



MÉTODO ANALÍTICO DBO₅: INCUBACIÓN A 5 DÍAS – SENSOR BASADO EN LUMINISCENCIA, SM 5210 B, ASTM D888-18 MÉTODO C.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá

Código: D-7.2-40

Versión: 08

Revisó: Subdirector de Planeación y O.T.

Aprobó: Director General (E).

Fecha: 09 de Julio de 2025

Fecha: 09 de Julio de 2025

Resolución: 100-03-10-23-1338-2025

Páginas: 1 de 11

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 + O₂ + 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 basado en la determinación directa del OD es aplicable en las matrices acuosas superficiales, potables, subterráneas, marinas y residuales tanto industriales como domésticas, para concentraciones a partir de 2.0 mg/L (MRL determinado a partir de la experimentación base).

3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

3.1 Principio

El método se desarrolla de la siguiente manera, a una muestra en una botella Winkler bajo las siguientes condiciones: estar a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, aireada, diluida (si es necesario) y que el líquido ocupe todo el volumen de la botella, se lee el oxígeno inicial con la sonda instrumental basada en luminiscencia (compuesta por una lámina de detección incrustada de luminóforo, un emisor y un fotodetector), la cual provoca la excitación del luminóforo, quien se apaga en presencia de oxígeno, luego convierte la emisión de luminiscencia en señal eléctrica que da razón del cambio de fase en la luminiscencia de la muestra que se tenga. Este cambio de fase se utiliza para calcular las concentraciones de oxígeno disuelto.

Seguidamente, se incuba a 20°C , 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 (Óxido 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 ácido 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

- Sonda instrumental – Sensor basado en luminiscencia.
- 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.
- NaOH.
- H₂SO₄ Concentrado.
- Acido L glutámico.
- Glucosa (+) anhidra.
- KH₂PO₄.
- K₂HPO₄ anhidro.
- Na₂HPO₄.
- NH₄Cl.

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- CaCl_2 granulado.
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- Na_2SO_3 .
- Inhibidor de la nitrificación (TCMP).
- Capsulas de inoculo 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 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.
- **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 (NH_4Cl):** Disuelva 1,15g de NH_4Cl 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.
- **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 está al menos en 7,5 mg/L antes de su uso, de lo contrario, airee a una temperatura de $20 \pm 3^\circ\text{C}$ 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 4 ml de solución de inóculo por cada 300 ml de muestra.

- **Preparación del inóculo:** 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.
- **Factor de control POLYSEED (SCF):** Extraiga cuidadosamente una alícuota de la solución polyseed. Se recomienda preparar el control factor de semilla utilizando 15, 20, 25 y 30 ml de solución polyseed; sin embargo estos volúmenes pueden variar dependiendo de los procedimientos del laboratorio. El factor de control de semilla en los 5 días de incubación debe estar entre 0.6 y 1.0 mg/L, y calculándose con la siguiente fórmula.
- **SCF= [(D1-D)*F]**

Donde:

D1= OD del control de semilla antes de la incubación, mg/L

D2= OD del control de semilla después de la incubación, mg/L

F= (Volumen de semilla en muestra diluida)/ (volumen de semilla en el control de semilla).

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 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ 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 oxígeno 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 las muestras a procesar, con un volumen de 4 mL de la solución del inóculo por cada 300 mL de muestra. 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.
- Se procede a airear la muestra durante un tiempo mínimo de 5 minutos.
- En una botella Winkler limpia y seca 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 a la botella hasta rebosar, tapar rápidamente, este procedimiento se debe realizar mientras la muestra se encuentre en un intervalo de temperatura de 20±3°C. Las diluciones pueden ser preparadas directamente en las botellas. Posteriormente almacenar en la incubadora en ausencia de luz.
- Calibrar y verificar el equipo con la sonda, así: (muestra de aire saturada de agua)
 1. Agregue 3/4 de altura en agua grado reactivo a una botella winkler limpia de 300 mL y selle con tapón.
 2. Agitar vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos.
 3. Conectar la sonda al multiparámetro, lavar y limpiar la sonda, e introducirla a la botella con aire saturado de agua.
 4. Espere 10 min para que la botella de DBO y su contenido se equilibren a temperatura ambiente.
NOTA: La calibración debe estar dentro del 97 al 104% de la concentración teórica de oxígeno disuelto.
 5. Después de 10 min, encender el multiparámetro y presiona la tecla “CAL”.

Proceder a la lectura del oxígeno inicial de cada una de las muestras procesadas en el lote de trabajo, así:

- Lavar y secar la sonda e introducir a las respectivas botellas de lectura, encender la hélice y presionar la tecla “Enter” para determinar la concentración de oxígeno. Proceder de igual forma para la lectura de cada muestra.
- Seguidamente, guardar la botella en la incubadora a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, se debe dejar un sello hidráulico en la tapa de la botella (si es posible) y tapada con una caperuza de papel aluminio, para evitar el intercambio de oxígeno con el ambiente y pérdida por evaporación.
- Después de cinco (5) días de incubación, se lee el oxígeno restante (ODF) de la botella guardada utilizando el método por sonda instrumental basada en luminiscencia, como se describe anteriormente.

9. CALCULOS Y RESULTADOS

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

$$\text{DBO mg/L} = (\text{ODI}-\text{ODF})/P$$

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:

$$\text{DBO} = (\text{ODI}-\text{ODF}) / (\text{volumen de muestra}) \times 300\text{mL}$$

Haciendo una organización de la ecuación queda:

$$\text{DBO} = (\text{ODI}-\text{ODF}) \times 300 \text{ mL}/\text{Volumen de muestra}$$

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.

10. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

La diferencia entre el oxígeno 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 OD residual.

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 O₂/L, estándar de ácido L glutámico mas glucosa 1+1, 300 mg/L equivalen teóricamente a una DBO de 198 ± 30.5 mg O₂/L, estándar de

ácido L glutámico mas glucosa 1+1, 3000 mg/L equivalen teóricamente a una DBO de 1980 ±305 mg O₂/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 el MRL por duplicado. Error aceptado ≤ 50%.
- Analizar 3 patrones de 198 mg/L. % Error aceptado para el promedio ≤ 15.4%.
- Analizar un duplicado de muestra, y llevar a la carta control.

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. Hay que tener presente que en ciertos casos hay que hacer diluciones a las diluciones.

11. MANTENIMIENTO

Se debe mantener calibrado la sonda mientras se realice el montaje de la prueba.

12. BIBLIOGRAFIA

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,ASTM D888–18 Method C.

13. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
15-08-2018	300-03-10-23-1436	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-79: MÉTODO ANALÍTICO DBO5: INCUBACIÓN A 5 DÍAS – SENSOR BASADO EN LUMINISCENCIA, SM 5210 B, ASTM D888-18 MÉTODO C.
14/02/2019	300-03-10-23-0169	02	En la sección PRINCIPIO (2.1) se adiciona información referente a la composición de la sonda de luminiscencia y su respectivo funcionamiento en la detección del oxígeno disuelto, así: "(compuesta por una lámina de detección incrustada de luminóforo, un emisor y un fotodetector), la cual provoca la excitación del luminóforo, quien se apaga en presencia de oxígeno, luego convierte la emisión de luminiscencia en señal eléctrica que da razón del cambio de fase en la luminiscencia de la muestra que se tenga. Este cambio de fase se utiliza para calcular las concentraciones de oxígeno disuelto." Además, dentro del alcance de aplicación del método mencionado allí, se eliminaron las matrices potable y lluvia, puesto que no están verificadas. En la sección procedimiento, se modifica la inoculación de las muestras, pasando de "Inocular si es necesario" a "Inocular las muestras a procesar, con un volumen de 10 mL de la solución del inóculo por cada 300 mL de muestra."

			<p>En la sección PROCEDIMIENTO se adiciona claridad frente a la calibración, verificación y uso de la sonda de luminiscencia, así: “Calibrar y verificar el equipo con la sonda, así: (muestra de aire saturada de agua)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agregue ¼ de pulgada de agua grado reactivo a una botella winkler limpia de 300 mL y selle con tapón. 2. Agitar vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos. 3. Espere 30 min para que la botella de DBO y su contenido se equilibren a temperatura ambiente. <p>NOTA: La calibración debe estar dentro del 97 al 104% de la concentración teórica de oxígeno disuelto.</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. Verificar la calibración: conectar la sonda al multiparámetro, lavar y limpiar la sonda, e introducirla a la botella con aire saturado de agua. 5. Después de 10 min, encender el multiparámetro y presiona la tecla “CAL”. <p>Proceder a la lectura del oxígeno inicial de cada una de las muestras procesadas en el lote de trabajo, así:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lavar y secar la sonda e introducir a las respectivas botellas de lectura, encender la hélice y presionar la tecla “Enter” para determinar la concentración de oxígeno. Proceder de igual forma para la lectura de cada muestra.” <p>En el ALGORITMO se incluye la calibración, verificación y lectura del oxígeno disuelto con la sonda de luminiscencia.</p>
19/11/2019	300-03-10-23-1429	03	<p>En la sección 3 - FUNDAMENTOS DEL MÉTODO se elimina el numeral 3.2. Definición, donde parte de la información se toma para alimentar la DESCRIPCIÓN y la otra se usa para incluir la sección 2 – ALCANCE, así: “Este método basado en la determinación directa del OD es aplicable en las matrices acuosas superficiales, potables, subterráneas, marinas y residuales tanto industriales como domésticas, para concentraciones a partir de 1,5 mg/L (MRL determinado a partir de la experimentación base)”.</p> <p>Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-79 a D-7.2-40 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017.</p>
18/07/2020	300-03-10-23-0792	04	<p>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.</p>
06/10/2020	300-03-10-23-1125	05	<p>Se ajustaron los controles de calidad a los solicitado en el standard methods ed 23.</p>
18/01/2022	300-03-10-23-2981	06	<p>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 oxígeno 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.</p>
24/11/2023	300-03-10-23-2554	07	<p>Se incluye: se debe evitar la pérdida por evaporación del sello hidráulico. Se realiza ajuste de acuerdo al standard methods ed 24.</p>
09/07/2025	100-03-10-23-1338	08	<p>Se corrigió el año de publicación de la versión vigente de Standard Methods (2023).</p>

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