.
24/11/2023	300-03-10-23-2554	17	Se actualiza el documento para la determinación de DBO5 de acuerdo con la metodología normalizada de Standard Methods 5210 B, 4500-O C de 2022, edición 24.
09/07/2025	100-03-10-23-1338	18	Se corrige el año de edición de la versión 24 del standard methods (2023)

Última línea-------última línea------última línea