

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO PARA AGUAS DE ORIGEN RESIDUAL Y SUPERFICIAL EN EL
LABORATORIO DE AGUAS DE CONSTRUCSUELOS LTDA**

Lici Damar Cristina Díaz Bambagüé

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE
OXÍGENO PARA AGUAS DE ORIGEN RESIDUAL Y SUPERFICIAL EN EL
LABORATORIO DE AGUAS DE CONSTRUCCIONES LTDA**

Lici Damar Cristina Díaz Bambagüé

**Trabajo de grado presentado como
Requisito parcial para optar al título de Químico**

Director:

OLGA LUCIA HOYOS SAAVEDRA

GIPEL

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Asesor:

CAROLINA CASTRO HERNANDEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

Nota de aceptación

Director _____
Olga Lucia Hoyos Saavedra

Jurado _____

Jurado _____

17 de Noviembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

Están rotas mis ataduras

Pagadas mis deudas

Mis puertas de par en par: ¡me voy a todas partes!

Dedicatoria

Dedicado a DIOS que me ama como soy

A mi PADRE que me aconseja con sabiduría

*A mi MADRE que me ama con paciencia y ternura, y me tiene siempre en sus
oraciones*

A mi HERMANITA que es sangre mía. A quien debo dar ejemplo

Agradecimientos

*A todo el equipo de laboratorio de aguas de la empresa Construcsuelos
Suministros*

A los profesores que orientaron mi formación den Química

A mi directora de grado

Y a unos pocos buenos amigos

TABLA DE CONTENIDO

1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	13
1.3 OBJETIVOS.....	14
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
1.4 MARCO TEORICO	15
1.4.1 El recurso hídrico en Colombia	15
1.4.2 Calidad de los laboratorios analíticos	18
1.4.3 Estandarización.....	19
1.4.4 Control de calidad	20
1.4.5 Análisis estadístico de datos	22
1.4.6 Estimación de la incertidumbre	24
1.4.7 Calidad del agua.....	27
1.4.8 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	29
1.4.9 Medición del oxígeno disuelto	31
1.4.10 Laboratorio de análisis de agua de Construcsuelos suministros Ltda	33
2. METODOLOGÍA	35
2.1 Reactivos, equipos y vidriería.....	35
2.1.1 Reactivos	35
2.1.2 Equipos	35
2.1.3 Vidriería	36
2.2 Recolección de inóculo y muestras	36
2.2.1 Recolección de la cepa para inoculación.....	36
2.2.2 Recolección de muestras	38
2.3 Preparación de estándares.....	39
2.4 Calculo de la Demanda Bioquímica de Oxígeno	40
2.5 Etapa preliminar de la estandarización	41

2.5.1 Comparación de la respuesta del oxímetro frente al método de modificación de azida	42
2.5.2 Adaptación y control del inóculo.....	43
2.5.3 Medición de blancos de procedimiento.	43
2.5.4 Medición de patrones límite de 3 mg/L O ₂ , 4mg/L O ₂ 5 mg/L O ₂ y 10 mg/L O ₂	43
2.5.5 Montaje de estándares de control intermedio de 50 mg/L O ₂ , 100 mg/L O ₂ , y alto 500 mg/L O ₂ y 1000 mg/L O ₂	43
2.6 Estandarización.....	44
2.7 Análisis estadístico de datos	45
2.8 Aplicación del ensayo de DBO ₅ en muestras de diferente origen	46
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	47
3.1 Resultados de la comparación de los métodos de lectura de O ₂ disuelto	47
3.2 Resultados de la adaptación del inóculo o semilla.....	56
3.3 Verificación del agua de dilución o blancos de procedimiento	62
3.4 Medición de patrones límite de 3 mg/L O ₂ , 4mg/L O ₂ y 5 mg/L O ₂ , de control intermedio de 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, y alto 500 mg/L y 1000 mg/L.....	64
4. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅).....	66
4.1 Montaje de Blancos.....	66
4.2 Montaje de estándares de control	67
4.3 Montaje de muestras.....	69
4.4 Tratamiento estadístico de datos	70
4.4.1 Rechazo de datos	71
4.4.2 Límite de detección del método.....	73
4.4.3 Precisión	73
4.4.4 Exactitud	75
4.5 Elaboración de documentos	76
4.6 Repetibilidad.....	76

4.7 Reproducibilidad	77
5. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	78
5.1 Cuantificación de las fuentes de incertidumbre	78
5.2 Expresión de la incertidumbre	79
6. DETERMINACIÓN DE LA DBO₅ EN DIFERENTES MUESTRAS DE ORIGEN RESIDUAL Y SUPERFICIAL.....	80
7. CONCLUSIONES	82
8. BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre la medición de oxígeno disuelto mediante electrodo de membrana y modificación de azida.....	33
Tabla 2. Reactivos utilizados para la estandarización del método.....	35
Tabla 3. Equipos utilizados en la estandarización del método.....	36
Tabla 4. Descripción de las actividades propuestas para la etapa preliminar de la estandarización.....	42
Tabla 5. Descripción de las actividades propuestas para la estandarización.....	44
Tabla 6. Volúmenes utilizados para siembra de las muestras para cada ensayo de la estandarización.....	45
Tabla 7. Valores promedio y cálculos estadísticos realizados para la comparación de las mediciones de oxígeno disuelto usando los métodos de electrodo de membrana y de modificación de azida.....	48
Tabla 8. Valores arrojados por el equipo de medición de oxígeno disuelto en el momento de la calibración.....	55
Tabla 9. Consumo de oxígeno en 5 días de incubación del agua residual doméstica usando alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL.....	57
Grafico 3. Primera curva de consumo de oxígeno por mililitro de inóculo utilizado realizada (Ensayo 1, tabla 9).....	57
Tabla 10. Consumo de oxígeno en 5 días de incubación del agua residual doméstica usando alícuotas de 7, 9, 10, 12 y 15 mL.....	58
Tabla 11. Consumo de oxígeno en 5 días de incubación del agua residual doméstica usando alícuotas de 7, 9, 10, 12 y 15 mL.....	59
Tabla. 12 DBO ₅ calculada para el inóculo para las pruebas que cumplen con un consumo de oxígeno mayor a 2 mg/L, es decir los ensayos 2 y 3.....	60
Tabla 13. Replicas realizadas para conocer el consumo de oxígeno del agua de dilución incubada durante cinco días.....	63

Tabla. 14 Magnitudes estadísticas calculadas para patrones de DBO₅ de 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 mg/L de O₂.....	64
Tabla 15. Blancos de agua de dilución obtenidos para los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.....	66
Tabla 16. Blancos inoculados y sus duplicados obtenidos en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.....	67
Tabla 17. Valores promedio obtenidos para el estándar bajo (10 mg/L) en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.	67
Tabla 18. Valores promedio obtenidos para el estándar medio (198±30 mg/L), en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.	68
Tabla 19. Valores promedio obtenidos para el estándar alto (1000 mg/L), en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.	68
Tabla 20. Valores promedio obtenidos para la muestra de origen residual M1, en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.	69
Tabla 21. Valores promedio obtenidos para la muestra de origen superficial M2, en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.	69
Tabla 22. Valores de oxígeno disuelto obtenidos para el blanco del agua de dilución (Ba) y blanco inoculado (Bi), y DBO₅ para los patrones de 10, 198 y 1000 mg/L O₂, y la muestra residual (M1) y superficial (M2).....	71
Tabla 23. Valores calculados de G para los valores del blanco de agua de dilución (Ba), blanco inoculado (Bi), patrones de 10, 198 y 1000 mg/L O₂ (P10, P198 y P1000 respectivamente), y las muestras residuales (M1) y superficial (M2).....	72
Tabla 24. Parámetros estadísticos calculados para las muestras corridas en la estandarización, \bar{x}= promedio, s= desviación estándar, %CV= coeficiente de variación y LC (95%) = límite de confianza al 95%.	74
Tabla 25. Exactitud en términos del porcentaje de error relativo (%Er) para cada uno de los datos de los patrones de rango bajo (Eb), medio (Em) y alto (Ea), y sus valores promediados.	75

Tabla 26. Cuadro adjuntado al documento de procedimiento, que resume los parámetros de calidad calculados para la metodología de demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅)..... 76

Tabla 27. Valores estadísticos calculados para los ensayos realizados por cada analista en los 7 días de estandarización de la metodología de DBO₅ . 76

Tabla 28. Valores de los contrastes t calculados para cada uno de los conjuntos de datos pertenecientes a los estándares y a las muestras ensayadas, por cada uno de los dos operarios en los 7 días de estandarización. 78

Tabla 29. Demanda bioquímica de oxígeno en aguas de diferente origen, analizadas por triplicado en el laboratorio de Construcsuelos Suministros Ltda..... 80

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Carga contaminante vertidas a los sistemas hídricos por algunos sectores en términos de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Nitrógeno Total (NT) y Fosforo Total (FT).....	15
Fig. 2 Efecto sobre el ciclo del agua por algunas actividades humanas..	17
Fig. 3 Presión de la calidad del agua en términos de ton DBO/ año por municipios.	31
Fig. 4 Vertimiento Mansiones del Norte	37
Fig. 6 Toma de muestra superficial	38
Fig. 7 Toma de muestra residual.....	39
Fig. 8 Sonda de medición de O ₂ disuelto	46
Fig. 9 Sensor voltamperométrico de O ₂ de Clark.....	47
Fig. 10 Sistema de obtención de agua desionizada en la empresa Construcsuelos Suministros Ltda	61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Tipos de distribución de probabilidad P(t) de la incertidumbre (μ) tipo B.	26
Gráfico 2. Grafica de la tempera vs la pendiente arrojada por el quipo en términos del %Sat/nA.	54
Gráfico 3. Primera curva de consumo de oxígeno por mililitro de inculo utilizado realizada, para volúmenes de 1, 2, 3, 4 y 5 mL de inculo.	55
Gráfico 4. Curva de consumo de oxígeno por mililitro de inculo utilizado realizada, para volúmenes de 7, 9, 10, 12 y 15 mL de inculo.....	56
Gráfico 5. Consumo de oxígeno por mililitro de inculo utilizado realizada, para volúmenes de 7, 9, 10, 12 y 15 mL de, curva realizada para la cepa recogida antes de la estandarización.....	60
Gráfico 6. Grafica que representa los valores de los patrones de 198 mg/L de O₂ a través de tiempo, usando agua residual como inculo, proveniente del sitio de muestreo “Mansiones de Neiva”	62
Gráfico 8. Diagrama de espina de pescado que relaciona todos los factores que aportan a la incertidumbre en la medición de patrón estándar de DBO₅ de 198 mg/L de O₂	80

1.1 RESUMEN

La alta demanda del ensayo de demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) exigido por la mayoría de entes de control, hace necesario que los laboratorios analíticos realicen el montaje de esta técnica bajo los lineamientos de calidad exigidos. En la empresa Construcsuelos Suministros Ltda se realizan monitoreos y ensayos para empresas privadas y de servicios públicos, las cuales llevan controles periódicos de calidad del agua utilizada que posteriormente descargan en los cuerpos hídricos para ser finalmente usada en procesos agrícolas y demás actividades básicas, la DBO_5 es un indicador de la contaminación por materia orgánica biodegradable presente en el agua. Dado que el laboratorio de aguas de la empresa Construcsuelos Suministros Ltda, recibe un aproximado de 18 muestras diarias que requieren el análisis de DBO_5 . Fue necesario realizar la estandarización del método siguiendo los procedimientos normalizados del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, incluyendo la elaboración de instructivos e informes que facilitan el desarrollo del ensayo para cualquier analista encargado. La determinación escogida para la realización de la práctica profesional, involucró el desarrollo de un método electrométrico para la lectura del oxígeno disuelto de la DBO_5 . A través de la revisión y consideración de los recursos se encontró que el laboratorio posee todos los reactivos, materiales y equipos para la realización del ensayo, y mediante el desarrollo de experimentos y pruebas específicas, fue posible construir la estandarización de la DBO_5 en el tiempo propuesto. Con la estandarización se logró establecer los parámetros de calidad del ensayo, calculándose una precisión del 20% y una exactitud del 10% en términos del porcentaje de error, además se estimó la incertidumbre del método. Como conclusión de esta pasantía, se puede afirmar que las herramientas aprendidas en la universidad, fueron aplicadas en el adiestramiento profesional adquirido en el montaje de la práctica, y además que se extienden las experiencias competentes al mejoramiento de la calidad de la formación en química, por medio de la renovación del método de DBO_5 implementando los lineamientos de calidad del método en el laboratorio Construcsuelos Ltda.

1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Construcsuelos Suministros Ltda es una organización de carácter privado, orientada hacia el análisis de aguas y suelos para construcción. La empresa suministra ensayos fisicoquímicos y microbiológicos de agua, que permiten establecer a los clientes la calidad de la misma, mediante técnicas como la espectrofotometría, gravimetría, y electrometría, entre otros ensayos. Para ensayos como la Demanda Bioquímica de Oxígeno, el laboratorio no cuenta con un proceso de validación y estandarización del método, que permita definir los parámetros de calidad a fin de conocer los niveles de confianza, la incertidumbre, posibles interferencias y limitaciones que garanticen que la empresa entregue resultados fiables a sus clientes, conforme a los reglamentos y lineamientos de calidad exigidos por las autoridades sanitarias, aun teniendo el equipo fisicoquímico y el recurso humano disponible. Para la técnica DBO_5 el laboratorio se encuentra acreditado por el método Winkler, sin embargo, debido a situaciones internas, este análisis quedo suspendido largo tiempo y es necesario realizar nuevamente el montaje de la técnica. El método validado de modificación de azida, bastante confiable y reproducible es engorroso y muy contaminante, debido a esto se ha decidido modificar la técnica por otra más práctica dado que la demanda de este análisis es bastante alta esto permitirá agilizar el trabajo del analista químico encargado.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el montaje, la adecuación y la estandarización del ensayo de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), en aguas de origen superficial y residual para la empresa Construcsuelos Suministros Ltda.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer los parámetros para obtener datos que permitan determinar los niveles de confianza; exactitud, linealidad, límite de detección, sensibilidad, repetibilidad, porcentaje de recuperación e incertidumbre del bioensayo DBO₅ usando la medición del oxígeno disuelto por electrodo de membrana. Mediante el método SM 5210 B y 4500 –O.G.
- Diseñar y dejar a servicio de la empresa los instructivos de trabajo y el informe de validación con los respectivos cálculos de la incertidumbre de las mediciones realizadas en el laboratorio para la técnica de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅).

1.4 MARCO TEORICO

1.4.1 El recurso hídrico en Colombia

Colombia cuenta con una gran cantidad de agua superficial y subterránea con enormes diferencias en cuanto a su calidad y uso, de las cuales el 40% está en riesgo de deterioro debido a factores como son la presencia de contaminantes y la susceptibilidad al cambio climático u otras actividades industriales. Hacia 1990 el rendimiento del recurso hídrico en Colombia era de 60 L/km², es decir seis veces mayor que el rendimiento hídrico mundial [1], sin embargo, actualmente la cantidad de agua ha disminuido, así como su calidad, en la figura 1, se muestran los principales sectores que afectan la calidad de agua en el país.

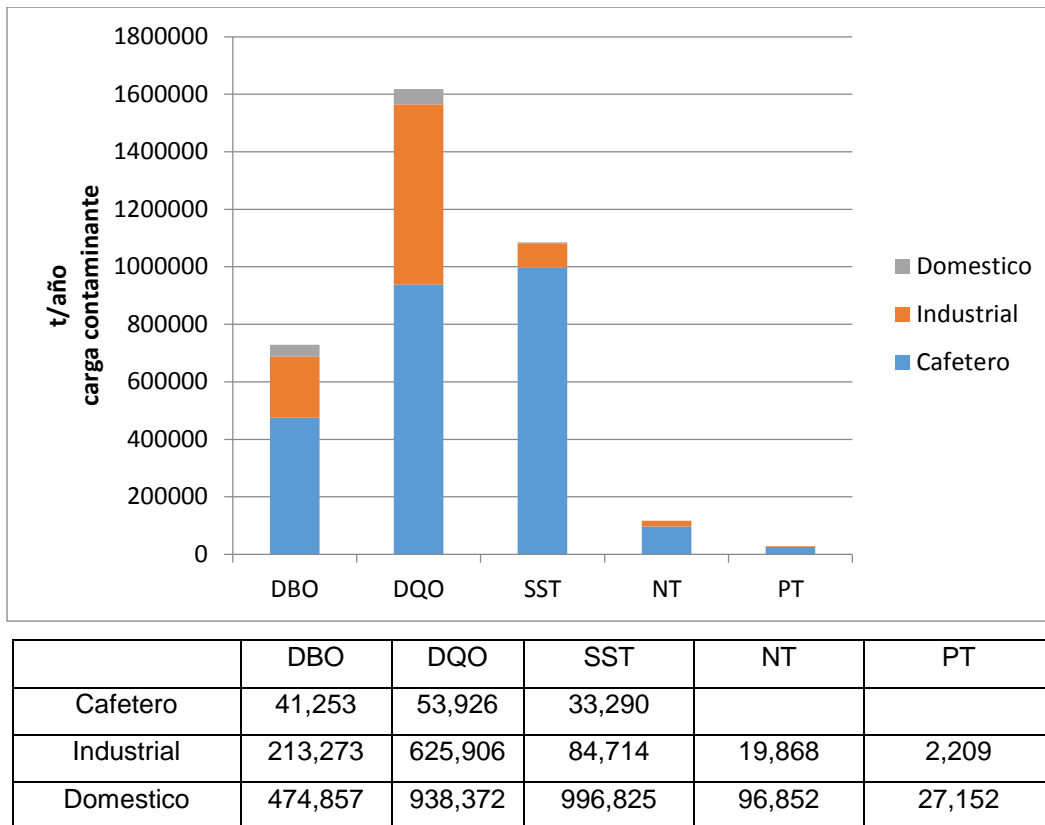


Fig. 1 Carga contaminante vertidas a los sistemas hídricos por algunos sectores en términos de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Solidos Suspendidos Totales (SST), Nitrógeno Total (NT) y Fosforo Total (FT). Jiménez Cisneros, Et al. (2012). Diagnóstico del agua en las Américas [Figura] Recuperado de <http://www.ianas.org/water/book/colombia.pdf>.

En Colombia pocos municipios tienen plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas, estas se vierten directamente a los ríos y quebradas y es una de las fuentes de aporte de nitrógeno, fósforo y materia orgánica. Es también frecuente el vertimiento de aguas residuales industriales que contienen metales pesados y sustancias tóxicas. Colombia no cuenta con un sistema de monitoreo continuo del uso del agua lo que dificulta los diagnósticos y las disposiciones del recurso.

El río Magdalena es el río más importante de Colombia, que posee una extensa red fluvial, estos recursos se han afectado por condiciones antrópicas generando efectos sobre el ciclo normal del agua [Fig. 2]. La forma de aprovechamiento y el uso inadecuado son factores determinantes en la disminución y afectación del recurso hídrico, sumado a la tala indiscriminada de árboles y ocupación de territorios protegidos que aumentan el riesgo de deterioro de las cuencas, contaminación que afecta la salud humana lo que se puede observar en la alta tasa de mortalidad por causa de enfermedades bacterianas de origen hídrico [2].

Debido a que la calidad del agua es un factor que limita su uso y disponibilidad, distintos ministerios tanto de Salud, Ambiente y Vivienda han determinado políticas y regulaciones que orienten la disposición de las aguas residuales [3]. Estas instituciones desarrollan actividades de control y seguimiento, y se encargan de evaluar o monitorear la calidad del agua, o exigir mecanismos de control para las industrias y empresas privadas y públicas que arrojen aguas contaminadas al ambiente [4]. En el marco del decreto 3930 de 2010 del ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, basado en el control de la calidad del recurso hídrico, tanto de aguas superficiales, subterráneas, marinas y estuarinas, incluidas las aguas servidas, así como de los vertimientos de aguas residuales, es el IDEAM la entidad que coordina con los laboratorios de referencia, normalizando y acreditando protocolos o metodologías analíticas requeridas [5].

El decreto 3930 de 2010 contempla, además, en sus artículos, tanto las definiciones, como las sustancias de interés sanitaria, así como un conjunto de artículos para el ordenamiento del recurso, con lo cual se disponen las pruebas químicas requeridas para establecer modelos de simulación de calidad, los valores

permisibles de contaminantes en aguas para consumo humano, destinación para recurso agrícola, uso pecuario, entre otros. Se hace hincapié también en el control de vertimientos de residuos líquidos, valores permisibles de vertimientos a cuerpos de agua, entre otras especificaciones aplicables a todo el manejo del agua en el país.

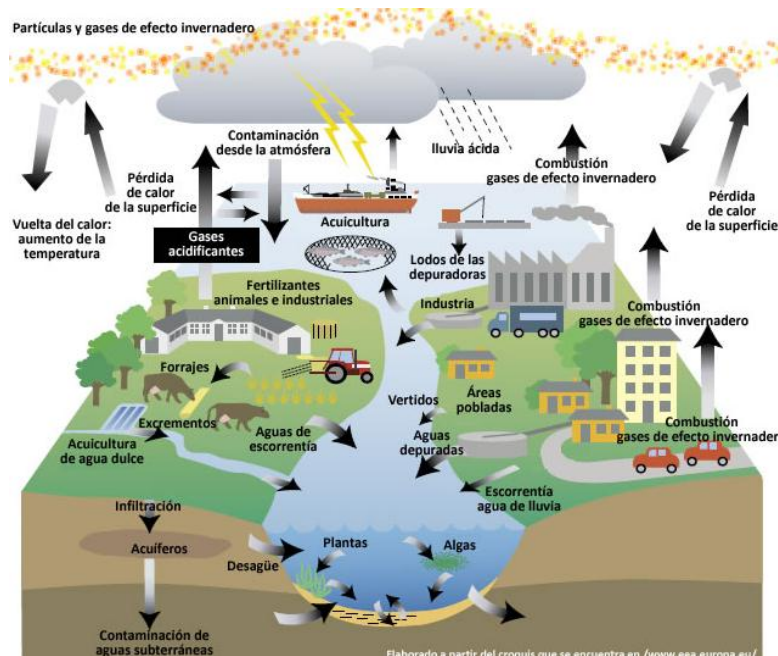


Fig. 2 Efecto sobre el ciclo del agua por algunas actividades humanas. Velilla Jil Javier. (2010). La contaminación de las aguas y el ciclo del agua. Recuperado <http://www.catedu.es/geografos>.

Sin embargo, en el caso de vertimientos, la normativa vigente es la 0631 de 2015 del ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Esta reglamenta los parámetros y valores permisibles de los vertimientos puntuales a aguas superficiales, y de alcantarillado público. Incluyendo aguas residuales domésticas (servicios sanitarios, aseo personal, cocina, lavado), y aguas residuales no domésticas (actividades comerciales, industriales, entre otras). Esta normativa especifica los valores permisibles de las determinaciones analíticas, tanto químicas como microbiológicas, para descargas provenientes de alcantarillado

público, actividades domésticas o industriales, incluyendo, ganadería, minería, hidrocarburos, empresas de producción alimentaria, entre otras actividades como la generación de energía eléctrica y la disposición de residuos sólidos [6].

Por otro lado, el decreto 3100 de 2003, del ministerio de ambiente, reglamenta las tasas retributivas por la utilización directa del agua, como receptor de estos vertimientos contaminantes, con base en la carga contaminante diaria arrojada al cuerpo superficial, que relaciona el caudal con la concentración de la carga contaminante, y se hace efectivo por cada kg de carga contaminante vertida al recurso hídrico.

1.4.2 Calidad de los laboratorios analíticos

La gestión de la calidad de un laboratorio analítico se refiere a la implementación de normas y parámetros establecidos global y nacionalmente, las cuales promueven la buena calidad de las mediciones, mediante la reglamentación de las prácticas del laboratorio. La International Organization of Standardization, desarrolla las normas ISO, las cuales son aplicadas a nivel mundial y tienen acción en todos los campos, siendo punto de referencia para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración. La norma ISO/IEC 17025 es la que contiene todos los requisitos que los laboratorios deben cumplir para demostrar que cuentan con un buen sistema de calidad.

Todo laboratorio de análisis de aguas desea implementar la norma, a fin de poseer la acreditación de los métodos que realiza, el ente acreditador, según el decreto 2269 de 1993 de los ministerios de Desarrollo Económico, Agricultura y Salud, debe tratarse de un organismo imparcial, nacional o internacional, que posee la competencia para realizar la certificación [7]. La obtención de certificación para un laboratorio, significa beneficios tales como la confianza en la medición de las pruebas realizadas, para las cuales la acreditación califica al laboratorio como competente, con lo que los laboratorios pueden hacer uso de estas acreditaciones para promover sus servicios, ya que posee los comprobantes confiables que aseguran su capacidad de competencia en el área, frente a sus clientes, y frente a otros laboratorios acreditados.

Uno de estos entes es el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM), este realiza procesos de acreditación mediante visitas de auditoría y la realización de pruebas de desempeño, que buscan evaluar que el sistema de gestión de calidad que cumple con lo establecido en la NTC ISO/IEC 17025, acatando los requisitos para todos los procedimientos, incluido el muestreo, o protocolos para el desarrollo de métodos de ensayo normalizados, no normalizados o los implementados por el laboratorio, Y que se siguen las guías contempladas en las normas, que dictan específicamente los procedimientos de exactitud en las medidas analíticas, certificación de material utilizado, expresión de la incertidumbre, los requisitos para los procesos de medición y los equipos de medición, entre otros. Ya que estos sistemas establecen una organización en la cual los factores que afectan la calidad son controlados, eliminan los errores posibles que puedan presentarse en los servicios prestados por la organización o empresa [8].

Es entonces el Sistema de Calidad el que asegura mediante diferentes mecanismos la confiabilidad de las medidas analítica. Este consta de una base documental, donde están descritos minuciosamente todos los procedimientos para la toma y análisis de muestras, los informes detallados de las estandarizaciones de los métodos y los procedimientos detallados para el cálculo de la incertidumbre de los mismos con el fin de controlar, minimizar y garantizar las mediciones analíticas y mantener un control estricto de los resultados [9].

1.4.3 Estandarización

La estandarización tiene como finalidad demostrar que las condiciones necesarias para llevar a cabo un método para la cuantificación de un analito determinado en un laboratorio se cumplen. Permite obtener los valores de parámetros que se utilizan como criterios de evaluación de la confianza de una medida analítica demostrando que el método se comporta de acuerdo a los requerimientos. Estos parámetros son la exactitud, la precisión, la linealidad, el límite de detección, la sensibilidad y el porcentaje de recuperación. Si el laboratorio cuenta con métodos normalizados, como por ejemplo los métodos ISO, AOAC, o Standard Methods, posee la ventaja de que ya cuenta con información amplia acerca del

comportamiento del método, así a la hora de estandarizar el ensayo bajo las condiciones específicas del laboratorio, se espera observar comportamientos dentro valores coherentes para las condiciones dadas [10].

Una estandarización posee diferentes etapas:

- La etapa preliminar; que permite orientar la estandarización, puesto que es aquí donde se selecciona el método más adecuado para la determinación de un analito.
- Parte experimental o de mediciones; donde se establecen mediante mediciones programadas los diferentes atributos del método y también se evalúan condiciones o variables que puedan afectar los procesos de medición.
- Estandarización que consiste en el procesamiento de muestras y reporte de datos en los formatos destinados para ello, a fin de obtener una cantidad de datos suficientemente amplia para tratar estadísticamente los mismos y hallar así los límites de detección instrumental, límites de detección del método, exactitud, precisión, sensibilidad, porcentaje de error, y porcentaje de recuperación [11].

1.4.4 Control de calidad

Un buen control de calidad para los métodos normalizados del Standard Methods, consiste en los siguientes elementos [12]:

- IDC (demostración inicial de la capacidad del método): que muestra la competencia del desarrollo del método para obtener resultados aceptables para cada analito.
- LDM (determinación del límite de detección del método): que se calcula para cada analito de interés y para cada método utilizado antes de analizar cualquier muestra, mediante la fórmula siguiente:

$$LDM = C_{Eb} + t_{n-1} \times s \text{ [Ecuación 1]}$$

Dónde:

C_{Eb} = Concentración del estándar bajo.

t = es un valor dependiente de los grados de libertad ($n-1$), y a un nivel de confianza del 99%.

s = desviación estándar de las medidas realizadas.

- BR (blanco de reactivos o blanco del método): que consiste en el agua utilizada y todos los reactivos incluyendo preservantes que normalmente sean usados en la corrida de las muestras durante todo el proceso analítico.
- BF (blanco fortificado o el estándar control de laboratorio): una muestra para la cual se conoce la concentración del analito de interés y es utilizado para evaluar el desempeño del laboratorio y la recuperación del analito.
- MF (matriz fortificada): que es un control adicional donde se prepara una muestra a la cual se le adiciona una cantidad conocida de analito antes de llevar a cabo el procedimiento del método.

Y además duplicado de la matriz fortificada, cartas de control y acciones correctivas.

Las cartas de control usadas en laboratorios de análisis representan diagramas de precisión y valores de exactitud para el control de calidad de las muestras, blancos, blancos fortificados, matrices fortificadas y se construyen a partir del promedio y la desviación estándar de un especificado número de mediciones del analito de interés [12]. Las acciones correctivas se realizan cuando los datos de los límites de control se encuentran fuera de los límites de aceptabilidad o exhiben tendencias de errores inaceptables en el procedimiento analítico y se toman rápidamente a fin de determinar y eliminar las fuentes de error, los datos no se reportan hasta que se identifique la causa del problema y se corrija.

1.4.5 Análisis estadístico de datos

Por otra parte, la calidad analítica involucra la estimación de los errores aleatorios y sistemáticos involucrados en la medición. A continuación, se definen los criterios de aceptación que conceden los atributos a la metodología analítica.

Diferentes conceptos estadísticos son utilizados a fin de conocer estos dos tipos de errores, y se presentan como los parámetros de calidad de la metodología analítica, estos son:

- **Promedio (\hat{x}):** O media aritmética, es la suma de todas las medidas (x_i) dividida por el número de mediciones (n). Indica el valor medio del grupo de valores [13].

$$\hat{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{[Ecuación 2]}$$

- **Desviación estándar (s):** Indica el grado de dispersión de las mediciones analíticas [13].

$$s = \sqrt{\sum \frac{(x_i - \hat{x})^2}{(n-1)}} \quad \text{[Ecuación 3]}$$

- **Coeficiente de variación (%CV):** o desviación estándar relativa es una medición de la variabilidad de las mediciones [13].

$$\%CV = \frac{s}{\hat{x}} \times 100 \quad \text{[Ecuación 4]}$$

- **Límite de confianza (LC):** Son los valores extremos del intervalo de confianza en el cual se encuentra la magnitud real de la medición analítica, y vienen dados por [13]:

$$\bar{x} \pm t_{n-1} \times \frac{s}{n} \text{ [Ecuación 5]}$$

Donde el valor de t depende de del grado de confianza requerido, y $n-1$ hace referencia al número de grados de libertad.

Existen además pruebas estadísticas que permiten hacer análisis más detallados, los contrastes de significación, por ejemplo, presentan diferentes herramientas estadísticas que permiten comparar conjuntos de datos y establecer si existen diferencias significativas entre ellos, para lo cual se emplean diferentes conceptos que son aplicados en el estudio del análisis estadístico [14]:

- **Hipótesis nula:** Las pruebas de contraste de significación están encaminadas a demostrar la veracidad de una hipótesis conocida como hipótesis nula, en la cual se supone que los datos obtenidos no están sujetos a errores sistemáticos, si no solamente a errores aleatorios [14].
- **Contraste t estadística:** Se utiliza cuando se quieren comparar dos medias experimentales y hallar si existe una diferencia significativa entre dos conjuntos de datos, se utiliza para analizar los errores sistemáticos [14].
- **Contraste F:** Se utiliza para comparar las desviaciones estándar de dos metodologías, con lo cual se lleva a cabo un análisis de los errores aleatorios involucrados en los ensayos [14].
- **Contraste de Grubbs:** Al igual que el contraste de Dixon, es utilizado para el análisis de posibles datos anómalos para muestras pequeñas (3 a 7). Este permite realizar el rechazo de datos atípicos que pueden ser atribuidos a errores humanos [14]:

$$G = \frac{|\text{valor sospechoso} - \bar{x}|}{s} \quad \text{[Ecuación 6]}$$

Además, se definen los criterios de la aceptación de la estandarización, es decir las propiedades definitivas que describen la calidad de la metodología analítica:

Exactitud: Es definida como la proximidad entre el valor medio obtenido de un conjunto de resultados y el valor de referencia aceptado; normalmente se expresa en términos de error. Para la exactitud se tiene referencia los patrones o estándares de control preparados en el laboratorio. La concentración de estos patrones está localizada dentro del rango de aplicación del método [15].

Precisión: Esta indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para duplicados de una misma muestra, generalmente se expresa en términos de la desviación estándar, aunque también se puede mediante el coeficiente de variación [15].

Repetibilidad: Es la medida de precisión de datos obtenidos por un solo analista [15].

Reproducibilidad: Es la medida de la precisión de los datos obtenidos por dos o más analistas, o dos laboratorios diferentes [15].

1.4.6 Estimación de la incertidumbre

Todas las mediciones analíticas vienen acompañadas de incertidumbre la cual se refiere a una desviación de la magnitud de la medida y está dada por factores sistemáticos y aleatorios que afectan la medición misma.

La incertidumbre de un resultado puede surgir de diferentes fuentes, algunas de las cuales pueden ser identificadas y de esta forma obtenerse una incertidumbre global que es una combinación de el efecto de todas las fuentes analizadas.

El proceso de estimación de la incertidumbre de una medida, puede definirse, a groso modo con los siguientes conceptos:

- **Identificación del mensurando:** que consiste en especificar qué es lo que se va a medir, es la magnitud que se va a someter a la medición, en el análisis químico generalmente, el mensurando corresponde a una concentración de un analito [16].
- **Incertidumbre típica:** Es la incertidumbre asociada al resultado de una medición expresada en forma de desviación típica [16].
- **Desviación típica combinada:** Se representa por u_c y se calcula a partir de la desviación típica asociada a cada magnitud de entrada [16].
- **Magnitud de entrada:** Los componentes que afectan a la incertidumbre, también son llamados “magnitudes de entrada”, la incertidumbre asociada a esto puede ser agrupada en dos tipos, llamados A y B [17].
- **Incertidumbre tipo A:** Se utiliza cuando se realizan observaciones repetidas de una magnitud de entrada bajo las mismas condiciones de medición [17].
- **Incertidumbre tipo B:** Se utiliza cuando el análisis de una magnitud no se realiza mediante el uso de medidas repetidas y se obtiene información de la incertidumbre mediante el resultado de medidas anteriores, especificaciones del fabricante o datos suministrados por empresas de calibración [17].

La incertidumbre tipo B puede evaluarse suponiendo una distribución de probabilidad para las magnitudes de entrada:

- **Distribución rectangular:** Cuando a la variable de entrada establece un límite $(-a, +a)$, dentro del cual cualquier valor de x es igual mente probable, es decir la función de probabilidad $P(t)$ es constante. Por ejemplo, la resolución de un instrumento digital o la tolerancia, Así la desviación típica es [17]:

$$U = \frac{|a|}{\sqrt{3}} \text{ [Ecuación 7]}$$

- **Distribución triangular:** Cuando los valores cercanos al valor central son más probables que los valores extremos. Por ejemplo, la incertidumbre de una bureta. La desviación típica es [17]:

$$U = \frac{|a|}{\sqrt{6}} \text{ [Ecuación 8]}$$

- **Distribución normal:** Cuando se realizan mediciones experimentales repetidas. Generalmente los informes de calibración de los instrumentos se realizan usando esta distribución. Aquí la incertidumbre típica es

$$U = \frac{|s|}{\sqrt{n}} \text{ [Ecuación 9]}$$

Donde s es igual a la desviación estándar de las medidas realizadas y n es igual al número de medidas realizadas [18].

- **Distribución tipo U:** Cuando los valores más probables son los de los extremos [18]:

$$U = \frac{|a|}{2} \text{ [Ecuación 10]}$$

El siguiente gráfico muestra las diferentes formas en que puede darse la distribución de la incertidumbre:

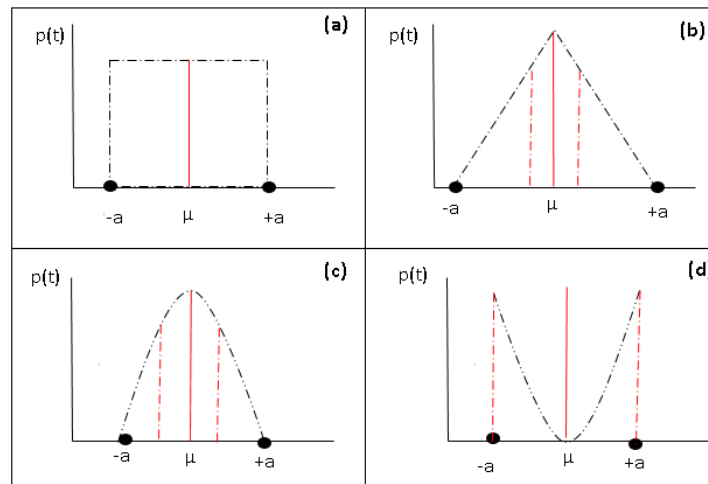


Gráfico 1. Tipos de distribución de probabilidad $P(t)$ de la incertidumbre (μ) tipo B. a) distribución rectangular, b) distribución triangular, c) distribución normal, d) distribución tipo U.

- **Incertidumbre combinada o incertidumbre total estándar:** Cada una de las incertidumbres calculadas para las magnitudes de entrada deben combinarse para de esta forma obtener la incertidumbre total estándar (u_c) [19]

- **Incertidumbre expandida:** Finalmente, para caracterizar la calidad de las medidas analíticas, es necesario conocer un intervalo dentro del cual exista una alta probabilidad de encontrar valores atribuibles al mensurando. El cálculo de la incertidumbre expandida conduce a obtener estos valores límite [19]. Esta incertidumbre se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar (u_c) por un factor de cobertura “ k ” [19].
- **Factor de cobertura:** El factor de cobertura depende de la probabilidad en la cual se desea encontrar el valor verdadero de la medición. Normalmente se utiliza el valor de $k=2$, el cual asume una distribución normal y un intervalo de confianza del 95% [19].

1.4.7 Calidad del agua

Las condiciones iniciales de la calidad de los cuerpos de agua, se ven afectadas por las cargas contaminantes arrojadas con y sin tratamiento previo, provenientes de las actividades humanas realizadas y factores ambientales. Estas cargas contaminantes ejercen una presión debida a las aguas residuales domésticas e industriales, las originadas por producción agrícola y ganadera entre otras actividades como compuestos procedentes de las lluvias y aguas utilizadas en la producción minera. La capacidad de depuración de los cuerpos de agua, también hace parte de la evaluación de la calidad de los cuerpos receptores.

El agua es monitoreada mediante un conjunto de indicadores llamado sistema de indicadores hídricos, estos indicadores tienen en cuenta tanto el sistema hídrico natural, como las interferencias humanas que afectan al mismo. Dentro del segundo grupo de indicadores, es decir, los de causas antrópicas, se abordan tres temas fundamentales; los primeros son los que evalúan la presión por contaminación del uso del agua, el segundo se refiere a la calidad hídrica, y a la presión debida a la contaminación sobre la calidad del recurso, y el último indica la vulnerabilidad del agua [20]. La evaluación de la calidad del recurso se hace con

base a las características fisicoquímicas y microbiológicas, análisis de concentraciones de compuestos, metales, nitrógeno amoniacal, oxígeno disuelto, el índice de la calidad del agua (ICA), y el Índice de Alteración Potencial a la Calidad del Agua (IACAL).

Las presiones por carga de contaminante de un cuerpo superficial, involucran la estimación de las cargas contaminantes mediante la determinación de variables fisicoquímicas como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Nitrógeno Total (NT) y Fosforo Total (FT). El análisis de las condiciones de calidad del agua, por otro lado, se realiza con base al ICA, este incluye 6 variables, para Colombia, estas son: oxígeno disuelto, demanda química de oxígeno, conductividad eléctrica, SST, pH y la relación NT/FT.

Los índices son la manera de resumir la gran cantidad de datos recogidos para el análisis de una fuente hídrica, facilitando la comprensión de estos resultados a personas no especializadas. Entre las ventajas que representa la obtención de estos índices se encuentra que pueden proveer información a las autoridades o ente encargado de la toma de decisiones para el manejo de los recursos, priorizando las necesidades de este, por otro lado, es posible realizar una comparación de la calidad del agua en diferentes zonas geográficas, acompañada de una aplicación de la normatividad exigida para el uso del agua, así como un monitoreo del comportamiento de la calidad del agua en diferentes periodos ambientales, además de servir de apoyo para las investigaciones científicas de los cuerpos hídricos. Entre sus posibles limitaciones, se mencionan que no proporcionan información completa acerca de dónde provienen los contaminantes, con lo que no se puede realizar un análisis completo del riesgo, además, según la forma de muestreo, y el periodo de tiempo en que se realiza, estos indicadores suelen no ser lo suficientemente objetivos [21]. La demanda bioquímica de oxígeno es un factor importante en el análisis de los índices de calidad del agua, esta se define de manera amplia a continuación:

1.4.8 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

Dentro de los contaminantes expulsados a los cuerpos de agua, la carga debido a materia orgánica puede ser evaluada mediante diferentes métodos dependiendo de sus características físicas y químicas. Los métodos más utilizados son: la Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO), la Demanda Química de Oxígeno (DQO), el Carbono Orgánico Total.

La demanda bioquímica de oxígeno es el parámetro más ampliamente aplicado para la determinación de contaminación orgánica tanto en aguas residuales como superficiales. Este ensayo involucra la medición del oxígeno disuelto usando microorganismos en la oxidación biológica de la materia orgánica, es una medida para calcular la cantidad de oxígeno necesaria para degradar la materia orgánica biodegradable presente en una muestra de agua, por acción de microorganismos aerobios.

El método de DBO_5 consiste en llenar una botella de tamaño específico con muestra diluida e inoculada, e incubarla a una temperatura específica por 5 días. El oxígeno disuelto es medido antes y después de la incubación, y la DBO es calculada a partir de la diferencia entre el oxígeno final e inicial [22].

Para asegurar los resultados obtenidos en el ensayo, la muestra debe ser diluida con un agua especial llamada agua de dilución que contiene los nutrientes adecuados y la cantidad de oxígeno suficientemente disponible para ser consumido durante el periodo de incubación, así que normalmente muchas diluciones son preparadas para cubrir el rango posible de valores.

Un gran número de factores, como por ejemplo compuesto solubles, partículas orgánicas, sólidos suspendidos, compuestos oxidados y reducidos de hierro y azufre, entre otros pueden afectar la precisión y la exactitud de la media de la DBO [23], las formas reducidas de nitrógeno como el amoníaco y el nitrógeno orgánico, pueden ser oxidadas por microorganismos y ejercer demanda nitrogenacea [24]. La demanda nitrogenacea es considerada como una interferencia de la DBO y esta puede ser prevenida por el uso de un inhibidor químico.

La nitrificación ocurre debido a la materia orgánica no carbonacea, como el amoníaco que es producido durante el hidrolisis de proteínas de las que son responsables las bacterias autótrofas al oxidar el amoníaco a nitrito y posteriormente a nitrato [25]. Cuando esto ocurre, en el ensayo de DBO_5 se dan interpretaciones erróneas de los datos obtenidos, por ejemplo; concluir que el proceso de tratamiento de una planta de agua residual no se está llevando bien cuando en la realidad si es eficiente.

La demanda bioquímica de oxígeno carbonacea se obtiene cuando la interferencia por la demanda nitrogenacea es evitada por pre tratamiento de la muestra como la pasteurización, la cloración y tratamientos ácidos o el uso de inhibidor como azul de metileno, tiourea, 2-Cloro- 6-(triclorometil) piridina entre otros [26].

Por otra parte, en Colombia, la carga de materia orgánica biodegradable vertida a los ríos para el año 2012 alcanzo 756945 ton/año, lo que equivale a 2102 ton/día según el Estudio Nacional del Agua (ENA). Y del total de carga vertida, la industria portó el 28%, el sector doméstico el 69% y el sector cafetero el 3%. La mayor cantidad de contaminación por materia orgánica biodegradable calculada con el ensayo de DBO_5 se centra en los municipios de la región andina; Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla, Cúcuta, Villavicencio y Manizales. La presión sobre la calidad del agua, evaluada en términos de la DBO, permitió concluir las limitaciones sobre la oferta del recurso para escenarios entre 2015 y 2025, la contaminación sobre la calidad del agua se ilustra en la figura 3, abarcando valores de DBO entre 0 a 147000 ton. DBO/año, de los cuales 205.61 miles – ton DBO/año, corresponden al departamento del Huila, siendo la ciudad de Neiva la que mayor aporta con 60.13 miles - ton DBO/año, además de municipios más densamente poblados como Pitalito, la Plata y Garzón. El Huila es un departamento con alta actividad cafetera, petrolera y ganadera, para 2012 se calcularon 90260 cabezas de ganado porcino y 478282 de ganado vacuno, además de 13,2 millones de barriles de petróleo cifras que influyen directamente en el aumento de la carga contaminante de origen orgánico biodegradable que es capaz de ser medida con la DBO_5 [27].

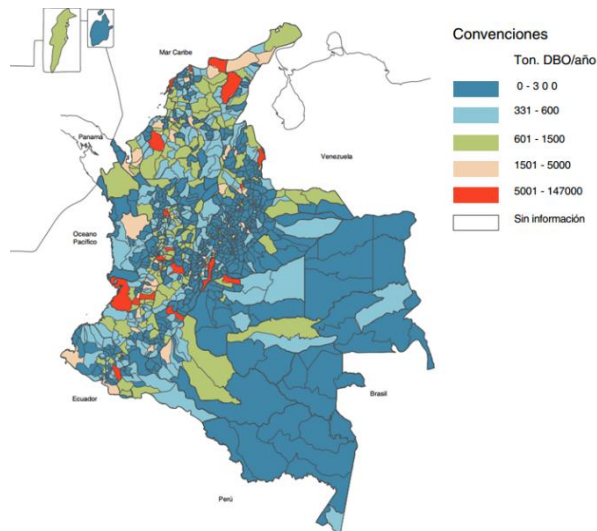


Fig. 3 Presión de la calidad del agua en términos de ton DBO/ año por municipios. IDEAM. (2000). Estudio Nacional del Agua [Figura] Recuperado de <http://www.engr.colostate.edu/>

1.4.9 Medición del oxígeno disuelto

La demanda bioquímica de oxígeno utiliza dos diferentes métodos para la medición del oxígeno disuelto inicial y final de las muestras; el método Winkler o iodométrico y el método electrométrico usando electrodos de membrana. Cada una de estas técnicas presenta interferencias y exactitudes propias.

Dentro de los métodos iodimétricos se encuentra el de modificación de azida y es el más usado para el análisis de oxígeno disuelto en aguas residuales y superficiales. El sulfato de manganeso se adiciona a la muestra seguido de una solución de álcali – yoduro- azida y posteriormente se acidifica con ácido sulfúrico concentrado. Se determina el yodo liberado con una solución de tiosulfato de sodio. Sin embargo, este método no es confiable para muestras con trazas de sulfitos, sulfatos o cloro libre. El oxígeno disuelto con este método puede ser determinado con una precisión, expresada como desviación estándar cercana a los 20 µg/L [28].

Otros métodos de lectura del oxígeno disuelto han sido desarrollados a fin de eliminar los efectos de las interferencias. Con los sistemas de electrodos de membrana estos problemas son disminuidos, debido a que el electrodo está protegido por una membrana plástica permeable al oxígeno que sirve como una barrera de difusión contra las impurezas. Bajo estas condiciones la corriente es directamente proporcional a la concentración de oxígeno [29].

Los electrodos de membrana proveen métodos excelentes para la determinación de oxígeno disuelto en aguas contaminadas, altamente coloreadas o muy cargadas.

Los electrodos de membrana sensibles al oxígeno, están compuestos por dos electrodos de metal solido casi siempre platino y plata en contacto con un electrolito soporte separados de la solución por una membrana selectiva, que generalmente está compuesta de polietileno y flouorcarbono debido a que previenen cambios en la sensibilidad del electrodo al poseer las condiciones necesarias para generar un arreglo de difusión de oxígeno entre el medio de lectura y el electrodo [30]. Estos electrodos poseen un electrodo de referencia de plata – oxido de plata, el cual recibe los iones hidroxilo producidos en la reducción del oxígeno molecular en el electrodo de platino, formando oxido de plata lo cual puede generar oscurecimiento del electrodo. En todos los instrumentos, la corriente de difusión es linealmente proporcional a la concentración de oxígeno molecular.

La medición de oxígeno disuelto mediante electrodo de membrana establece grandes ventajas respecto a los métodos químicos de análisis, los cuales son largos y laboriosos. Por ejemplo; en el método de la azida modificada se utilizan dos botellas para hacer la medición inicial y final de una misma muestra, ampliando el error de la medida. Con electrodo de membrana se realizan las mediciones sobre la misma botella, esto aumenta la capacidad del laboratorio para el análisis de muestras y diluciones de las mismas. Debido al uso del material volumétrico como la bureta en la medida de oxígeno con azida modificada, la sensibilidad del método es menor a la del oxímetro es decir de 0,05 mg/L, a comparación de 0,01 mg/L, para el medidor de oxígeno. El IDEAM reporta los

datos de comparación de los dos métodos de medición de oxígeno disuelto [Tabla.1].

Se puede resaltar, además la mayor reproducibilidad, repetibilidad y limpieza del método por electrodo de membrana. Entre las posibles desventajas del método de membrana se encuentran las interferencias con otras sustancias capaces de permear la membrana del electrodo como ozono, sulfuros, dióxido de azufre, óxido nitroso y monóxido de carbono, estas interferencias son eliminadas manteniendo limpia y cambiando frecuentemente la solución electrolítica del electrodo para evitar posibles deposiciones de iones en la superficie. [31].

Tabla 1. Comparación entre la medición de oxígeno disuelto mediante electrodo de membrana y modificación de azida. [Tabla]. Recuperado de <http://www.ideam.gov.co>. [28, 29].

Temp (°C)	Electrodo Membrana					Modificación Azida				
	10	20	25	30	40	10	20	25	30	40
Promedio	8,52	6,85	6,08	5,24	4,22	7,93	6,29	5,71	5,70	4,38
DS	0,02	0,04	0,01	0,09	0,04	0,05	0,02	0,04	0,04	0,06
%CV	0,27	0,59	0,09	1,73	0,83	0,66	0,31	0,75	0,75	1,30
LC 95%	0,06	0,10	0,01	0,23	0,09	0,05	0,02	0,04	0,04	0,05
%Error	4,20	4,37	2,41	-3,08	-6,77	-3,1	-4,1	-3,9	5,4	-3,3

1.4.10 Laboratorio de análisis de agua de Construcsuelos suministros Ltda

El laboratorio de Construcsuelos Suministros Ltda es una organización privada el cual presta servicios de ensayo de laboratorio de suelos, concretos y asfaltos, consultoría en estudios de suelos y ejecución de obras civiles en concreto reforzado, también presta servicios de ensayos fisicoquímicos e hidrobiológicos de aguas. Dentro de los ensayos químicos, cuenta con capacidad para la realización de ensayos gravimétricos, volumétricos, y determinaciones espectrofotométricas, mediante espectroscopia de ultravioleta visible, y absorción atómica.

El laboratorio ha tenido convenios con la Universidad del Cauca, para la realización de pasantías académicas, buscando la excelencia en su prestación de servicios, se han llevado a cabo diferentes prácticas profesionales, como tales como la Implementación de metodologías para la determinación de Ca, Mg y Fe en aguas residuales por espectroscopia de absorción atómica, la estandarización de método de determinación de sulfatos, fenoles y nitratos por espectrofotometría de Uv-vis, además de acidez, dureza total, dureza cálcica, fosfatos y fósforo, grasas y aceites, entre otras metodologías, el laboratorio de Construcsuelos logro la acreditación de estas metodologías frente al IDEAM, con lo que se lograron beneficios tanto para el laboratorio, como para los estudiantes que obtuvieron las prácticas y experiencias necesarias para optar por el título profesional. El laboratorio Construcsuelos Suministros Ltda, permitió la participación en pruebas de desempeño, y pruebas interlaboratorio, con lo que se estableció que las metodologías analíticas arrojan medidas acertadas, que, si se mantiene la calidad de las mismas mediante el sistema de documentación y la fidelidad de los protocolos establecidos, se logra seguir con las buenas respuestas de los métodos analíticos implementados por los estudiantes.

2. METODOLOGÍA

En la metodología se recoge la información referente a los equipos, materiales y reactivos utilizados para el desarrollo del método, además, se describen los procedimientos para la toma y siembras de muestras destinadas para la estandarización de la DBO₅. Por otra parte, se detalla los lineamientos de preparación de estándares, blancos y demás parámetros para el control de la metodología.

2.1 Reactivos, equipos y vidriería.

2.1.1 Reactivos

La tabla 2 indica la marca y la pureza de los reactivos usados en la estandarización de la metodología. Todos son reactivos grado ASC (analítico), la pureza de cada reactivo que se adjunta en la tabla es tomada del certificado del proveedor. Los reactivos que no presentan este dato no se cuenta con este registro por parte del proveedor.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la estandarización del método.

REACTIVO	MARCA	PUREZA %
Fosfato ácido de potasio (K ₂ HPO ₄)	Panreac	99,1
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	Merck	99,8
Hidróxido de sodio (NaOH)	Merck	99,2
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Merck	99,5
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	Carlo Erba	92,0
Cloruro de Hierro (III) hexahidratado (FeCl ₃ .6H ₂ O)	Biopack	99,6
Glucosa	Merck	-
Ácido glutámico	Carlo Erba	99,0

2.1.2 Equipos

Los equipos fueron sometidos a procedimientos de calibración y mantenimiento. El oxímetro, y la balanza analítica fueron calibrados en Hydrochem. La nevera de incubación fue monitoreada con termocuplas calibradas por Conamet y Metrocal

Ltda, empresas con experiencia y certificados de calidad, acreditados bajo la norma ISO/IEC 17025:2005 que garantizan la credibilidad de los resultados.

Tabla 3. Equipos utilizados en la estandarización del método.

Equipo	Referencia	Incertidumbre
Oxímetro de mesa Stara 213 Serie No. X00813 Y sonda 081010MD.	Thermoscientific	$\pm 0,3$
Incubadora ajustada a 20°C con termostato	N.A	N.A
Balanza analítica digital modelo PA214	Ohaus	$U = 9,3 \times 10^{-7}W + 8,9 \times 10^{-5}$
Termocupla model PT 1000	Lutron	0,050
Transferpipeta de 1mL	Brand	-0,02*
Transferpipeta de 10 mL	Brand	0,14*

2.1.3 Vidriería

- Botellas de prolipropileno de 1000 mL
- Garrafa de 20L de capacidad
- Matraces aforados 1000 mL Clase A
- Puntas para transferpipeta de 10 y 1mL
- Vaso de precipitados 100, 500, 1000 mL
- Probetas de 50, 250 mL
- Botellas Winkler.

2.2 Recolección de inóculo y muestras

2.2.1 Recolección del agua residual usada para la inoculación

El inculo se tomó en el vertimiento de Mansiones del Norte de la ciudad de Neiva [Fig. 4]. Cuyas coordenadas son Latitud: 2°57'27.224"N. Longitud: 75°18'05.473"W, altitud 410 msnm.

El barrio Mansiones del Norte se encuentra ubicado sobre el margen del río Magdalena, hace parte de la comuna 1 de la ciudad, que está formada aproximadamente por 9169 viviendas, y 46178 habitantes, de las cuales aproximadamente 319 viviendas y 1614 habitantes pertenecen a Mansiones del Norte [32].



Fig. 4 Vertimiento Mansiones del Norte

El vertimiento se trata de agua residual doméstica. Este consorcio bacteriano se mantiene en constante aireación a temperatura ambiente [Fig. 5]. Su recolección se realiza cada semana.



Fig. 5 Aireación del inóculo en el laboratorio.

2.2.2 Recolección de muestras

Las muestras superficiales y residuales fueron tomadas según lo especificado en el procedimiento de análisis (Anexo 1), para cada día de la prueba. Cada dilución se realiza según lo aconsejado en el procedimiento de análisis, o según criterio subjetivo del analista líder del ensayo. Debido a la carga microbiana de las muestras, no es necesario hacer inoculación.

La muestra superficial proviene del Rio Magdalena [Fig.6], Cuyas coordenadas son Latitud: $2^{\circ}57'28.861''$ N. Longitud: $75^{\circ}18'05.226''$ W, altitud 443 msnm.



Fig. 6 Toma de muestra superficial

La muestra residual domestica proviene del Vertimiento Mansiones del Norte en la ciudad de Neiva, que desemboca en el rio Magdalena sin ningún tratamiento. (Fig. 7), y es la misma muestra usada como inóculo para el análisis



Fig. 7 Toma de muestra residual.

Las muestras son preservadas y sembradas según lo especificado en el procedimiento de análisis (Anexo 1).

2.3 Preparación de estándares

Para la preparación de cada uno de los estándares se utilizó Glucosa y Ácido glutámico previamente secados a 103°C por una hora.

Dado a que el método debe servir para el análisis de muestras de origen superficial y residual, tanto de origen doméstico como industrial, y para el análisis de la eficiencia de diferentes sistemas tales como plantas de tratamiento de aguas residuales, para los que se monitorean las aguas de entrada y salida, que por normativa no deben exceder el valor de 90 mg/L O₂ considerando una carga entre 625 a 3000 kg/día O₂ de materia orgánica biodegradable o 70 mg/L O₂ para una carga que exceda los 3000 kg/día O₂ de materia orgánica biodegradable, incluyendo sistemas sin tratamiento, donde se estudian las aguas arriba y aguas debajo de los vertimientos, para conocer el efecto de la descarga sobre el cuerpo de agua superficial, es posible encontrar valores muy altos cuando se tienen muestras originarias de las entradas de las plantas de tratamiento de sistemas pertenecientes a la industria alimentaria, láctea, ganadera entre otras. Para la ganadera los valores establecidos son 450 mg/L O₂, siendo los más altos, los valores permisibles para la elaboración de lácteos se encuentran entre los 600 mg/L O₂ y la elaboración de bebidas alcohólicas excede los 1000 mg/L O₂ [33]. Por lo que es necesario establecer un rango de lectura amplio de determinación

de la DBO_5 . El laboratorio está capacitado para establecer sus propios rangos, de forma que se demuestre la capacidad del mismo para trabajar y producir valores con la confiabilidad, y la calidad necesaria.

2.3.1 Preparación de estándar de control $198 \pm 30 \text{ mg/L O}_2$

La preparación del patrón de control se prepara según lo estipulado en el Estándar Methods SM. 5210 B, y en el procedimiento de análisis (Anexo 1), para lo cual se pesan 0,150 mg de ácido glutámico, y 0,150 mg de glucosa y se llevan a un volumen de 1000 mL en un matraz aforado tipo A.

2.3.2 Preparación de estándares de rango bajo y medio

Los patrones de 100, 50, 10, 5, 4 y 3 mg/L O_2 son preparados a partir del estándar de control de $198 \pm 30 \text{ mg/L O}_2$, utilizando respectivamente matraces aforados tipo A de 500 mL para los estándares rango bajo de 3, 4, 5 y 10 mg/L O_2 , y matraces de 250 mL para los estándares de 50 y 100 mg/L O_2 .

2.3.3 Preparación de estándares de rango alto

Para la preparación del estándar de 1000 mg/L O_2 , se pesan 0.758 g de cada uno de los reactivos glucosa y ácido glutámico y se aforo a 1L en un matraz aforado clase A.

A partir de este patrón se prepara el patrón de 500 mg/L O_2 usando un matraz aforado de 250 mL clase A.

2.4 Calculo de la Demanda Bioquímica de Oxígeno

La demanda bioquímica de oxígeno se calcula mediante la siguiente fórmula obtenida del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 5210 B [25]:

$$\text{DBO}_5, \text{ mg O}_2/\text{L} = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2) \times f \times V}{V_m} \quad \text{[Ecuación 11]}$$

Dónde:

D_1 = OD de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación, mg/L,

D_2 = OD de la muestra diluida después de 5 d de incubación a 20°C, mg/L,

V = Volumen de la botella Winkler,

V_m = Volumen de alícuota de la muestra usada.

B_1 = OD del control de semilla antes de la incubación, mg/L

B_2 = OD del control de semilla después de la incubación, mg/L

f = cantidad de semilla usada en la inoculación.

2.5 Etapa preliminar de la estandarización

En esta etapa se realizaron los pasos previos para el correcto desarrollo del método de demanda bioquímica de oxígeno, para lo que se siguió el método normalizado del Standard Methods for Analysis of Water and Wastewater 5210 B. y 4500-O G [25]. para muestras de origen superficial y residual. Las actividades desarrolladas en esta etapa se muestran en la Tabla 1.

Tabla 4. Descripción de las actividades propuestas para la etapa preliminar de la estandarización.

Actividad	Descripción
Documentación	Selección del método del SM. 5210 B. y 4500-O G. Lectura y recolección del material bibliográfico necesario para comprender el fundamento químico y físico del método. Reconocimiento exacto del equipo de medición de oxígeno disuelto y su adecuada operación.
Ajuste de condiciones del laboratorio	Comparación entre las mediciones de oxígeno realizadas con el oxímetro y el método de referencia Winkler. Recolección y adaptación del inóculo. Ajuste de condiciones ambientales (temperatura).
Verificación e inventario de material necesario	Inventario de vidriería Inventario de reactivos Verificación de formatos de captura de datos
Ensayos preliminares	Montaje de blancos de agua Montaje de patrones de 3, 4, 5, 10, 50, 100, 198, 500 y 1000 mg/L O ₂
Parte experimental o de mediciones	Establecimiento de patrones de nivel alto, medio, y bajo, de acuerdo a la naturaleza de las muestras de análisis. Observación de variables instrumentales o metodológicas que puedan afectar el proceso de medición.

A continuación, se describen los procedimientos más relevantes realizados durante la etapa previa a la estandarización.

2.5.1 Comparación de la respuesta del oxímetro frente al método de modificación de azida

Para la prueba se miden el oxígeno disuelto de agua desionizada previamente aireada durante 2 horas, y reposada durante 1 hora, a temperaturas de 10, 20, 25 y 30 °C, para medir el oxígeno disuelto se utiliza tanto el oxímetro de mesa (OD mem) como el método titulométrico (OD win).

2.5.2 Adaptación y control del inoculo

Se utiliza el método de la pendiente, especificado en el SM 5210 B [25], para obtener la disminución de oxígeno por mililitro de inoculo. Dado a que el consumo del inoculo en la primera prueba no traspasa los 2 mg/L de O₂ se realizan otras pruebas con mayores cantidades de inoculo, a fin de cumplir con lo especificado.

La DBO₅ de la semilla se determina como cualquier otra muestra usando el método SM 5210 B. (Anexo 1), para lo que se toman alícuotas que consuman al menos 2mg/L de O₂ después de los 5 días de incubación.

2.5.3 Medición de blancos de procedimiento.

A fin de evaluar la calidad del agua de dilución utilizada para el montaje y estandarización de la técnica, se realizan mediciones de blanco de agua de dilución, la cual es preparada según el Anexo 1, con todos los nutrientes necesarios, y las temperaturas correctas, la temperatura inicial no debe exceder los 20 ± 3 °C, y la final debe encontrarse entre 20 ± 1 °C.

2.5.4 Medición de patrones límite de 3 mg/L O₂, 4mg/L O₂ 5 mg/L O₂ y 10 mg/L O₂

Con el fin de establecer el valor del estándar de rango bajo se realizó el montaje de patrones para seleccionar el más exacto y preciso. Se realizaron pruebas de 3 réplicas para cada patrón, cada una con 2 diluciones para un total de 6 datos, por cada patrón. Para cada uno se usaron los microorganismos provenientes del agua residual usada como inóculo y se siembra un blanco de agua de dilución y un blanco inoculado.

2.5.5 Montaje de estándares de control intermedio de 50 mg/L O₂, 100 mg/L O₂, y alto 500 mg/L O₂ y 1000 mg/L O₂

Los estándares de rango intermedio y alto se montaron por triplicado, en días diferentes. Para cada montaje se corrió un blanco de agua de dilución y un blanco de inóculo, para cada patrón se realizan 3 diluciones.

2.6 Estandarización

Antes de realizar las mediciones para la estandarización se aseguró que el método estuviera montado, se garantizó que los equipos funcionan de manera correcta. Esta etapa consistió en el procesamiento de muestras y el registro de datos en formatos adecuados (datos primarios). Las actividades desarrolladas en esta etapa se muestran en la tabla 5.

El grupo de muestras se procesó por duplicado y con dos analistas diferentes con el fin de estimar la reproducibilidad del método. Los controles se realizaron de acuerdo a lo exigido en el método 5210 B. y 4500-O G en el Standard Methods.

Tabla 5. Descripción de las actividades propuestas para la estandarización.

Actividad	Descripción
Montaje de blancos	Montaje de blanco de reactivos y blanco inculado. En total 5 blancos por cada analista.
Montaje de estándares de control	Montaje de estándar de concentración baja de 10 mg/L O ₂ Montaje de estándar de concentración media de 198 mg/L O ₂ Montaje de estándar de concentración alta de 1000 mg/L O ₂
Montaje de muestras	Corrida de muestras de origen superficial Corrida de muestras de origen residual
Análisis estadístico de los resultados	Se realizó el rechazo de datos atípicos. Se calcula la precisión, exactitud.
Elaboración de documentos	Toma de datos primarios en formatos adecuados. Realización del informe de estandarización. Realización de protocolos de procedimiento. Realización de informe de incertidumbre.

Después de obtener los resultados de las anteriores pruebas donde se observa el comportamiento del método ajustado a las condiciones del laboratorio, y se

demuestra que los equipos de medición, y la metodología aplicada funciona correctamente, se lleva a cabo el procesamiento de muestras y captura de datos de la estandarización para un posterior tratamiento estadístico.

Los ensayos se realizaron durante 7 días, con una diferencia máxima de 3 días entre cada ensayo. El grupo básico de muestras corridas fue:

- Blanco de agua de dilución (B_a).
- Blanco inoculado (B_i).
- Estándar rango bajo de 10 mg/L O_2 (E_b).
- Estándar rango medio de 198 mg/L O_2 (E_m).
- Estándar rango alto de 1000 mg/L O_2 (E_a).

Tabla 6. Volúmenes utilizados para siembra de las muestras para cada ensayo de la estandarización.

Muestra	Volumen de muestra (mL)
Estándar bajo (E_b) 10mg/L	30,50, 70
Estándar medio (E_m) 198 mg/L	6
Estándar alto (E_a) 1000 mg/L	0.6, 0.5, 0.4
Muestra residual (M1)	7,10,12
Muestra Superficial (M2)	100, 150, 200

2.7 Análisis estadístico de datos

Para todos los grupos de datos obtenidos en la estandarización se calculó el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (%CV) y los límites de confianza (LC 95%). Estos valores estadísticos permiten apreciar mediante el análisis del valor medio obtenido para cada agrupación de medidas repetidas, la dispersión de estas, el error relativo entre las mediciones y el rango posible donde se encuentra el valor real de la medición.

Para las pruebas previas a la estandarización, en la comparación de los métodos de medición de oxígeno usando el electrodo de membrana y el método Winkler, se supone como hipótesis nula, que el valor de la medición del oxígeno no es afectado por la metodología utilizada, y se realiza una prueba t, de dos colas, para

grupos con varianzas distintas, a fin de comparar las medias calculadas para los dos conjuntos de datos frente a un valor teórico de t .

Además, se realiza una prueba adicional, llamada prueba F , la cual compara las desviaciones estándar, con la cual se puede apreciar las diferencias entre los métodos debido a los errores aleatorios para estimar los ensayos en términos de precisión, es decir, si el método de medición de oxígeno por membrana es más preciso que la medición del mismo por el método titulométrico, como lo reportado en otros estudios, en los que se han realizados experimentaciones parecidas para la medición de oxígeno disuelto, aunque sin variación de temperatura [34].

Así mismo, para los experimentos corridos en la semana de estandarización, además del cálculo de las magnitudes estadísticas mencionadas, también se calculan los contrastes de significación de la prueba t y la prueba F , para evaluar la reproducibilidad de la metodología, suponiendo que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos por diferentes analistas.

2.8 Aplicación del ensayo de DBO_5 en muestras de diferente origen

Para la aplicación de la metodología estandarizada se analizan muestras de diferente origen las cuales ingresan al laboratorio de Construcciones Suministros Ltda, mediante monitoreo programados, los cuales son llevados a cabo por técnicos capacitados. Debido a que la confidencialidad de las muestras está asegurada mediante una cadena de custodia, realizada desde el punto de muestreo, hasta la recepción de las muestras en el laboratorio, en este documento se recogen solamente 12 muestras las cuales se clasifican según su origen, aunque cabe agregar que este es solo un pequeño grupo de muestras del total que fue analizado durante la práctica profesional:

- Piscícolas
- Vertimientos de aguas residuales varias
- Lavaderos
- Hospitales

Estas son muestreadas y preservadas según los procedimientos internos de la empresa Construcsuelos Suministros Ltda, y se escogen para representar el montaje del análisis de DBO_5 debido a que se encuentran ubicadas dentro de un amplio rango de contaminación por materia orgánica y por tanto, ilustran la capacidad del método para llevar a cabo las determinaciones.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados presentados a continuación muestran los datos obtenidos durante las etapas previas a la estandarización. Todas las pruebas realizadas responden a los planes cuantitativos mencionados en la metodología.

3.1 Resultados de la comparación de los métodos de lectura de O_2 disuelto

Los promedios de las mediciones de oxígeno disuelto realizadas para el agua desionizada, utilizando el método de referencia de modificación de azida (OD win), y el de membrana (OD mem), se reportan a continuación, para diferentes temperaturas.

Los valores experimentales detallados se presentan en el Anexo 2, en esta tabla se adjuntan las magnitudes estadísticas calculadas para los conjuntos de datos obtenidos.

Con este experimento se pretende comprobar si existen o no diferencias significativas en la determinación de oxígeno disuelto por el electrodo de membrana en comparación con el método de referencia de modificación de azida, a diferentes temperaturas.

Tabla 7. Valores promedio y cálculos estadísticos realizados para la comparación de las mediciones de oxígeno disuelto usando los métodos de electrodo de membrana y de modificación de azida.

Temperatura (°C)	10		20		25		30	
	Mem	Win	Mem	Win	Men	Win	Mem	Win
Promedio	8,044	8,120	8,102	8,030	8,35	8,28	7,29	7,5
Des. Estándar	0,090	0,144	0,029	0,045	0,029	0,249	0,042	0,108
% CV	1,12	1,77	0,36	0,56	0,35	3,01	0,58	1,44
LC (95%)	0,007	0,018	0,001	0,002	0,001	0,054	0,001	0,010
Prueba t	0,353		0,020		0,565		0,009	
Prueba F	0,383		0,440		0,001		0,093	

El oxímetro utilizado en la medición está compuesto de un cátodo de oro y un ánodo de plata y una membrana que crea una barrera entre la sonda y la solución de medición y que permite el paso del O_2 para ser reducido en el cátodo [Fig. 8], y generar una corriente proporcional a la concentración de O_2 en la solución. Este además incluye un sensor el cual mide con precisión la temperatura de la solución para realizar una medición confiable del O_2 disuelto [35].

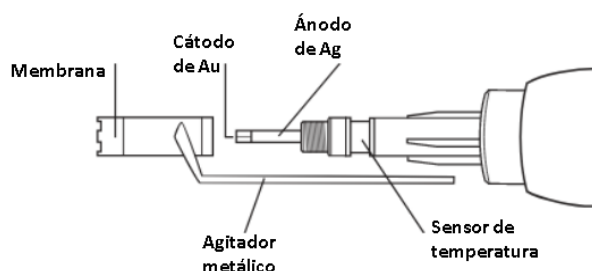


Fig. 8 Sonda de medición de O_2 disuelto Thermo Scientific Orion Dissolved Oxygen AUTO-STIR probe. (2007). Recuperado de <https://www.instrumart.com/assets/TSO-AutoStir-UserGuide.pdf>.

Para que ocurra la reacción de reducción del O_2 en el cátodo, el electrodo debe polarizarse y para esto, se conecta por una hora, previamente a la medición. De

esta forma se aplica un potencial externo el cual no afecta la disolución, pero es suficiente para que el O_2 se reduzca [35]. Posteriormente el electrodo es calibrado usando el método de agua – saturada de aire definido por el fabricante y que se basa en que la presión parcial del O_2 es equivalente a la del aire saturado es decir con 100% de humedad, con esto la sonda es capaz de medir correctamente la presión parcial del O_2 en una muestra de agua [35]. Cada vez que se realizó una medición a una de las temperaturas indicadas en la Tabla. 7, se realizó la calibración para esta temperatura. El equipo realiza una corrección automática, puesto que la velocidad de difusión el O_2 en el agua es diferente en el aire, aplicando un factor corrección el cual es 102.3%, que aproxima el valor de calibración del agua –saturada de aire, para obtener el valor correcto del calibración del aire saturado.[35].

Después de la calibración, puede realizarse la medición del O_2 en muestras de agua, el proceso de medición puede ser explicado mediante el modelo de Clark [Fig. 9]. Para empezar, el O_2 de la solución de muestra debe ser transportado desde la solución a través de la membrana, y posteriormente desde el electrolito hasta la superficie del cátodo de oro.

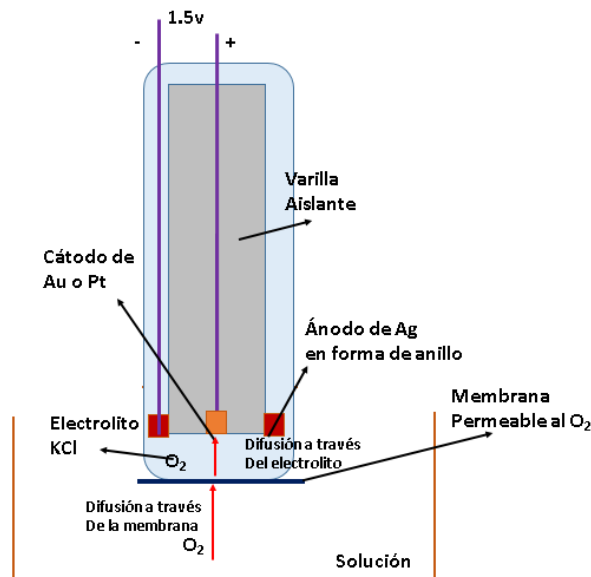
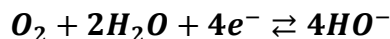


Fig. 9 Sensor voltamperométrico de O₂ de Clark. Recuperado de Skoog, D. Donal, M. Holler, F. (1997) Fundamentos de Química Analítica. Editorial Reverté. 4Ed. Vol 2. Pág 458

Estos dos procesos de difusión son responsables de la velocidad con la que ocurren las reacciones en los electrodos [36] y de generan un estado estacionario, es decir un estado en que la velocidad de las reacciones es proporcional a la velocidad de la transferencia de masa del O₂ hacia el cátodo [36]. Para esto, el electrodo posee un agitador incorporado que proporciona un flujo constante de O₂ desde la solución hacia la membrana. El tiempo en que el electrodo alcanza el estado estacionario está dado por el grosor de la membrana y la capa de electrolito entre está y el cátodo [35], el electrodo utilizado posee una membrana retirable, fabricada con precisión para obtener un grosor de la capa del electrolito (KCl) reproducible. El espesor máximo para obtener una respuesta en un tiempo de 10 a 20 segundos debe ser aproximadamente de 20 μm, aunque se han reportado grosores de 25 μm [37]. En el experimento realizado se mantuvo la misma membrana y no se retiró en ningún momento para obtener la menor variación posible.

Al llegar al cátodo, el O₂ es reducido según la siguiente reacción:

Reacción del cátodo [37]:



Esta reducción produce una corriente que es proporcional al flujo de O₂ que llega al electrodo, que, a su vez, es proporcional a la concentración de O₂ en el seno de la solución. Posterior a la reducción del O₂, ocurre una reacción entre el electrolito que genera el ion cloruro, el cual, reacciona con el ánodo de plata la cual se para formar cloruro de plata, por lo cual se puede oscurecer el el electrodo [Fig. 10]

Reacción del ánodo [36]:

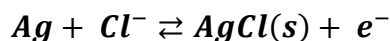


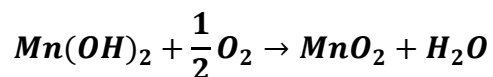
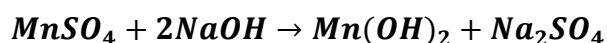


Fig. 10 Electrodo del medidor de oxígeno sin la membrana permeable.

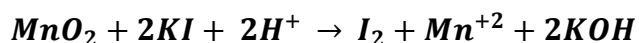
Sobre el electrodo debe realizarse un mantenimiento, según lo especifica el proveedor, pues las reacciones de los electrodos conllevan a una disminución de la superficie activa del cátodo de oro, y de la concentración de KCl, y esto genera medidas erróneas o incluso impide la calibración del equipo. El cátodo de oro debe pulirse cada cierto tiempo, puesto que sustancias provenientes de las muestras o del mismo electrodo pueden contaminarlo y reducir el área de la superficie activa. Para esto se utiliza una banda especial para pulir, la cual está diseñada para no rayar el electrodo, y se sigue el procedimiento especificado por el fabricante.

Por otro lado, el método de referencia de Modificación de azida, consiste en la precipitación del O_2 usando $MnSO_4$ en medio alcalino. Las reacciones se describen a continuación.

- 1) En la primera reacción el Mn (II) es usado para fijar el O_2 disuelto en el agua, en un medio alcalino (exceso de NaOH), de esta forma se obtiene un precipitado café de óxido de manganeso (IV) [38]:



- 2) Posteriormente, al acidular la solución con H_2SO_4 concentrado, en presencia del yoduro de potasio, el óxido de manganeso (II) oxida al ion yoduro, en una relación estequiometría al O_2 presente en la solución [39]:



Y finalmente el yodo liberado se titula con una solución estandarizada 0,025N de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ usando almidón como indicador [40].

El método de modificación de azida produce residuos tóxicos que deben ser recogidos en contenedores específicos para metales pesados como el manganeso, ácidos como el NaOH y el H_2SO_4 , y compuestos orgánicos tóxicos como la NaN_3 . Los contenedores deben indicar todos los compuestos tóxicos y estos son posteriormente desactivados por la empresa Inci Huila la cual está certificada para la recolección y posterior disposición de los mismos.

En la tabla 7 se observa que la dispersión de los valores obtenidos para el método electrométrico (desviación estándar) es menor que para el método de modificación de azida. Sin embargo, el electrodo debe estar perfectamente calibrado para que estos valores sean confiables, a diferencia que el método titulométrico, y sus valores son respaldados por los obtenidos usando el método de modificación de azida. Por otro lado, este último puede ver afectada la medición del O_2 en la DBO_5 debido a especies producidas por los microorganismos como el NO_3^- el cual es interferencia en la medición, que son evitados con la adición de la azida de sodio (NaN_3) [41]. Este problema no se tiene con el oxímetro pues la membrana no es permeable a esta sustancia.

La imposibilidad de obtener patrones de oxígeno disuelto permite solamente obtener la precisión de la metodología de medición (coeficiente de variación) y no la exactitud de la misma pues comercialmente no se encuentran patrones de O_2 disuelto disponibles [41]. En este experimento los valores reportados en la Tabla 7 muestran que para la técnica electrométrica la precisión es mayor que para el método de modificación de azida, esto se debe a que para este método existen más factores que afectan la medición del O_2 que para el método electrométrico. Para el método de modificación de azida debe considerarse que el yodo producido estequiométricamente puede volatilizarse u oxidarse, y que también existe una contribución de O_2 disuelto por parte de los reactivos adicionados a la muestra, o posible contaminación o consumo del I_2 por parte de los reactivos además de que siempre existe una diferencia entre el punto de equivalencia y el punto final de una

titulación [42]. Por otro lado, el electrodo no tiene estos problemas, la mayor fuente de error radica en la calibración del equipo, pero este equipo cuenta con varios implementos a fin de realizar las correcciones pertinentes [43], y puede observarse en los datos promedio obtenidos para cada método en las temperaturas realizadas. Puede observarse también que los límites de confianza de la metodología electrométrica son más reducidos, y por lo tanto están dentro de los intervalos de confianza del método de modificación de azida, lo cual puede llevar a concluir que los errores sistemáticos ocurren más a menudo cuando uno utiliza la técnica titulométrica para medir el O₂ disuelto.

La comparación del método electrométrico con el método de referencia (modificación de azida), puede llevarse a cabo usando una prueba estadística t, que compara las dos medias experimentales (\bar{x}), cuando se tienen dos conjuntos de datos que poseen desviaciones estándar diferentes [14].

Para cada temperatura se aplica la siguiente fórmula de t [14]:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \text{ [Ecuación 12]}$$

Donde:

t= contraste de significación

s= desviación estándar del conjunto de datos a comparar (1 y 2 se refiere al método electrométrico y modificación de azida, respectivamente)

n= número de mediciones de cada conjunto de datos

Y además se calculan los grados de libertad totales de la siguiente manera [14]:

$$\text{grados de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)} \text{ [Ecuación 13]}$$

Los valores para t calculados (Tabla 7), no sobrepasan los valores críticos de t (Anexo 6), por lo que puede concluirse que el método propuesto de medición de O₂ (oxímetro) no difiere significativamente en los resultados respecto al método de referencia (modificación de azida), y por tanto la medición de O₂ puede realizarse con las dos metodologías y se obtendrán resultados satisfactorios [14], sin embargo. La precisión de los dos métodos puede ser evaluada también por el contraste prueba F, la cual compara las desviaciones estándar de cada grupo de datos usando la siguiente fórmula [14]:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{[Ecuación 14]}$$

Según el criterio de la prueba F, los errores aleatorios afectan la precisión de los métodos y esto puede evaluarse si el F calculado supera un valor crítico (Anexo 7), de esta manera como se observa en la tabla 7, los valores calculados no superan el valor crítico para grupos de datos con 4 grados de libertad [14].

De esta manera se evidencia que, aunque el método Winkler es capaz de medir con precisión y exactitud el oxígeno disuelto en agua destilada, el electrodo de membrana es una herramienta más robusta, para la medición de oxígeno, además de que acarrea otros beneficios como la posibilidad de medir el oxígeno disuelto en una mayor cantidad de soluciones que el método Winkler, y muestras de agua en presencia de diferentes contaminantes.

Los datos de calibración arrojados por el equipo (Anexo 2), usando la temperatura de la solución y la pendiente en términos del porcentaje de saturación sobre la corriente (Tabla 8), se construye una gráfica que ilustra el comportamiento del electrodo frente al cambio de la temperatura (Grafica 2).

Tabla 8. Valores arrojados por el equipo de medición de oxígeno disuelto en el momento de la calibración.

Temperatura	Pendiente (%Sat/nA)
10,7	9,5
20,4	12,5
25,7	14,1
30,3	15,0

El efecto de la temperatura en la sensibilidad del electrodo, se expresa mediante la siguiente gráfica, encontrándose una respuesta lineal que indica que el electrodo es capaz de medir concentraciones de oxígeno a pesar de las variaciones de temperatura, de lo cual también se infiere que la permeabilidad de la membrana se hace mayor con el aumento de los grados centígrados, es decir su sensibilidad aumenta.

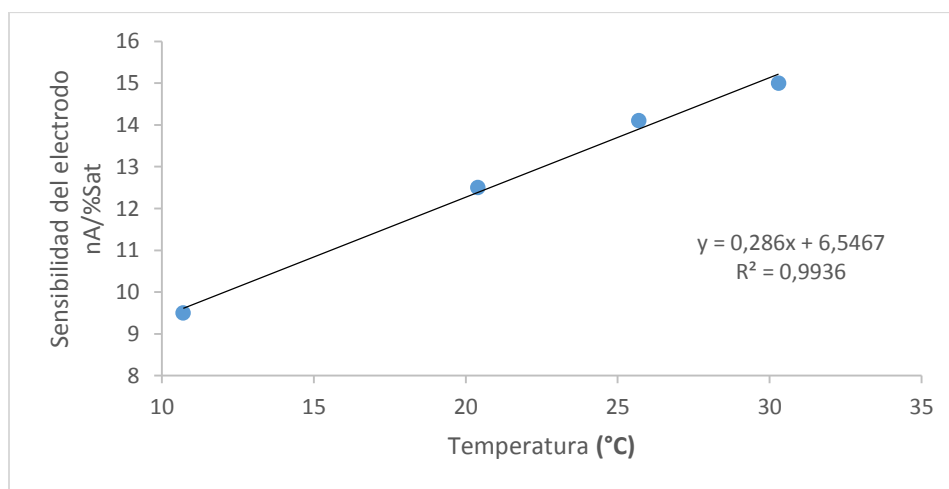


Gráfico 2. Gráfica de la temperatura vs la pendiente arrojada por el equipo en términos del %Sat/nA.

Este efecto de la temperatura puede ser tomado en cuenta para un chequeo rápido de la sensibilidad del electrodo, bajo las condiciones de temperatura propuestas. Los electrodos de membrana generalmente poseen grandes coeficientes de temperatura, pues están diseñados para realizar monitoreo de oxígeno en diferentes condiciones y presentan idealmente gran habilidad de resistencia térmica que les concede robustez frente a los cambios de temperatura [44].

3.2 Resultados de la adaptación del inóculo o semilla

A pesar de que comercialmente existen diferentes semillas para realizar la DBO_5 , estas incrementan los costos de los ensayos y pueden ser reemplazadas por aguas residuales de origen doméstico, que presentan una composición variada de microflora aerobia [45]. Debido a esto, se realiza la siguiente experimentación, la cual consiste en la adaptación del consorcio microbiano proveniente de un agua residual doméstica para la realización del ensayo de DBO_5 .

Las aguas residuales usadas como inóculo pueden contener sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento o las reacciones bioquímicas de los microorganismos descomponedores de la materia orgánica. Generalmente, las muestras residuales usadas se filtran, se incuban y climatizan para la generación de una semilla de inoculación [45].

Los experimentos consistieron en la elaboración de curvas de consumo de oxígeno usando variaciones del volumen de las alícuotas de agua residual, durante 5 días de incubación usando el procedimiento SM 5220 B. Diferentes muestras fueron utilizadas previamente a la presentada en este documento, pero debido a resultados insatisfactorios fueron rechazadas. La tabla 9 contiene los resultados promedio de los triplicados realizados para la primera prueba del agua residual domestica recogida en Mansiones del Norte (Fig. 4):

Tabla 9. Consumo de oxígeno en 5 días de incubación del agua residual doméstica usando alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL.

Ensayo 1	
Inoculo (mL)	Consumo de O ₂ (mg/L)
1	0,55
2	0,69
3	1,02
4	1,18
5	1,45

Los valores obtenidos para esta experimentación se presentan de forma detallada en el Anexo 3. Con los valores de la Tabla 9 se procede a elaborar la siguiente curva:

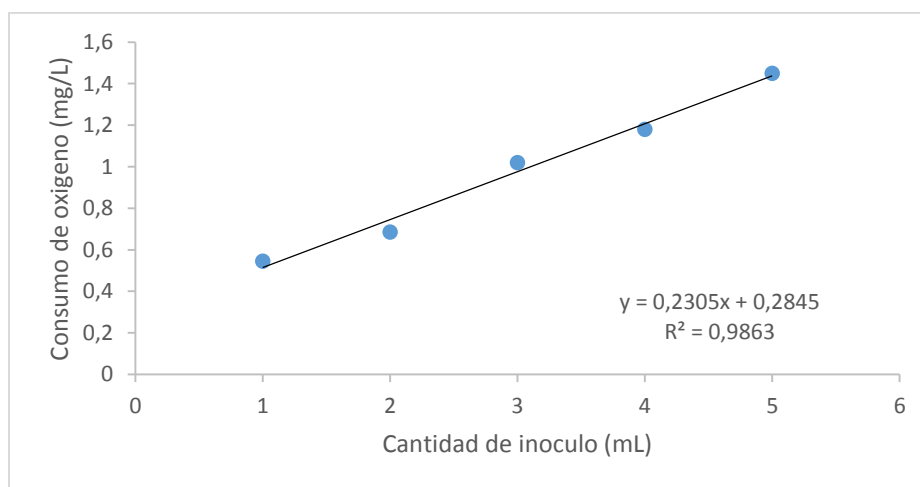


Gráfico 3. Primera curva de consumo de oxígeno por mililitro de inoculo utilizado realizada (Ensayo 1, tabla 9).

Sin embargo, estos valores no cumplen con lo especificado en el SM 5220 B el cual indica que el consumo debe sobrepasar los 2 mg/L de O₂, aunque la linealidad es favorable, por esto se realiza otro experimento tomando alícuotas de mayor volumen del agua residual.

Tabla 10. Consumo de oxígeno en 5 días de incubación del agua residual doméstica usando alícuotas de 7, 9, 10, 12 y 15 mL.

Ensayo 2	
Inoculo (mL)	Consumo O ₂ (mg/L)
7	2,12
9	2,71
10	3,39
12	3,69
15	4,57

De esta manera se cumple con el requisito de consumo mayor a 2 mg/L de O₂, cuando se realiza la gráfica se observa que se obtiene también una linealidad aceptable:

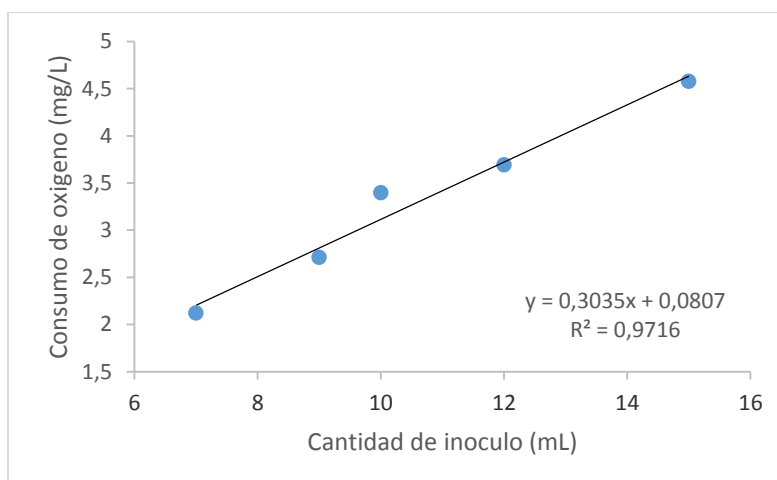


Gráfico 4. Curva de consumo de oxígeno por mililitro de inoculo utilizado realizada (Ensayo 2, Tabla 10)

Y dado a que el uso de muestras de agua para la DBO₅ puede presentar algunos inconvenientes, pues aunque la mayoría de las aguas residuales contienen el suficiente número inicial de microorganismos necesarios, entre ellos *pseudomonas*, *nocardia*, *streptomyces*, *bacillos*, *micromonospora*, entre otros [45], que forman una mezcla de población microbiana fácilmente muestreable en el ambiente, la utilidad y efectividad del inoculo natural, debe ser controlada través de la siembra de estas curvas periódicamente, de esta manera estudios han

demostrado la efectividad de los inóculos naturales para su uso en métodos estandarizados de análisis [46].

Una curva de consumo de oxígeno versus la cantidad de inóculo utilizado, es realizada en la semana de estandarización, el comportamiento de todas las curvas permite definir si existen o no posibles sustancias tóxicas que inhiban o afecten la inoculación, según lo definido en el SM 5120 B. Para el tercer ensayo realizado se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 11. Consumo de oxígeno en 5 días de incubación del agua residual doméstica usando alícuotas de 7, 9, 10, 12 y 15 mL.

Ensayo 2	
Inoculo (mL)	Inoculo (mL)
7	2,51
9	2,65
10	3,05
12	3,83
15	5,33

Con estos valores se obtiene la gráfica 5, la cual muestra que el comportamiento del consumo del O₂ del inóculo es aceptable.

Debido a que el inóculo es recogido siempre cada semana y muchas veces en días diferentes y como un vertimiento domestico no tiene una concentración constante de compuestos y está sujeto a posibles efectos de contaminación por detergentes, cloro, o productos de uso común que pueden afectar o inhibir el crecimiento de microorganismos, además de condiciones ambientales como lluvias que también pueden ocasionar cambios desfavorables la repetición de los ensayos permite observar la calidad del agua residual en dantes de la realización del proceso de estandarización se ensaya otra curva de consumo de oxígeno:0

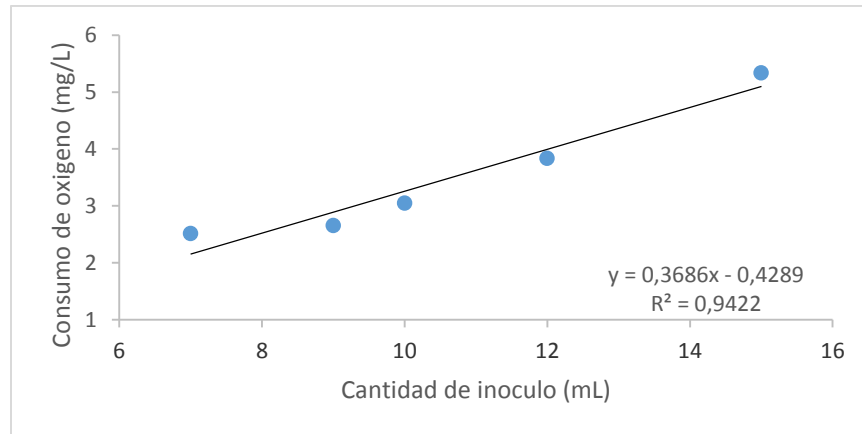


Gráfico 5. Consumo de oxígeno por mililitro de inóculo utilizado realizada, (Ensayo 3, Tabla 11). Curva realizada para la inóculo recogido antes de la estandarización.

Para la repetición de la curva, se observa que el inóculo muestra el comportamiento lineal deseado, y este es utilizado para llevar a cabo la estandarización. Sin embargo, cabe afirmar que, aunque el método de la DBO_5 , es uno de los métodos más ampliamente utilizados para la evaluación de la calidad del agua, la repetibilidad y reproducibilidad de este ensayo es pobre, y la inoculación es una de las mayores fuentes de error de la metodología.

Por otro lado, usando la ecuación 7 puede calcularse la DBO_5 del inóculo, como si fuera una muestra cualquiera, para aquellos ensayos en los que el consumo de oxígeno supera los 2 mg/L:

$$DBO_5(mg/L) = \frac{(D_1 - D_2) \times (B_1 - B_2) \times f \times V}{V_m} \quad [\text{Ec. 11}]$$

Los valores calculados se resumen la tabla 10:

Tabla. 12 DBO_5 calculada para el inóculo para las pruebas que cumplen con un consumo de oxígeno mayor a 2 mg/L, es decir los ensayos 2 y 3.

Volumen Inoculo	Ensayo	
	2	3
	DBO ₅	DBO ₅
7	86,36	103,63
9	87,49	85,42
10	99,82	89,28
12	90,93	94,55
15	90,93	106,64

En general es posible deducir según los datos obtenidos que la muestra residual es bastante útil para la inoculación de patrones de la DBO₅, como se verá más adelante. Y el comportamiento lineal del consumo de oxígeno por parte de los microorganismos provenientes del agua residual indica que la composición del agua residual escogida para la inoculación no contiene sustancias tóxicas, pues de lo contrario la linealidad de la curva habría sido afectada. Generalmente, es indicativo de presencia de compuestos desfavorables para llevar a cabo la prueba, que la demanda bioquímica de oxígeno incrementa su valor conforme aumenta la dilución de la muestra [47], pues los diferentes procesos de consumo de oxígeno llevados a cabo en las aguas residuales, como degradación de material orgánico, síntesis de otros compuestos y respiración endógena de los microorganismos, se ven afectados por la presencia de compuestos tensioactivos, (jabones y detergentes), o incluso fracciones de medicamentos que son desechados en el agua y alteran el crecimiento de las bacterias en las aguas residuales [48], sin embargo los valores obtenidos de la DBO₅ en general van aumentando conforme disminuye la dilución de la muestra.

En ocasiones se obtuvieron resultados negativos que no se adjuntan a este documento, se encontraron presentes espumas provenientes de la utilización de jabones que afectaron la flora microbiana y provocaron curvas con linealidades no aceptables para la realización del ensayo. Es posible que algunas veces, debido a actividades domésticas, el vertimiento doméstico aumente la composición de compuestos tóxicos para los microorganismos, pero en estos casos se realiza un monitoreo mediante la realización de curvas de consumo de oxígeno, o el mismo montaje de patrones, que avisa al analista sobre la toxicidad presente en el medio de cultivo.

El comportamiento del patrón de 198 ± 30 mg/L O_2 realizado a través de los días y en diferentes semanas usando el inóculo recogido en la misma fuente, se observa en la grafica 6, con esto se evidencia que el inóculo escogido para la siembra de los patrones estándar permite obtener valores aceptables la mayoría de las veces.

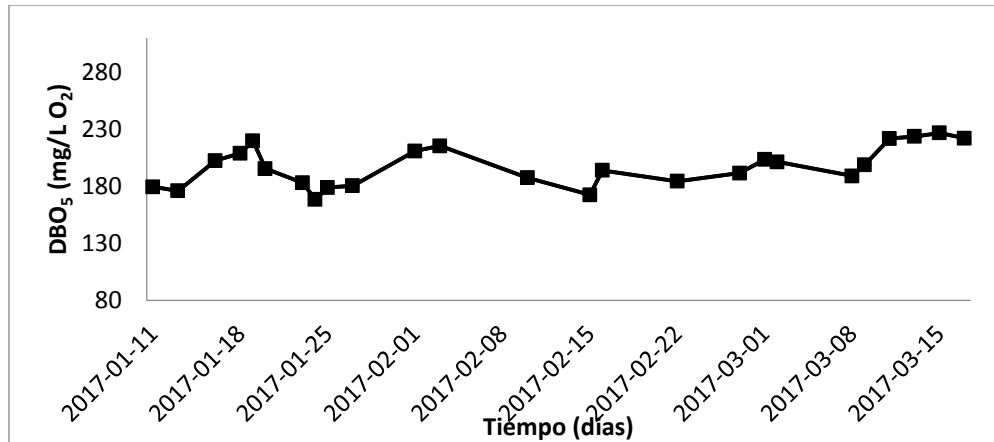


Gráfico 6. Grafica que representa los valores de los patrones de 198 mg/L de O_2 a través de tiempo, usando agua residual como inóculo, proveniente del sitio de muestreo “Mansiones de Neiva”

3.3 Verificación del agua de dilución o blancos de procedimiento

El agua utilizada para la dilución de las muestras en la DBO_5 , idealmente debe ser agua destilada. El agua utilizada en Construcsuelos Suministros Ltda, para todos los ensayos, consiste en un sistema desionizador, combinado con filtros de membrana [Fig. 10]. En necesario entonces demostrar que el agua usada cumple con los requisitos del ensayo de DBO_5



Fig. 10 Sistema de obtención de agua desionizada en la empresa Construcsuelos Suministros Ltda.

El agua desionizada contiene los nutrientes que son una mezcla de soluciones tampón, los cuales permiten que los microorganismos sobrevivan en las condiciones de incubación durante los cinco días de duración de la prueba.

Como requisito, el agua desionizada no debe consumir más de 0,2 mg/L de oxígeno en el periodo de cinco días de incubación. A continuación, la tabla 13 presenta las réplicas de consumo de oxígeno para el agua de dilución, en cinco días de incubación.

Tabla 13. Replicas realizadas para conocer el consumo de oxígeno del agua de dilución incubada durante cinco días.

Blanco	T (°C) inicial	T (°C) final	Consumo de oxígeno (mg/L)
1	23,9	21,2	0,10
2	23,9	20,8	0,15
3	23,9	20,6	0,11
4	23,9	20,8	0,12
5	23,9	20,9	0,15
6	23,9	20,9	0,16
7	23,9	21,2	0,14
8	23,9	21,3	0,16
9	23,9	20,8	0,15
10	23,9	20,7	0,13

Debido a que el agua de dilución debe considerar unas características específicas para llevar a cabo la prueba de DBO_5 con éxito, las medidas repetidas obtenidas permiten definir si el agua usada es o no apta para la prueba. El agua de dilución contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos que degradan la materia orgánica, además de estar lo suficientemente saturada de oxígeno para que este no sea consumido totalmente en los cinco días, por otra parte y debido a que las reacciones de degradación de la materia orgánica llevadas a cabo por las bacterias son dependientes de la temperatura, también debe cumplir con unos rangos de temperatura especificados para el método en el SM 5210 B. (Anexo 1). Con los resultados obtenidos se aprecia que el agua usada cumple cabalmente con las condiciones requeridas.

3.4 Medición de patrones rango bajo de 3 mg/L, 4mg/L, 5 mg/L y 10 mg/L de O_2 , de rango intermedio de 50 mg/L, 100 mg/L, y rango alto 500 mg/L y 1000 mg/L O_2

La medición de patrones de diferente concentración, tiene como finalidad demostrar que el método es capaz de llevarse a cabo sobre muestras con bastante cantidad de materia orgánica biodegradable, o también muestras que provengan de fuentes superficiales poco contaminadas. Para esto se realiza la siembra de patrones de rango bajo o limite, que son de 3, 4, 5 y 10 mg/L de O_2 , de rango medio (50 y 100 mg/L de O_2) y de rango alto que son patrones de 500 y 1000 mg/L de O_2 .

Cada estándar se realiza por triplicado y se incubada por cinco días, usando el agua de dilución y el inóculo proveniente del agua residual según lo especificado en el nexo 1. Los resultados detallados de los patrones sembrados se muestran en el Anexo 4. Los valores obtenidos se promedian para llevar a cabo los cálculos estadísticos resumidas en la tabla 14.

Tabla. 14 Magnitudes estadísticas calculadas para patrones de DBO_5 de 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 mg/L de O_2 .

Patrón (mg/L) O_2	3	4	5	10	50	100	500	1000

(\bar{X})	3,34	4,13	5,38	9,71	53,45	104,25	540,22	1089,07
(s)	0,75	0,42	0,34	0,82	2,07	11,04	24,96	33,37
(%CV)	22,53	10,09	6,37	8,43	3,88	10,59	4,62	3,06
(LC 95%)	0,60	0,33	0,27	0,53	1,35	7,21	16,30	21,80
(%E)	11,17	3,13	7,53	2,93	6,90	4,25	8,04	8,91

Se han reportado validaciones de metodologías para la medición de la DBO usando otros métodos como el respirometrico, para los que se han establecido valores de límite de cuantificación de 5 mg/L de O₂, con resultados satisfactorios [49],

En la tabla 14 se observan que para los patrones de rango bajo, es decir, los de 3, 4, 5 y 10 mg/L de O₂, la dispersión de los datos es bastante baja, en términos de la desviación estándar, pero la precisión en términos del coeficiente de variación disminuye para los valores más bajos de 3 y 4 mg/L de O₂.

Es de esperar que los valores de los límites de confianza aumenten al aumentar la concentración del patrón, pues se obtiene una mayor dispersión de los valores, es decir, la desviación estándar aumenta conforme aumenta la concentración del patrón, pero sin embargo esto no afecta la precisión (coeficiente de variación).

La exactitud de los patrones es evaluada según la siguiente fórmula:

$$\%E_r = \frac{|error\ absoluto|}{Valor\ real} \times 100 \text{ [Ecuación 15]}$$

En la tabla 14 se observa que el mayor error corresponde al estándar más bajo de 3 mg/L de O₂, y que el error es muy bajo para los patrones siguientes, en especial para el de 10 mg/L de O₂ el cual es el más bajo.

Estas pruebas son las que concluyen sobre que intervalos es aceptable la obtención de coeficientes de variación (precisión) y porcentaje de error (exactitud), para muestras de rango bajo, intermedio o alto, y patrones de cualquier concentración. Lo cual permite también establecer los atributos del método de la demanda bioquímica de oxígeno.

4. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅)

Después de evaluar que todas las condiciones son aptas para llevar a cabo las pruebas de estandarización, se procede a realizar los experimentos a fin de encontrar los atributos de exactitud, precisión, límites de confianza y demás parámetros estadísticos del método.

Para evaluar la reproducibilidad de la metodología, se realizan pruebas a través de 7 días, junto con otro analista, de esta forma se tiene en cuenta la repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo.

Todos los ensayos son realizados por triplicado, presentándose en las tablas 17 a 21 los promedios de los valores obtenidos.

4.1 Montaje de Blancos

Para la corrida de los blancos de procedimiento, se presentan los resultados en términos del consumo de oxígeno.

Los blancos de agua de dilución presentados a continuación muestran que el consumo de oxígeno no supera el 0,2 mg/L, y que la temperatura se mantiene dentro de los límites requeridos para el montaje especificados en el anexo 1. Es decir, temperatura inicial entre 20 ± 3 y temperatura final igual a 20 ± 1 .

Tabla 15. Blancos de agua de dilución obtenidos para los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2

Analista		1			2	
Ensayo (día)	T(°C) inicial	T(°C) final	O ₂ consumido	T(°C) inicial	T(°C) Final	O ₂ consumido
1	23,5	20,3	0,11	23,7	20,5	0,19
2	23,5	20,1	0,11	23,7	20,7	0,11
3	23,5	20,6	0,12	23,7	20,3	0,11
4	23,5	20,1	0,11	23,7	20,3	0,10
5	23,5	20,7	0,15	23,7	20,5	0,18
6	23,5	20,5	0,11	23,7	20,9	0,13
7	23,5	20,7	0,17	23,7	20,7	0,11

Así mismo se presentan los valores para los blancos inoculados, estos blancos contienen el agua de dilución y 1 mL de inóculo, y también se presentan en términos del consumo de oxígeno, teniéndose en cuenta los valores de temperatura inicial y final.

Tabla 16. Blancos inoculados y sus duplicados obtenidos en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.

Analista		1		2		
Ensayo (día)	T(°C) inicial	T(°C) final	O ₂ consumido	T(°C) inicial	T(°C) Final	O ₂ consumido
1	23,6	20,5	0,39	23,6	20,4	0,45
2	23,6	20,7	0,37	23,6	20,2	0,52
3	23,6	20,6	0,59	23,6	20,4	0,56
4	23,6	20,5	0,48	23,6	20,5	0,37
5	23,6	20,5	0,85	23,6	20,3	0,72
6	23,6	20,5	0,54	23,6	20,3	0,61
7	23,6	20,6	0,87	23,6	20,4	0,81

4.2 Montaje de estándares de control

Para llevar a cabo un proceso de estandarización, es necesario verificar el comportamiento de la metodología en diferentes rangos de trabajo propuestos previamente, por lo tanto, se corren estándares de rango bajo, medio y alto, es decir, 10, 198 y 1000 mg/L O₂ respectivamente. La repetibilidad de las mediciones se logra establecer según los resultados de las muestras realizadas por triplicado, en siete días sucesivos. Y la reproducibilidad, se logra evaluar mediante la replicación de las pruebas por parte de otro analista del laboratorio.

A continuación, se presenta el promedio de las 3 diluciones realizadas, por cada analista para el estándar bajo de 10 mg/L:

Tabla 17. Valores promedio obtenidos para el estándar bajo (10 mg/L) en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.

Ensayo (día)	Analista	
	1	2
	DBO ₅	DBO ₅

1	10,05	9,82
2	9,66	10,99
3	10,62	9,87
4	11,21	10,17
5	9,80	11,20
6	9,59	9,45
7	9,66	9,7

El estándar de 198 ± 30 mg/L de O_2 , es el patrón estándar de la metodología, es decir el patrón que debe ser siempre montado a la par con un lote de muestras. Este patrón no necesita diluciones, pero se siembra por triplicado, en este caso, usando también un analista 2.

Los resultados promedios obtenidos para este estándar se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Valores promedio obtenidos para el estándar medio (198 ± 30 mg/L), en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.

Ensayo (día)	Analista	
	1	2
	DBO ₅	DBO ₅
1	189,20	199,08
2	190,13	191,17
3	194,27	188,58
4	180,83	184,15
5	189,10	191,68
6	190,65	187,50
7	180,50	183,00

El estándar alto de 1000 mg/L fue realizado por triplicado y los promedios obtenidos para los dos analistas se muestran a continuación

Tabla 19. Valores promedio obtenidos para el estándar alto (1000 mg/L), en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.

Ensayo (día)	Analista	
	1	2
	DBO ₅	DBO ₅
1	1025,78	1015,43
2	1028,26	1012,52

3	1023,98	1027,22
4	1026,23	1015,63
5	1029,46	1023,63
6	1016,63	1024,98
7	1019,98	1013,87

4.3 Montaje de muestras

En la estandarización es necesario también demostrar la efectividad de la metodología sobre muestras reales, de origen tanto residual, como superficial, inicialmente, la repetibilidad de los valores obtenidos para las muestras de origen residual (M1) y origen superficial (M2), puede variar conforme varía la composición de las mismas a través de los días, pues el ensayo de la DBO₅ establece que las muestras a ser analizadas deben ser recolectadas mínimo 24 h antes del montaje del ensayo.

A continuación, se presentan los resultados promedio de los experimentos realizados por triplicado para cada uno de los analistas.

Tabla 20. Valores promedio obtenidos para la muestra de origen residual M1, en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.

Ensayo (día)	Analista	
	1	2
	DBO ₅	DBO ₅
1	83,70	87,24
2	91,28	82,32
3	97,65	101,06
4	89,38	91,45
5	91,55	114,,70
6	89,69	97,45
7	94,66	83,08

El mismo procedimiento realizado para la muestra de origen superficial se muestra en la tabla 19.

Tabla 21. Valores promedio obtenidos para la muestra de origen superficial M2, en los 7 días de ensayo para el Analista 1 y 2.

	Analista
--	----------

Ensayo (día)	1	2
	DBO ₅	DBO ₅
1	6,46	6,54
2	5,89	7,73
3	7,24	7,87
4	6,05	9,16
5	5,69	6,54
6	5,21	9,30
7	5,98	5,90

El método de DBO₅ es un ensayo cuantitativo que está sometido a variaciones biológicas de difícil control, cuyo aporte al error puede ser eliminado cuando se establecen las condiciones óptimas controladas de temperatura de inoculación. Sin embargo, debido a que tanto los patrones como las muestras, son preparados y obtenidos diariamente, el error entre las mediciones es de un rango mayor que para otros análisis químicos.

Según los valores obtenidos en la etapa previa a la estandarización, la estandarización de la metodología puede llevarse a cabo con resultados conformes, puesto que se verifica que el método es selectivo, su linealidad y rango son aceptables, así como su precisión y exactitud.

4.4 Tratamiento estadístico de datos

Los datos obtenidos anteriormente deben ser organizados para posteriormente realizar un análisis estadístico sencillo, el primer paso de este análisis es realizar el rechazo de datos, para posteriormente estimar la precisión y la exactitud de la metodología. En la tabla 22 se ordenan todos los resultados obtenidos por los dos analistas en los 7 días de estandarización. Los valores para el blanco de agua de dilución (Ba) y blanco inoculado (Bi) son en términos del O₂ consumido durante los 5 días de la incubación. Los valores de los patrones y las muestras son en términos de la DBO₅ calculada según la fórmula mencionada en el apartado 2.4. Cabe resaltar que los existen intervalos de 3 a 4 días en la realización de las pruebas, y en los días 1 al 7, los dos analistas realizaron los montajes en paralelo, esto con el fin de evaluar la reproducibilidad de las mediciones.

Tabla 22. Valores de oxígeno disuelto obtenidos para el blanco del agua de dilución (Ba) y blanco inoculado (Bi), y DBO₅ para los patrones de 10, 198 y 1000 mg/L O₂, y la muestra residual (M1) y superficial (M2).

	Día	Muestras corridas						
		Ba	Bi	P10	P198	P1000	M1	M2
		Consumo O ₂		DBO ₅ (mg/L O ₂)				
Analista 1	1	0,11	0,39	10,05	189,20	1025,78	83,70	6,46
	2	0,11	0,37	9,66	190,13	1028,26	91,28	5,89
	3	0,12	0,59	10,62	194,27	1023,98	97,65	7,24
	4	0,11	0,48	11,21	180,83	1026,23	89,38	6,05
	5	0,15	0,85	9,80	189,10	1029,46	91,55	5,69
	6	0,11	0,54	9,59	190,65	1016,63	89,69	5,21
	7	0,17	0,87	9,66	180,50	1019,98	94,66	5,98
Analista 2	1	0,19	0,45	9,82	199,08	1015,43	87,24	6,54
	2	0,11	0,52	10,99	191,17	1012,52	82,32	7,73
	3	0,11	0,56	9,87	188,58	1027,22	101,06	7,87
	4	0,10	0,37	10,17	184,15	1015,63	91,45	9,16
	5	0,18	0,72	11,20	191,68	1023,63	114,70	6,54
	6	0,13	0,61	9,45	187,50	1024,98	97,45	9,30
	7	0,11	0,81	9,70	183,00	1013,87	83,08	5,90

4.4.1 Rechazo de datos

Cuando se llevan a cabo experimentos que incluyen mediciones repetidas, puede encontrarse la presencia de datos anómalos que difieren del conjunto de datos y que se deben a errores humanos más que del método o la técnica que se está usando [14]. El rechazo de datos se lleva a cabo con el fin de ubicar estos valores ya que la desviación estándar, y por tanto el coeficiente de variación y el porcentaje de error pueden verse afectados y a fin de evitar tenerlos en cuenta a la hora de realizar el análisis estadístico. Existen varios métodos de rechazo de datos como el contraste de Dixon, sin embargo, la ISO prefiere el uso del contraste de Grubbs [14] en el cual se compara el valor sospechoso, con el promedio y la desviación estándar de los datos [Ec 6]:

$$G = \frac{|valor\ sospechoso - \bar{x}|}{s} \quad \text{[Ecuación 6]}$$

Donde para un 95% de confianza, el valor crítico de G es 2,37, y se rechazan todos los datos para los cuales G traspasa el valor crítico. En la tabla 23 se muestran los valores de G calculados para cada uno de los datos de la tabla 22, donde se rechaza el dato de la muestra residual (M1) del día 5 para el segundo analista.

Tabla 23. Valores calculados de G para los valores del blanco de agua de dilución (Ba), blanco inoculado (Bi), patrones de 10, 198 y 1000 mg/L O₂ (P10, P198 y P1000 respectivamente), y las muestras residuales (M1) y superficial (M2).

Contraste de Grubbs calculada								
Analista	Día	Muestras corridas						
		Ba	Bi	P10	P198	P1000	M1	M2
1	1	0,638	1,105	0,126	0,124	0,703	1,036	0,288
	2	0,638	1,221	0,758	0,305	1,129	0,145	0,738
	3	0,307	0,054	0,797	1,111	0,394	0,604	0,327
	4	0,638	0,584	1,753	1,504	0,780	0,369	0,612
	5	0,685	1,560	0,531	0,105	1,335	0,113	0,896
	6	0,638	0,236	0,871	0,407	0,868	0,332	1,274
	7	1,346	1,676	0,758	1,568	0,293	0,252	0,667
2	1	2,007	0,757	0,499	2,046	1,074	0,620	0,225
	2	0,638	0,352	1,397	0,508	1,574	1,199	0,713
	3	0,638	0,120	0,418	0,004	0,950	1,005	0,824
	4	0,968	1,221	0,068	0,858	1,040	0,125	1,841
	5	1,677	0,807	1,737	0,607	0,334	2,608	0,225
	6	0,130	0,170	0,972	0,206	0,566	0,580	1,951
	7	0,638	1,328	0,693	1,082	1,342	1,109	0,730

El uso del contraste de Grubbs se realiza ya que el número de observaciones es 14 y este excede al número para el cual es aconsejable el contraste de Dixon. Este dato excede el valor de la DBO₅ para la muestra residual del día 5, pues indica una DBO₅ de 114,7 mg/L de O₂ a diferencia del obtenido por el analista 1 que es de 91.55, y este último es más acorde con los datos obtenidos a través de los días. En la DBO₅ estos valores pueden presentarse debido a que el O₂ disuelto en las soluciones iniciales puede verse afectado por la manera en el analista manipula las muestras y realiza el procedimiento, pero el cálculo del valor de G permite corroborar la validez de los demás datos y así trabajar con los valores más confiables.

4.4.2 Límite de cuantificación del método

Usando las mediciones del estándar de rango bajo (E_b) (10 mg/L), se calcula el límite de detección de la metodología.

La ecuación 1 es reemplazada por los valores del patrón y la desviación estándar de las 14 medidas realizadas, para 13 grados de libertad y un nivel de confianza del 99%, el valor de $t=2,65$, como se muestra en el anexo 6.

$$LCM(DBO_5) = C_{Eb} \pm t_{n-1} \times s \text{ [Ecuación 1]}$$

$$LCM(DBO_5) = 10 \pm 1,636 \text{ mg/L } O_2$$

Se han reportado límites de cuantificación para el método de DBO_5 mucho menores que 10 mg/L O_2 [50], sin embargo, cada laboratorio está en completa libertad de escoger sus rangos de trabajo, con el único requisito de que se cumpla con las exigencias de los entes certificadores, por tanto se escogió este valor ya que es lo suficientemente bajo, y lo suficientemente alto para responder a los posibles cambios a los que puede someterse el método como: diferente analista, cambios en la calidad de agua de dilución, entre otros.

Además, de acuerdo a los valores permisibles establecidos en la resolución 0631 del Ministerio de Ambiente, el parámetro de DBO_5 establece valores muy por encima de los 10 mg/L de O_2 , con lo que el límite de detección establecido permite llevar a cabo un análisis en el marco de la resolución mencionada.

4.4.3 Precisión

Usando el rechazo de datos del apartado 4.4.1, se realiza el cálculo de las magnitudes estadísticas resumidas a continuación, para todas las muestras corridas, es decir Estándar bajo (E_b), estándar medio (E_m) y estándar alto (E_a) y además para las muestras de origen residual (M1) y superficial (M2).

Los blancos de agua de dilución se usan solo para demostrar que el consumo del agua de dilución es adecuada para la siembra de las muestras, y los blancos

inoculados para conocer el valor del consumo de oxígeno del consorcio microbiano y realizar el cálculo de la DBO_5 como se indica en el apartado 2.4. Cada muestra consiste en 14 datos, a excepción de la muestra M1 para la que se rechazó un dato anómalo. El resumen de los cálculos se muestra a continuación en la tabla 24:

Tabla 24. Parámetros estadísticos calculados para las muestras corridas en la estandarización, \hat{x} = promedio, s = desviación estándar, %CV= coeficiente de variación y LC (95%) = límite de confianza al 95%.

Magnitud estadística	Muestras Corridas				
	P10 (DBO ₅)	P198 (DBO ₅)	P1000 (DBO ₅)	M1 (DBO ₅)	M2 (DBO ₅)
\hat{x}	10,128	188,560	1021,686	90,808	6,826
s	0,617	5,141	5,824	5,848	1,268
%CV	6,094	2,726	0,570	6,440	18,575
LC (95%)	0,323	2,693	3,052	3,179	0,664

La precisión de los valores puede analizarse mediante la desviación estándar y el coeficiente de variación de los valores, como se observa en la Tabla 23, las desviaciones estándar son bajas, indicando poca dispersión de los datos obtenidos, e igualmente los coeficientes de variación se mantienen muy por debajo del 20% o incluso del 10%, a excepción de los blancos de agua de dilución e inoculados, pero esto no determina la precisión del método. A partir de esta información, el laboratorio estableció el límite del coeficiente de variación en 20%, es decir que, cuando se realizan los controles de calidad de la metodología; de montaje de lotes, de muestras por duplicado, o triplicado, y patrones estándar de 198 mg/L de O₂, los valores del coeficiente de variación no deben superar el 20%, de esta manera se asegura una precisión que permite efectos posibles como cambio de agua de dilución, inóculo, analista y reactivos, aunque cada vez que se realiza un cambio importante se verifica que se obtengan estos resultados para la precisión.

4.4.4 Exactitud

Igual que la precisión, la exactitud es calculada usando los datos analizados en el apartado 4.4.1, pero solamente para los valores de los patrones de rango bajo (Eb), rango medio (Em) y rango alto (Ea).

Cada uno de los estándares provee 14 datos a los cuales se les calcula el error relativo, y posteriormente este es promediado. La tabla 25 resume los valores de error relativo, y error relativo promedio para los estándares mencionados, usando para el cálculo la ecuación 15.

Tabla 25. Exactitud en términos del porcentaje de error relativo (%Er) para cada uno de los datos de los patrones de rango bajo (Eb), medio (Em) y alto (Ea), y sus valores promediados.

	Patrones (DBO ₅)		
	Eb (10 mg/L)	Em (198 mg/L)	Ea (1000 mg/L)
Error relativo (%Er)	5,5	8,838	1,252
	4,1	8,672	1,387
	3,4	7,576	1,543
	3,4	6,995	1,563
	3	5,303	1,663
	2	4,756	1,998
	1,8	4,495	2,363
	1,3	4,444	2,398
	0,5	3,975	2,498
	1,7	3,712	2,578
	6,2	3,449	2,623
	9,9	3,192	2,722
	12	1,884	2,826
	12,1	0,545	2,946
Promedio de %Er	1,279	4,767	2,169

Se puede apreciar en este cálculo realizado que el %Er para cada uno de los patrones analizados no supera el 10%, por lo que este valor se establece como el intervalo de error de la metodología. Este valor de error no es aplicable para el estándar de control de 198±30 mg/L de O₂, pero si para el límite cuantificación y cualquier estándar de diferente concentración que sea llevado a cabo bajo las condiciones del método.

4.5 Elaboración de documentos

Los resultados anteriormente calculados son adjuntados al documento de procedimiento de la metodología de DBO₅ y archivados para su revisión constante por cualquier analista encargado y previamente capacitado para realizar el ensayo.

El cuadro resumido de los parámetros de estandarización del método que queda consignado en la documentación se presenta a continuación en la tabla 24.

Tabla 26. Cuadro adjuntado al documento de procedimiento, que resume los parámetros de calidad calculados para la metodología de demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅)

Nombre del método	Determinación de DBO ₅ por el método de Membrana SM 5210 B. y 4500-O G		
Parámetro	Valor	Unidades	Observación
Límite de detección	10	mg/L	Corresponde al límite de cuantificación
Precisión como %CV	20%	N.A	Para niveles de concentración altos y bajos
Exactitud como %Er	10%	N.A	Para estándares de concentración baja y alta
Intervalo de aplicación del método	10 – 1000	mg/L	Con la mayor dilución posible o aceptable.

4.6 Repetibilidad

La repetibilidad es evaluada con los valores obtenidos por cada analista por separado, pues esta es estimada en condiciones iguales por un solo operador, en este caso, en cada análisis realizado, se utilizaron los mismos reactivos, el mismo equipo de lectura y los mismos materiales, a excepción de las botellas Winkler, las cuales no fueron las mismas y el agua de dilución la cual debe ser recogida en fresco, para cada día de la prueba.

Tabla 27. Valores estadísticos calculados para los ensayos realizados por cada analista en los 7 días de estandarización de la metodología de DBO₅

	Muestras Corridas				
	P10	P198	P1000	M1	M2

Magnitud estadística	(DBO ₅)	(DBO ₅)	(DBO ₅)	(DBO ₅)	(DBO ₅)
	Analista 1				
\hat{x}	10,084	187,811	1024,331	91,130	6,074
S	0,611	5,179	4,579	4,388	0,638
%CV	6,060	2,758	0,447	4,815	10,511
LC (95%)	0,453	3,837	3,392	3,250	0,473
% Error	3,314	6,662	1,681	-	-
	Analista 2				
\hat{x}	10,171	189,309	1019,040	93,900	7,577
S	0,669	5,397	6,016	11,533	1,326
%CV	6,577	2,851	0,590	12,282	17,498
LC (95%)	0,496	3,998	4,457	8,543	0,982
%Error	5,871	2,873	2,656	-	-

En la Tabla 27 se observa como para cada analista los valores límite establecidos de coeficiente de variación y porcentaje de error se mantienen dentro del 20% y 10% respectivamente, indicando que hay consistencia entre los valores repetidos usando las mismas condiciones, y el mismo analista. Esta repetibilidad es importante en el laboratorio pues comprueba la capacidad del método de responder de la misma forma a través de los días y funcionar de manera correcta respetando los atributos que sean establecido con la estandarización.

4.7 Reproducibilidad

La reproducibilidad de la metodología, se realiza cuando se evalúa el desempeño del ensayo de DBO₅, con diferentes analistas. Debido a que el operario otorga diferentes fuentes de error al método, se comparan los resultados obtenidos para los estándares y para las muestras sembradas en los siete días de estandarización.

La prueba t compara, para cada conjunto de datos tanto las medias y las desviaciones estándar, respectivamente.

Para esto se comparan los resultados de estos valores con los valores críticos de t , dependiendo de los grados de libertad (Anexo 6). Cuando los valores calculados superan los valores críticos se dice que hay diferencias significativas entre los análisis realizados por los dos operarios.

Tabla 28. Valores de los contrastes t calculados para cada uno de los conjuntos de datos pertenecientes a los estándares y a las muestras ensayadas, por cada uno de los dos operarios en los 7 días de estandarización.

Conjunto de Muestras	Valor de t
Eb (Estándar bajo 10 mg/L O ₂)	0,803
Em (Estándar medio 198 mg/L O ₂)	0,606
Ea (Estándar alto 1000 mg/L O ₂)	0,091
M1 (Muestra residual)	0,849
M2 (Muestra superficial)	0,025

El valor crítico de t es 2,45 para 6 grados de libertad, y un nivel de confianza del 95%. Debido a que se tienen 7 datos para cada muestra por cada analista, se habla de seis grados de libertad. Se puede observar en la tabla que ninguno de los valores calculados de t , supera el crítico 2,45.

Con lo anterior se concluye que el método es reproducible, es decir, se puede llevar a cabo por diferentes analistas sin que se encuentren diferencias significativas entre los resultados que se obtengan.

5. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Debido a que los parámetros asociados al resultado de las mediciones de oxígeno disuelto de la DBO₅ están sometidos a una incertidumbre que aleja la medida del valor real, es necesario estimar el rango de valores en los que puede abarcarse la medida analítica. Para calcular el valor de la incertidumbre para este método se tiene en cuenta el siguiente diagrama de espina de pescado donde se relacionan todas las posibles fuentes de incertidumbre para métodos electrométricos. Sin embargo, no todas las fuentes son estimadas para la realización de la estimación.

5.1 Cuantificación de las fuentes de incertidumbre

Dado a que es necesario un análisis estructurado de los efectos y las causas que aportan a la incertidumbre, se realiza un diagrama conocido como diagrama de espina de pescado [12]. En este diagrama se analiza las incertidumbres aportadas por cada procedimiento que se realiza en la siembra del patrón estándar de 198 mg/L de O₂.

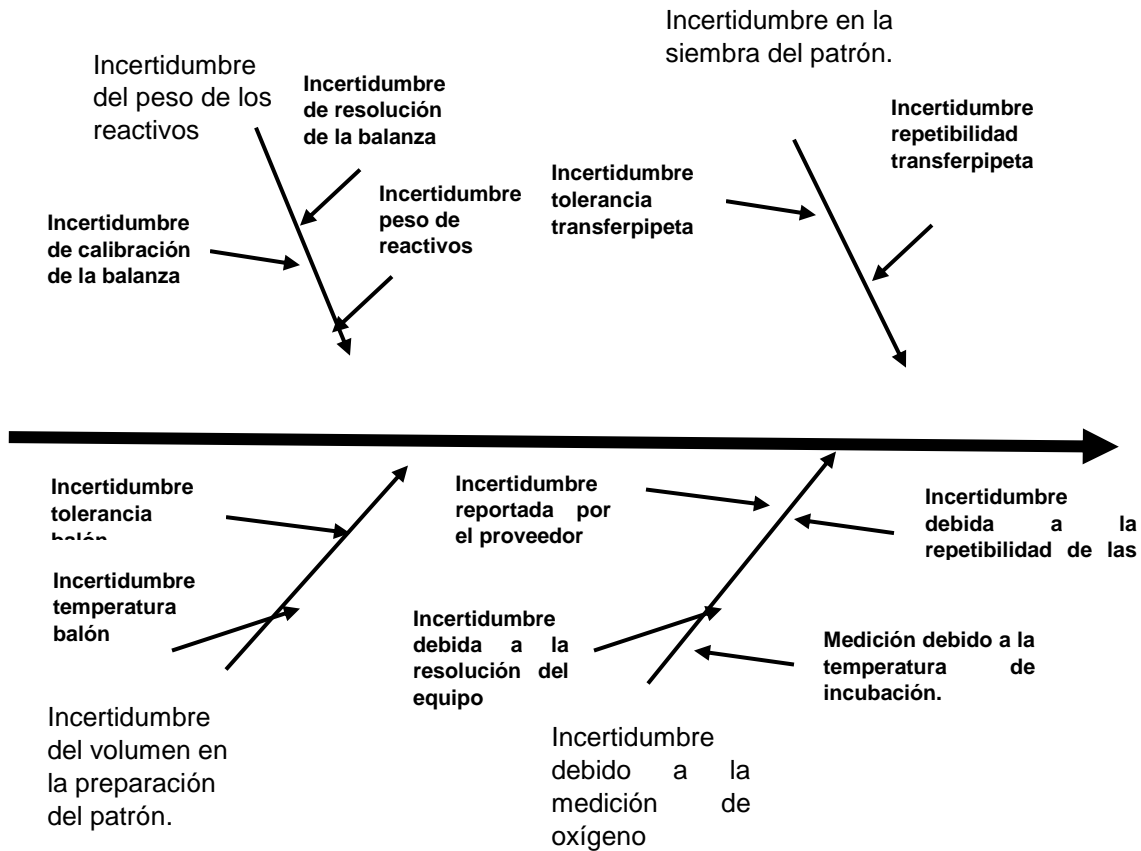


Gráfico 8. Diagrama de espina de pescado que relaciona todos los factores que aportan a la incertidumbre en la medición de patrón estándar de DBO₅ de 198 mg/L de O₂

Nota 1: No se dispone de la incertidumbre del material volumétrico (botellas Winkler).

Nota 2: Los cálculos realizados para la estimación de la incertidumbre se incluyen en el Anexo 8.

5.9 Expresión de la incertidumbre

La expresión de la incertidumbre expandida U indica la incertidumbre como un intervalo con la afirmación de un nivel de confianza del 95% aproximadamente de los valores en los cuales se encuentra el mensurando, en este caso, para el patrón de DBO₅ de 198 mg/L

$$Y = 198 \pm 2,703 \times 10^{-3} \text{ mg O}_2/\text{L}$$

6. DETERMINACIÓN DE LA DBO₅ EN DIFERENTES MUESTRAS DE ORIGEN RESIDUAL Y SUPERFICIAL

Una vez establecida la metodología completa para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno por incubación a cinco días (DBO₅), el laboratorio de Construcusuelos Suministros Ltda empezó a replicar el ensayo usando muestras proveniente de diferentes lugares, como vertimientos y cuerpos superficiales, sistemas de tratamiento de aguas residuales usadas en actividades variadas, como mataderos, hospitales, funerarias y empresas alimenticias, además de piscícolas, lavaderos y empresas que necesiten el reporte del análisis. A continuación, se resumen algunos ensayos realizados sobre muestras reales.

Tabla 30. Demanda bioquímica de oxígeno en aguas de diferente origen, analizadas por triplicado en el laboratorio de Construcusuelos Suministros Ltda.

Muestras	Piscícolas	Vertimientos de agua residual varias	Lavaderos de autos	Hospitales y vertimientos afines
DBO₅ (mg/L) O₂				
1	3,30	145,93	39,81	280,80
	2,30	147,56	41,54	267,10
	2,54	177,22	42,70	300,44
2	2,88	233,86	46,08	328,60
	2,45	262,81	38,92	321,36
	3,29	270,69	40,56	325,94
3	4,53	79,20	45,17	2977,10
	3,32	66,96	46,50	3453,40
	3,41	67,00	47,02	4422,67

Las muestras varían su valor de DBO₅, dependiendo del origen de las mismas, el entrenamiento para la siembra de las muestras en este ensayo debe llevar un acompañamiento bastante mayor que para otra determinación, puesto que se infieren las diluciones que deben ser realizadas para cada muestra usando métodos cualitativos, en los que se analizan algunas propiedades organolépticas

como el color, o el olor para llevar a cabo las diluciones. A continuación, se resumen algunas características del grupo de muestras analizadas:

- Las muestras provenientes de piscícolas son aguas superficiales con muy poca carga de contaminación orgánica. Dependiendo del punto de muestreo su aspecto es poco turbio y su olor no es muy fuerte.
- Las aguas provenientes de lavaderos de carros, presentan alta contaminación por materia orgánica debido a las grasas y demás sustancias derivadas del petróleo, sin embargo, algunos sistemas de tratamiento son eficientes en la remoción y logran disminuir el impacto de la contaminación.
- Las muestras de riesgo biológico, que provienen de hospitales, mataderos o incluso funerarias son bastante contaminadas, la mayor fracción de la materia orgánica de estas aguas es biodegradable y soluble lo que se demuestra con su fuerte y desagradable olor, a pesar de que algunas llegan con una turbiedad escasa.
- Los vertimientos de aguas residuales domésticas presentan un olor característico y generalmente contienen cantidades muy bajas de oxígeno, debido a la turbidez del agua o la presencia de sólidos suspendidos en ella. Estas aguas pueden variar en su concentración de materia orgánica.

Los eficientes sistemas de tratamiento muchas veces logran disminuir el impacto de estas aguas, hasta ubicar los rangos de DBO_5 por debajo de los valores máximos permisibles indicados en la resolución 0631 de 2015, es decir que no se excedan los 90 mg/L de O_2 , esto es lo ideal para cualquier sistema de tratamiento que se implemente en una empresa o industria de cualquier tipo, sin embargo muchas veces no es posible para estos sistemas reducir la carga, debido a diferentes factores, por lo que, como se observa en la planta se presentan vertimientos con valores que sobrepasan los límites.

7. CONCLUSIONES

7.1 Se demostró que la medición de oxígeno usando el electrodo de membrana, es más precisa y más rápida que utilizando el método titulométrico tradicional de modificación de azida, incluso cuando varía la temperatura de medición, y que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de métodos para la cuantificación del oxígeno disuelto.

7.2 Se comprobó que la variación de la temperatura, tiene un efecto lineal sobre la sensibilidad del electrodo, lo cual respalda que el electrodo de membrana usado para la medición del oxígeno disuelto de la DBO_5 muestra una respuesta aceptable para la realización de la estandarización del método.

7.3 Se logró la adaptación del consorcio microbiano proveniente de un agua residual doméstica, para ser usado como inóculo de los patrones de la DBO_5 , demostrándose con las curvas de consumo de oxígeno que el agua residual carece de sustancias tóxicas que puedan intervenir negativamente en la degradación de la materia orgánica biodegradable.

7.4 La efectividad del inóculo escogido fue demostrada a través del tiempo con la siembra de patrones que siempre arrojaron valores aceptables a pesar de ser sembrados con inóculos recogidos en diferentes semanas.

7.5 Los valores de consumo de oxígeno del agua de dilución menores a 0,2 mg/L, demostraron que el agua utilizada es óptima para la realización del ensayo de DBO_5 , y que el agua está libre de materia orgánica que pueda intervenir en el desarrollo del ensayo.

7.6 El resultado obtenido en la siembra de los patrones de DBO_5 permitieron aseverar que los instrumentos, los reactivos y la metodología usada para la determinación de la DBO_5 eran adecuadas para llevar a cabo este procedimiento sobre muestras desconocidas, de cualquier origen y diferentes cargas de contaminación por materia orgánica biodegradable.

7.7 La estandarización del ensayo de demanda bioquímica de oxígeno, fue lograda con éxito, calculándose las magnitudes estadísticas permitidas por la metodología y llevándose a cabo todos los controles de calidad exigidos por el Standard Methods en el SM 5220 B, teniéndose valores de precisión en términos del coeficiente de variación del 20%, y una exactitud, en términos del porcentaje de error del 10%.

7.8 Fueron estimadas las mayores fuentes de incertidumbre de la metodología, con lo cual el método de DBO_5 queda cobijado con todos los requisitos de calidad exigidos por el IDEAM, para la acreditación de la técnica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jiménez Cisneros, B. & Galizia Tundisi, J. (2012). *Diagnóstico del agua en las Américas* (1st ed.). México: IANAS. Disponible en: [http://www.ianas.org/water/book/diagnostico del agua en las americas.pdf](http://www.ianas.org/water/book/diagnostico%20del%20agua%20en%20las%20americas.pdf) [Fecha de consulta 15 de marzo de 2017]
- [2] Organización Panamericana de Salud. (2013). *Salud Ambiente y Desarrollo Sostenible: Hacia el futuro que queremos* (pp. 9- 16). Washintong D.C: Ultradesings. Disponible en: <http://www.paho.org> [Fecha de consulta 15 de marzo de 2017]
- [3] Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. (2004). *Plan Nacional de Manejo de Aguas Residuales en Colombia* (pp. 5,8). Bogota. Disponible en: <http://portalterritorial.gov.co> [Fecha de consulta 15 de marzo de 2017]
- [4] Ministerio de Salud, (2014). Informe Nacional de la Calidad del Agua para Consumo Humano Año 2013 con Base en el IRCA. Bogotá, pp.35, 88- 90. Disponible en: www.minsalud.gov.co [Fecha de consulta 15 de marzo de 2017]
- [5] Decreto 3930 de 2010. Por el cual se reglamenta parcialmente el Título I de la Ley 9ª de 1979, así como el Capítulo II del Título VI -Parte III- Libro II del Decreto-ley 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos y se dictan otras disposiciones. Santa Fé de Bogota. 25 de Octubre de 2010 Disponible en: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=40620> [Fecha de consulta: 19 de octubre de 2017]
- [6] Resolución 0631 de 2015. Por el cual se establecen los parámetros y valores límite máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones. Santa Fé de Bogota. 18 de Marzo de 2015. Disponible en: http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/d1-res_631_marz_2015.pdf [Fecha de consulta: 19 de Octubre de 2017]
- [7] Decreto 2269 de 1993. por el cual se organiza el Sistema Nacional de Normalización, Certificación y Metrología. Santa Fé de Bogotá. 16 de Noviembre de 1993. Disponible: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=32037> [Fecha de consulta: 19 de Octubre de 2017].
- [8] Julieth Fernanda, R. (2008). *Documentación de los requisitos de equipos de la norma NTC - ISO/IEC 17025:2005 para el laboratorio EMICAL LTDA*. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis131.pdf> [Fecha de consulta 15 de marzo de 2017]
- [9] Tamayo-García, Pedro, Guevara-Guerrero, Elia I., Suárez-Piña, Wilfredo, El sistema de gestión en laboratorios de calibración para su acreditación Ciencias Holguín [en línea] 2014, XX (Octubre-Diciembre). Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181532583003>> ISSN [Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017]
- [10] Instituto Nacional de Salud,. (2014). *Lineamientos Técnicos para la Estandarización y Validación de Métodos de Ensayo*. Bogota. Disponible en: <http://www.ins.gov.co> [Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017]
- [11] Gustavo, C. (2006). *Estandarización de Métodos Analíticos* (2nd ed., pp. 1-12). Disponible en: http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion_metodos_analaticos.pdf/ [Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017]
- [12] Rice, E., Baird, R., & Eaton, A. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (22nd ed., pp. 7-19). Washintog DC.

- [13] Carvajal Londoño, A., Giraldo Gomez, G., & Gutierrez Gallego, A. (2010). *Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad Físicoquímica del Agua* (1st ed., pp. 13,14). Manizales: Blanecolor Ltda. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/49658/7/9789588280394.pdf> [Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017]
- [14] Miller, J., Miller, J., Maté Jiménez, C., & Izquierdo Hornillos, R. (2008). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Madrid [etc.]: Pearson Prentice-Hall.
- [15] Gustavo, C. (2006). *Estandarización de Métodos Analíticos* (2nd ed., pp. 1-12). Disponible en: http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion_metodos_analaticos.pdf/ [Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017]
- [16] Williams, A., & Ellison, S. (2011). EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertain in Analytical Measurement (3rd ed., pp. 14, 21, 25-27). Reino Unido: SRL Ellison, A Williams. Disponible en: http://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf [Fecha de consulta: 17 Jul. 2017].
- [17] Pérez Hernández, M. (2012). Centro Español de Metrología. Estimación de incertidumbres Guía GUM. España. Revista Española de Metrología. Disponible en: https://www.uv.es/melajl/Docencia/WebComplementarios/GuiaGUM_e_medida.pdf [Fecha de consulta: 19 de Octubre de 2017]
- [18] Barinas Olaya, J. (2016). Estimación y expresión de la incertidumbre en medidas experimentales. (Maestría) Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/56648/7/jaimeorlandobarinasolaya.2016.pdf> [Fecha de consulta: 21 de Octubre de 2017]
- [19] Maroto Sánchez A. (2002) Incertidumbre en metodos analíticos de rutina. (Tesis Doctoral). Universitat Rovira I Virgili. Terragona. Pág 41-43 Disponible en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8987/tesis_Alicia_Maroto.PDF [Fecha de consulta: 23 de Octubre de 2017]
- [20] Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. IDEAM,. (2014). Estudio Nacional del Agua (p. 13). Disponible en: http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023080/ENA_2014.pdf [Fecha de consulta: 17 Jul. 2017].
- [21] Torres, P., Cruz, C., & Patiño, P. (2009). Índices de la calidad del agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano, una revisión crítica. Revista Ingenierías Universidad De Medellín, Vol 8, pp 82. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rium/v8n15s1/v8n15s1a09.pdf> [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [22] Jouanneau, S., Recoules, L., Durand, M., Boukabache, A., Picot, V., & Primault, Y. et al. (2014). Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. *Water Research*, 49, 62-82. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.066> [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [23] Kumar, R., Kumar, A., Sharma, A., Gangal, V., & Makhijani, S. (1999). Formulation and standardization of a microbial composition useful for reproducible BOD estimation. *Journal Of Environmental Science And Health, Part A*, 34(1), 125-144. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1080/10934529909376827> [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [24] Goslan, E., Seigle, C., Purcell, D., Henderson, R., Parsons, S., Jefferson, B., & Judd, S. (2017). Carbonaceous and nitrogenous disinfection by-product formation from algal organic matter. *Chemosphere*, 170, 1-9. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.148> [Consulta: 28 Jul. 2017]

- [25] Young, J., McDermott, G., & Jenkins, D. (1981). Alterations in the BOD Procedure for the 15th Edition of "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 53(7), 1256-1257. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/25041460>. [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [26] El-Rehaili, A. (1995). Response of BOD, COD and TOC of secondary effluents to chlorination. *Water Research*, 29(6), 1571-1577. Recuperado de: [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00234-x](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(94)00234-x) [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [27] Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. IDEAM,. (2014). Estudio Nacional del Agua (p. 13). Disponible en: http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023080/ENA_2014.pdf [Fecha de consulta: 17 Jul. 2017].
- [28] Gaitan, M. (2004). Determinación de Oxígeno Disuelto por el Método Yodimétrico Modificación de Azida (1st ed., pp. 1-9). Disponible en: <http://www.ideam.gov.co> [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [29] Navarro Roa, O. (2007). Determinación de Oxígeno Disuelto por el Método Electrométrico (2nd ed., pp. 1-10). Disponible en: <http://www.ideam.gov.co> [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [30] Kanwisher, J. (1959). Polarographic Oxygen Electrode (4th ed., pp. 210-212). Woods Hole: Association for the Sciences of Limnology and Oceanography. Recuperado de: http://m.aslo.net/lo/toc/vol_4/issue_2/0210.pdf [Consulta: 28 Jul. 2017]
- [31] Ju, L. and Ho, C. (1985). Measuring Oxygen Diffusion Coefficients with Polarographic Oxygen Electrodes: I. Electrolyte Solutions. [online] Wiley Online Library. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260271015/pdf> [Consulta: 13 Oct. 2016].
- [32] Lozada Díaz, R. (2011). Estudio de planes estrategicos de desarrollo para la comuna 1 de la ciudad de Neiva (p. 17). Neiva. Disponible en: <http://alcaldianeiva.gov.co/Gestion> [Consulta: 31 Jul 2017].
- [33] Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2017). Resolución 0631del 17 de marzo de 2015: por la cual se establecen los parámetros y los valores máximos permisibles en vertimientos puntuales a cuerpos de agua superficiales, y a los sistemas de alcantarillado público, y se dictan otras disposiciones. Disponible en: <http://www.minambiente.gov.co> [Consulta: 31 Jul 2017]. [26] McKeown, J., Brown, L., & Gove, G. (1967). Comparative studies of dissolved oxygen analysis methods. *Water Pollution Control Federation*, Vol 39(8Ed), pág1325,1327,1329,1335. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/25035778> [Consulta: 20 Jul. 2017].
- [34] McKeown, J., Brown, L., & Gove, G. (1967). Comparative studies of dissolved oxygen analysis methods. *Water Pollution Control Federation*, Vol 39(8Ed), pág1325,1327,1329,1335. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/25035778> [Accessed 20 Jul. 2017].
- [35] User guide BOD AUTOSTIR- DO probe. (2007) Thermo Fisher Scientific Inc. Disponible en: <https://www.instrumart.com/assets/TSO-AutoStir-UserGuide.pdf> [Fecha de consulta: 29 de Octubre de 2017].
- [36] Skoog, D. Donal, M. Holler, F. (1997) Fundamentos de Química Análítica. Editorial Reverté. 4Ed. Vol 2. Pág 458.
- [37] Hale J.M. (1980). Some considerations of the steady-state and transient behaviour of membrane-covered dissolved oxygen detectors. *Journal Electroanalytical Chemistry*. 107; 281-

294. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072880802014 [Fecha de consulta: 30 de Octubre de 2017].

[38] Generalidades sobre el manganeso. PDF. Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/432/Capitulo2.pdf>. [Fecha de consulta: 2 de noviembre de 2017]

[39] Kuan W.H., , Y. T. Lai. Oxidation of iodide by manganese oxide – An ATR-FTIR and dissolution study. PDF.

[40] R. Pribil. (1972) Analytical applications of EDTA and related compounds. Pergamond press. Berlín. Pág 117 -118.

[41] Barcelona, M., & Garske, E. (1983). Nitric oxide interference in the determination of dissolved oxygen by the azide-modified Winkler method. Analytical Chemistry, 55(6), 965-967. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00257a036> [Fecha de consulta 3 de Noviembre de 2017]

[42] Carpenter, J. (1965). The accuracy of the winkler method for dissolved oxygen analysis1. Limnology And Oceanography, 10(1), 135-140. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1965.10.1.0135> [Fecha de consulta 3 de Noviembre 2017]

[43] Fiscaro, P., Adriaens, A., Ferrara, E., & Prenesti, E. (2007). Assessment of the uncertainty budget for the amperometric measurement of dissolved oxygen. Analytica Chimica Acta, 597(1), 76-77. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.032> [Consulta 21 Jul. 2017].

[44] Mayari Navarro, R., Espinoza Lorens, M., & Gutierrez, J. (2005). Validación de La Determinación de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas y Aguas Residuales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, Vol 36, pág 6-7. Disponible en: <http://revista.cnic.edu.cu> [Consulta: 20 Jul. 2017].

[45] Khan, E., Sy-Savane, O., & Jittawattanasarat, R. (2005). Application of commercial biochemical oxygen demand inocula for biodegradable dissolved organic carbon determination. Water Research, 39(19), 4825. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.036>. [Consulta: 20 Jul. 2017].

[46] Fitzmaurice, G., & Gray, N. (1989). Evaluation of manufactured inocula for use in the BOD test. Water Research, 23(5), 655-657. Recuperado de: [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90032-8](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(89)90032-8) [Consulta 21 Jul. 2017].

[47] Block, J., Mathieu, L., & Servais, P. (1991). Indigenous bacterial inocula for measuring the biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in waters. Water Research, Vol 26(No 4), pp 482. Recuperado de: [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(92\)90049-A](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(92)90049-A). [Consulta: 21 Jul. 2017].

[48] Posada Uribe, L., & Mosquera Lopez, S. (2007). Biodegradación de la materia orgánica presente en las aguas residuales de una empresa de pinturas. (Pregrado). Universidad EAFIT. Disponible en: <https://repository.eafit.edu.co> [Consulta: 30 Jul. 2017].

[49] León Gil, C. (2009). *Estandarización y validación de una técnica para la medición de la demanda bioquímica de oxígeno por el método respirométrico y la demanda química de oxígeno por el método respirométrico* (Pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira. Disponible en: <https://repository.eafit.edu.co> [Consulta: 30 Jul. 2017]. [50] Castillo Bertel, M. Jaimes Morales, J. Acevedo Barrios, R. (2014) Precisión y exactitud para las determinaciones de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas por luminescencia. Ingenium. Vol 8. (No 19), pp 55-59. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/308088138> [Fecha de consulta: 23 de Octubre de 2017]

ANEXOS

Anexo 1 - Instructivo para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno disuelto en muestras de aguas según SM22 5210 B, SM22 4500 O-G

1. OBJETIVO

Establecer un procedimiento para determinar la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) en muestras de agua (potable, superficial, subterránea y residual) por incubación a cinco días y por el método de membrana

2. DEFINICIONES

OD = Oxígeno disuelto.

OD_i = Oxígeno disuelto inicial.

OD_r = Oxígeno disuelto residual.

DBO_5 = Demanda Bioquímica e Oxígeno – 5 días.

Inoculo o semilla = Cultivo heterogéneo de microorganismos aeróbicos que transforman la materia orgánica en CO_2 y H_2O .

Incubación = Tiempo en que la muestra se expone a una temperatura constante en oscuridad para que se lleve a cabo la degradación de la materia orgánica.

3. RESPONSABILIDAD

El director de Laboratorio es el responsable de revisar y verificar que este procedimiento se cumpla, así mismo debe realizar el entrenamiento respectivo al personal de laboratorio.

Los analistas químicos son los encargados de llevar a cabo la ejecución de los análisis de aguas, de acuerdo a lo estipulado en este instructivo.

4. CONDICIONES DE TRABAJO SEGURO

Ejecute de manera obligatoria el desarrollo de todo el análisis con los siguientes implementos de seguridad: uniforme antilfluidos, bata, guantes de nitrilo y gafas protectoras.

5. 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 y las aguas no bien mezcladas. Al momento no existe una forma de corregir o ajustar los efectos de estos factores.

6. TOMA Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

Tome la muestra de tal manera que sea representativa del vertimiento en estudio. Utilice frascos plásticos de polipropileno de 1000 mL de capacidad. Refrigere la muestra a 4 °C hasta el momento del análisis. Lleve las muestras a temperatura ambiente. Efectúe el análisis dentro de las 24 horas siguientes a la toma de la muestra.

7. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

7.1 EQUIPOS

pH-metro

Incubadora (Temperatura a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, excluida de toda fuente de luz para prevenir fotosíntesis)

Bomba de aireación

Termocupla

Balanza analítica digital Ohaus digital modelo

Oxímetro de mesa Thermoscientific Stara y Sonda.

7.2 MATERIALES

Botellas de Polipropileno de 1000 mL

Botellas Winkler de aproximadamente 300 mL de capacidad

Garrafa de 20 L de capacidad

Espátula metálica

Balón aforado de 1L Clase A

Balones aforados de 100 mL Clase A o Clase B

Pipetas graduadas de 10 mL Clase B

Transferpipeta de 1 – 10 mL

Puntas para transferpipeta

Probetas de 100, 250, 500 mL

Bureta

Pipetas

Beakers de 250, 500 y 1000 mL

7.3 REACTIVOS

Agua desionizada

Solución Buffer de Fosfato: Disolver 8,5 g KH_2PO_4 , 21,75 g K_2HPO_4 , 33,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1,7 g NH_4Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada y diluir a 1 L. Ajustar el pH de la solución a 7,2. Descartar la solución si se observa un crecimiento biológico dentro de la botella.

Solución de Sulfato de Magnesio: Disolver 22,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada y diluir a 1 L.

Solución de Cloruro de Calcio: Disolver 27,5 g CaCl_2 en agua desionizada y diluir 1 L.

Solución de Cloruro Férrico: Disolver 0,25 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada y diluir a 1L.

8. PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE VIDRIERIA

Use el material disponible, con control de calidad, que ha sido lavado con detergente biodegradable (material sumergido durante 30 min.), abundante agua de la llave y agua destilada, respectivamente. Seguir el procedimiento estándar de operación de lavado de material Anexo II PS-PRO-11.

La garrafa donde se prepara el agua de dilución debe lavarse antes y después de su uso con agua caliente y enjuagar varias veces con agua destilada, recoger el agua para el análisis. No aplicar jabón para el lavado.

9. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

Nombre del método	Determinación de DBO ₅ por el método de Membrana SM 5210 B. y 4500-O G		
Parámetro	Valor	Unidades	Observación
Límite de detección	10	mg/L	Corresponde al límite de cuantificación
Precisión como %CV	20%	N.A	Para niveles de concentración altos y bajos
Exactitud como %Er	10%	N.A	Para estándares de concentración baja y alta
Intervalo de aplicación del método	10 – 1000	mg/L	Con la mayor dilución posible o aceptable.

10. PROCEDIMIENTO

10.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Solución estándar Glucosa - Acido Glutámico, 198 ± 30,5 mg/L

Para mejores resultados seque una pequeña cantidad de los reactivos cada vez que se va a preparar esta solución.

En un vaso de precipitados coloque alrededor de 0,2 g de ácido glutámico y en otro 0,2 g de glucosa y séquelo a 102 – 104 °C durante una hora en el horno. Deje enfriar dentro del desecador, hasta temperatura ambiente. En un vaso de precipitado pese 0,1500 g de ácido glutámico y en otro 0,1500 g de glucosa.

Coloque 200 mL de agua destilada en un balón aforado de 1 L, transfiera cuantitativamente los 0,1500 g de ácido glutámico, enjuague varias veces el vaso que lo contiene, agite hasta disolución completa (No se disuelve fácilmente).

Transfiera cuantitativamente los 0,1500 g de glucosa, enjuague varias veces el vaso que lo contiene, agite hasta disolución completa se agrega éste en el mismo

balón del ácido glutámico. Complete a volumen y homogenice invirtiendo el balón varias veces.

Nota: Preparar el estándar todos los días antes de realizar la prueba.

10.2 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Todas las muestras: Verifique el pH; si este no se encuentra entre 6,0 y 8,0, verifique que la temperatura de la muestra se encuentra en un rango de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, y ajuste el pH entre 7,0 y 7,2 usando soluciones de Ácido sulfúrico o Hidróxido de sodio, de tal forma que la cantidad de reactivo no diluya la muestra en más del 0,5%. Las excepciones pueden estar justificadas con las aguas naturales cuando la DBO se va a medir a valores de pH in situ. El pH del agua de dilución no debe ser afectado por la dilución más baja de la muestra.

Preparación del Inoculo: Se utiliza una muestra de aguas residual tomada en Mansiones del Norte, Neiva Huila, la muestra se recolecta todos los martes.

Se toman 800 mL de muestra, se mezclan con 200 mL de agua desionizada y se pone a airear. En el momento de utilizar el inoculo para hacer la siembra, se toman 100 mL en un beaker y se deja decantar, filtrar el sobrenadante con papel filtro rápido y adicionar 1 mL a la muestra.

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS:

Preparación del Agua de Dilución: Llene la garrafa con agua desionizada y/o destilada, la necesaria para el análisis, teniendo en cuenta que el gasto aproximado es de 300 mL por botella winkler.

Airee el agua por dos horas mínimo, utilizando la bomba de los acuarios, que se encuentra disponible en el lugar de trabajo.

Verifique que la temperatura del agua de dilución sea de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Agregue 1 mL de cada una de las siguientes soluciones, por cada litro de agua de dilución a preparar: Solución tampón de fosfatos, Solución de sulfato de magnesio, Solución de cloruro de calcio, Solución de cloruro de hierro (III).

Preparación de las Diluciones: Se recomienda hacer al menos tres diluciones.

Utilice los siguientes porcentajes de agua residual cuando se preparen las diluciones:

Criterios para determinar la dilución aproximada de la muestra:

TIPO DE MUESTRA	MILILITROS DE MUESTRA
Residuales domésticas crudas fuertes	0,3 - 0,6 - 1,0
Residuales domésticas crudas normales	0,5 – 1,0 – 1,5
Residuales domésticas(estructuras intermedias)	1,0 – 2,0 – 3,0
Residuales domésticas tratadas (funcionamiento regular)	2,0 – 5,0 – 10
Residuales domésticas tratadas (funcionamiento normal)	5 – 10 – 20
Residuales domésticas tratadas (excelente funcionamiento)	10 – 20 – 50
Residuales lácteas, licores, cervecerías, gaseosas	10 100
Aguas superficiales parcialmente contaminadas	5,050
Aguas superficiales no contaminadas	50 – 70 – 90 – 100

Adición del Inoculo: Adicionar 1 mL de inoculo. El consumo de OD en la muestra cuando se le adiciona el inoculo, generalmente debe estar entre 0,6 y 1,0 mg/L.

El consumo de OD residual debe ser mayor o igual a 1 mg/L y el consumo de OD de las muestras debe ser mayor o igual a 2 mg/L.

Nota 1: El inoculo se adiciona únicamente a los patrones y muestras industriales.

Nota 2: Esto aplica únicamente para las muestras a las cuales se les ha adicionado inoculo.

Sellado de la Botella: Adicione suficiente agua de dilución observando que no quede ninguna burbuja en la botella. Para evitar la inclusión de aire en la botella durante la incubación, use un sello de agua en la boca de la botella y séllelas con vinipel, o papel aluminio.

Patrón Glucosa – Glutámico: Adicione 6,0 mL de solución estándar Glucosa – Glutámico, 1 mL de inóculo e inhibidor de la nitrificación por cada botella Winkler. El promedio para las tres botellas debe caer dentro del rango $198 \pm 30,5$ mg/L, si el valor promedio cae fuera de este rango, evalúe las causas y haga correcciones apropiadas. Si los valores altos son constantes, es debido a alta carga por parte del inóculo, agua contaminada o nitrificación. Valores bajos, indican baja cantidad o calidad de inóculo o la presencia de un material tóxico. Si los valores bajos persisten, preparen un nuevo estándar glucosa – glutámico y revise el agua de dilución e inóculo.

DETERMINACIÓN DEL OXÍGENO DISUELTO INICIAL:

Electrodo de membrana:

Calibración al 100% de saturación:

Atempere el cuarto de DBO a una temperatura de 20 ± 3 °C.

Conecte el polarógrafo de 5 a 15 minutos antes de empezar la calibración.

Llene una botella Winkler hasta aproximadamente la mitad de su volumen, tapala y agite constantemente durante cinco minutos.

Destape la botella, e introduzca la sonda de medición de oxígeno y asegúrese que no entre oxígeno a la botella.

En el medidor escoja la opción Calibrar.

Escoja la opción calibrar Aire, y presione empezar.

Cuando la calibración haya finalizado, asegúrese que la pendiente del equipo se encuentra en un rango de 12 nA/% Sat. Si no es así, repita la calibración.

Para asegurar que el equipo está bien calibrado mida el oxígeno inicial de agua saturada de oxígeno, y posteriormente mida el oxígeno disuelto de la misma

mediante el método de modificación de azida. El valor debe ser el mismo o cercano.

En caso de no lograr la temperatura a 20 ± 3 °C del cuarto, realice la calibración a 25 °C. La pendiente a esta temperatura debe estar en un rango de 13 nA/%Sat.

En caso de no lograr calibrar el equipo, retire la membrana y enjuague la celda y la membrana con agua destilada, y renueve la solución electrolítica de la membrana.

Si el electrodo todavía sigue fallando pule el electrodo con la lija como dice el instructivo del equipo.

Incubación de la Muestra: Incubar blancos, blanco de agua de dilución, blanco de agua inoculada, patrón de glucosa – glutámico, inóculo y las botellas con cada una de las diluciones a 20 ± 3 °C.

Determinación del OD final por modificación de azida o por electrodo de membrana:

Después de 5 días \pm 6 horas de incubación, determine la OD en todas las muestras, blancos y patrones.

10.3 CÁLCULOS Y RESULTADOS

Para muestras que se han inoculado, calcule la DBO₅ de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$DBO_5, \text{ mg O}_2/\text{L} = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2) \times f \times V}{V_m}$$

Dónde:

D1 = OD de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación, mg/L,

D2 = OD de la muestra diluida después de 5 d de incubación a 20°C, mg/L,

V = Volumen de la botella Winkler,

V_m = Volumen de alícuota de la muestra afectado por el factor de dilución,

B1 = OD del control de semilla antes de la incubación, mg/L

B2 = OD del control de semilla después de la incubación, mg/L

f = proporción de semilla en la muestra diluida a la semilla en el control de semilla

11. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Cada vez que pase un lote de muestras incluir como mínimo 3 estándares de control de 198 + 30,5 mg/L, triplicado del blanco de agua de dilución y triplicado del blanco inoculado.

Registre los valores en el formato AMB-FOR-08, si el resultado analítico cae fuera de los límites de control normales, deben revisarse los reactivos y los blancos, el análisis solo se puede reanudar cuando se corrija el problema.

Los blancos se analizan para determinar si la calidad del agua y de los reactivos es óptima.

12. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

No aplica.

13. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 22 Ed., New York, 2012.

PS-PRO-02 Procedimiento para el Control de Registros.

14. FORMATOS

AMB-FOR-08 Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) por modificación de Azida según SM 4500 O-C Y SM 4500 O-G .

Anexo 2 - Resultados de la comparación de la respuesta del equipo frente al método de referencia Winkler.

Valores de oxígenos disuelto para los métodos electrométrico y titulométrico a 10 °C

<i>T = 10 °C</i>	<i>Tmem=11,9</i>	<i>nA/%Sat=9,5</i>
<i>Tsln = 10,7</i>	<i>nA=946,6</i>	<i>Presión=725</i>
T (°C)	OD mem	OD win
10,2	8,2	8,25
10,6	8	8,05
10,6	7,98	8,2
10,9	8,04	8,2
10,5	8	7,9

Valores de oxígenos disuelto para los métodos electrométrico y titulométrico a 20 °C

<i>T= 20°C</i>	<i>Tmem=20,5</i>	<i>nA/%Sat=12,5</i>
<i>Tsln=20,4</i>	<i>nA=1226,7</i>	<i>Presión=721</i>
T (°C)	OD mem	OD win
20,2	8,1	8
20,1	8,13	8
20,4	8,09	8
20,7	8,13	8,05
20,3	8,06	8,1

Valores de oxígeno disuelto para los métodos electrométrico y titulométrico a 25 °C

<i>T= 25°C</i>	<i>Tmem=25,5</i>	<i>nA/%Sat=14,1</i>
<i>Tsln=25,7</i>	<i>nA=1388,1</i>	<i>Presión=724,7</i>
T (°C)	OD mem	OD win
25,7	8,31	8,25
25,2	8,34	8,65
25,1	8,39	8,25
25,1	8,36	7,95
25,2	8,35	8,3

Valores de oxígeno disuelto para los métodos electrométrico y titulométrico a 30 °C

<i>T= 30°C</i>	<i>Tmem=29,4</i>	<i>nA/%Sat=15,0</i>
<i>Tsln=30,3</i>	<i>nA=1460,1</i>	<i>Presión=722,8</i>
T (°C)	OD mem	OD win
30,5	7,25	7,5
30,1	7,25	7,63
30,3	7,35	7,37
30	7,3	7,58
30,1	7,3	7,42

Anexo 3 - Resultados obtenidos para la adaptación y control del inoculo

Prueba 1 del oxígeno consumido por el inoculo, los ensayos se realizan por duplicado.

Duplicado	1	2
Inoculo (mL)	Consumo O₂	Consumo O₂
1	0,53	0,56
2	0,79	0,58
3	1,09	0,95
4	1,13	1,23
5	1,37	1,53

Prueba 2 de oxígeno consumido por el inoculo, se observa una disminución apropiada del oxígeno disuelto.

Duplicado	1	2
Inoculo (mL)	Consumo O₂	Consumo O₂
7	2,08	2,16
9	2,84	2,58
10	3,34	3,45
12	3,65	3,73
15	4,62	4,53

Consumo de oxígeno por mililitro de inoculo utilizado para la realización de la estandarización.

Duplicado	1	2
Inoculo (mL)	Consumo O₂	Consumo O₂
7	2,97	2,06
9	2,4	2,91
10	2,93	3,17
12	3,77	3,90
15	6,01	4,66

Anexo 4 - Resultados de la medición de patrones límite de 3 mg/L O₂, 4mg/L O₂ y 5 mg/L O₂, de control intermedio de 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, y alto 500 mg/L y 1000 mg/L

Resultados obtenidos para el patrón de 3 mg/L O₂.

Patrón 3 mg/L	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1	100	23,2	20,9	2,73
	200	23,2	20,7	2,81
2	100	23,2	20,4	2,83
	200	23,2	20,6	3,05
3	100	23,2	20,4	4,32
	200	23,2	20,2	4,27

Resultados obtenidos para el patrón de 4 mg/L O₂.

Patrón 4 mg/L	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1	100	23,2	20,5	4,40
	200	23,2	20,7	3,61
2	100	23,2	20,6	4,68
	200	23,2	20,6	4,37
3	100	23,2	20,7	3,85
	200	23,2	20,5	3,84

Resultados obtenidos para el patrón de 5 mg/L O₂.

Patrón mg/L	5	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1		100	23,4	20,7	5,67
		200	23,4	20,4	5,25
2		100	23,4	20,6	5,39
		200	23,4	20,4	5,36
3		100	23,4	20,2	4,81
		200	23,4	20,7	5,78

Resultados obtenidos para el patrón de 10 mg/L O₂.

Patrón 10 mg/L	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1	30	23,3	20,1	9,30
	50	23,3	20,2	10,85
	70	23,3	20,3	9,19
2	30	23,3	20,5	10,77
	50	23,3	20,4	10,29
	70	23,3	20,2	9,77
3	30	23,3	20,1	8,29
	50	23,3	20,4	9,45
	70	23,3	20,1	9,45

Resultados obtenidos para el patrón de 50 mg/L O₂.

Patrón mg/L	50	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1		35	23,7	20,7	52,61
		30	23,7	20,6	52,29
		15	23,7	20,4	55,69
2		35	23,7	20,8	51,31
		30	23,7	20,6	53,78
		15	23,7	20,6	55,97
3		35	23,7	20,5	56,25
		30	23,7	20,8	50,74
		15	23,7	20,6	52,41

Resultados obtenidos para el patrón de 100 mg/L O₂.

Patrón mg/L	100	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1		5	22,3	20,3	113,79
		7	22,3	20,3	104,25
		10	22,3	20,3	125,47
2		5	22,3	20,5	94,77
		7	22,3	20,5	96,29
		10	22,3	20,7	95,23
3		5	22,3	20,6	104,04
		7	22,3	20,6	92,45
		10	22,3	20,7	111,98

Resultados obtenidos para el patrón de 500 mg/L O₂.

Patrón mg/L	500	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1		0,6	22,5	20,1	531,10
		1	22,5	20,3	525,91
		1,3	22,5	20,2	492,12
2		0,6	22,5	20,1	570,05
		1	22,5	20,1	576,3
		1,3	22,5	20,3	533,78
3		0,6	22,5	20,6	551,46
		1	22,5	20,4	537,18
		1,3	22,5	20,4	544,10

Resultados obtenidos para el patrón de 1000 mg/L O₂.

Patrón 1000 mg/L	Dilución (mL)	T (°C) inicial	T (°C) Final	DBO₅ (mg/L)
1	0,3	23,3	20,6	1057,19
	0,5	23,3	20,6	1097,02
	0,7	23,3	20,8	1112,72
2	0,3	23,3	20,6	1116,21
	0,5	23,3	20,6	1041,03
	0,7	23,3	20,4	1129,40
3	0,3	23,3	20,9	1054,53
	0,5	23,3	20,8	1122,11
	0,7	23,3	20,6	1071,39

Anexo 5 - Valores críticos para el contraste de Grubbs (G)

Valores críticos de G (P=0,05) para contraste de dos colas	
Tamaño de muestra	Valor critico
3	1.15
4	1.48
5	1.72
6	1.89
7	2.02
8	2.13
9	2.22
10	2.29
11	2.18
12	2.23
13	2.33
14	2.37

Valores tomados de Estadística y Quimiometria para Química Analítica, Miller James N. Miller Jane C. 4 Ed, 2002, Pearson Educación S.A. Madrid.

Anexo 6 – Valores críticos para el contraste t

Valores críticos de t para un nivel de confianza del 95%		
Grados de libertad	Nivel de confianza	
	99%	95%
1	31.82	12.71
2	6.96	4.30
3	4.54	3.18
4	3.75	2.78
5	3.36	2.57
6	3.14	2.45
7	3.00	2.36
8	2.90	2.31
9	2.82	2.26
10	2.76	2.23
11	2.72	2.18
12	2.68	2.14
13	2.65	2.12
14	2.62	2.10

Valores tomados de Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Miller James N. Miller Jane C. 4 Ed, 2002, Pearson Educación S.A. Madrid.

Anexo 7 - Valores críticos para el contraste F

Valores críticos de F para contraste de dos colas (P=0,05)						
g ₂	g ₁					
	1	2	3	4	5	6
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820

g₁ = grados de libertad de numerador, **g₂**= grados de libertad de denominador.

Valores tomados de Estadística y Quimiometria para Química Analítica, Miller James N. Miller Jane C. 4 Ed, 2002, Pearson Educación S.A. Madrid.

Anexo 8 - Cálculos de estimación de incertidumbre

Incetidumbre estándar peso de los reactivos

Se identifican tres fuentes de incertidumbre para la pesada:

- La incertidumbre de la calibración.
- La incertidumbre de la repetibilidad y la legibilidad.
- La incertidumbre asociada a la masa.

Esta se estima utilizando el dato extraído del certificado de calibración de la balanza. Esta estimación toma en consideración las tres contribuciones anteriormente identificadas.

Incetidumbre combinada de la balanza

Para un intervalo de confianza de 95,5% se tiene que la incertidumbre combinada de la balanza analítica Ohaus digital modelo PA214 es:

$$U_{c1} = \sqrt{(U_{calibración})^2 + (U_{resolución})^2} \quad [\text{Ecuación 8}]$$

Dónde *Ucalibración* corresponde a la desviación estándar reportada en el certificado de calibración del equipo OHAUS, y *Uresolución* es la resolución del equipo dividida por $\sqrt{3}$ suponiendo una distribución rectangular:

La *Ucalibración* está reportada en el certificado de calibración de la balanza y su valor es 0,0001.

La incertidumbre de la resolución se calcula a continuación:

$$U_{resolución} = \frac{0,0001}{\sqrt{3}} = 5,774 \times 10^{-5}$$

De esta forma la incertidumbre combinada para la balanza:

$$U_{c1} = \sqrt{(U_{calibración})^2 + (U_{resolución})^2}$$

$$U_{c1} = \sqrt{(0,0001)^2 + (5,774 \times 10^{-5})^2} = 1,155 \times 10^{-4}$$

Incertidumbre combinada e Incertidumbre estándar relativa para el peso de los reactivos

Teniendo en cuenta la incertidumbre anteriormente hallada, con el valor nominal (W) del peso se calcula la IER (incertidumbre estándar relativa), que corresponde a la relación entre la incertidumbre combinada y el peso.

$$IER = \frac{U_{c1}}{W} \text{ [Ecuación 9]}$$

Por otra parte, el certificado de la balanza aporta la siguiente ecuación para la estimación de la incertidumbre del peso de cada reactivo:

$$U = (9,30 \times 10^{-7} \times W) + (8,90 \times 10^{-5})$$

Se tiene en cuenta los componentes utilizados para el patrón estándar de glucosa-ácido glutámico de 198±30 mg/L O₂.

Calculo de incertidumbre del peso de los reactivos.

Componente	W (g)	U	IER Peso reactivos
Glucosa	0,15	8,914 x10 ⁻⁵	7,698x10 ⁻⁴
Ácido Glutámico	0,15	8,914 x10 ⁻⁵	7,698x10 ⁻⁴

Las incertidumbres estándar relativas calculadas se combinan para obtener la incertidumbre total debido al peso:

$$EIR_{Peso Reactivos} = \sqrt{(\Sigma EIR)^2} \text{ [Ecuación 10]}$$

$$EIR_{\text{Peso Reactivos}} = 1,089 \times 10^{-3}$$

5.3 Incertidumbre del volumen del patrón de 198±30 Glucosa-Acido Glutámico

El volumen final de solución preparado fue de 1000 mL en un matraz volumétrico marca Marienfeld. Para material volumétrico sin graduación existen tres fuentes de incertidumbre:

- Incertidumbre debido a la tolerancia.
- Incertidumbre debido a la temperatura
- Incertidumbre debido a la repetibilidad.

Sin embargo, no se puede calcular el factor repetibilidad del aforo debido a la capacidad de la balanza.

Para la tolerancia (incertidumbre tipo B) indicada por el fabricante como 1000 mL ±0,4mL, asumiendo una distribución triangular:

$$U_{\text{balón}} = \pm \frac{u}{\sqrt{6}}$$

$$U_{\text{balón}} = \pm \frac{0,4\text{mL}}{\sqrt{6}} = 1,633 \times 10^{-1}\text{mL}$$

La incertidumbre del matraz aforado bajo condiciones ambientales de 20±3°C despreciando la expansión del vidrio y solo teniendo en cuenta la expansión del agua $2,1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ se obtiene:

$$U_{\text{Temperatura}} = \pm \frac{(V \times \Delta T \times 2,1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1})}{\sqrt{3}} \text{ [Ecuación 11]}$$

$$U_{\text{Temperatura}} = \pm \frac{(1000\text{mL} \times 3 \text{ }^{\circ}\text{C} \times 2,1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1})}{\sqrt{3}} = 3,637 \times 10^{-1}\text{mL}$$

Con esto se calculan las incertidumbres combinadas para el volumen de preparación del patrón:

$$U_{c2} = \sqrt{(U_{\text{balón}})^2 + (U_{\text{temperatura}})^2}$$

$$U_{c2} = \sqrt{(1,633 \times 10^{-1})^2 + (3,637 \times 10^{-1})^2} = 0,399$$

Con esta incertidumbre se calcula la incertidumbre estándar relativa (IER):

Incertidumbre debido a la siembra del Patrón de Glucosa-Acido glutámico de 198±30

Debido a que para la preparación del patrón de glucosa-ácido glutámico, se toman 6 mL del patrón de 198 mg/L y estos se transfieren a una botella Winkler. Se estima la incertidumbre aportada en este proceso. Para esto se utiliza una transferpipeta de 10 mL y se tiene en cuenta diferentes fuentes de incertidumbre:

- Incertidumbre debido a la tolerancia de la transferpipeta.
- Incertidumbre debido a la repetibilidad de la transferpipeta.

Para el cálculo de la tolerancia de la transferpipeta se supone una distribución triangular, y se utiliza el valor de tolerancia reportado por el fabricante que es 0,14:

$$U_{\text{Transferpipeta}} = \frac{0,14}{\sqrt{6}} = 5,175 \times 10^{-2}$$

Para el cálculo de la incertidumbre debido a la repetibilidad, se realizan 10 medidas repetidas, y se calcula el promedio y la desviación estándar de las mediciones. Las medidas se presentan en el Anexo 8.

La desviación estándar se divide por el número de medidas realizadas para obtener la incertidumbre debida a la repetibilidad de la transferpipeta:

$$U_{\text{aliquota patrón}} = \frac{0,06205}{\sqrt{10}} = 0,0196$$

Y con los datos anteriores se calcula la incertidumbre combinada para la siembra del patrón:

$$U_{c3} = \sqrt{(U_{Transferpipeta})^2 + (U_{aliquota patrón})^2}$$

$$U_{c3} = \sqrt{(5,175 \times 10^{-2})^2 + (0,0196)^2} = 0,055$$

Incertidumbre debido al electrodo de medición de Oxígeno

Para la medición de oxígeno disuelto usando el Oxímetro de mesa Thermoscientific Stara 213 Serie No. X00813 Y sonda 081010MD, se tienen las siguientes fuentes de incertidumbre:

- Incertidumbre reportada por el proveedor.
- Incertidumbre debido a la resolución del equipo.
- Incertidumbre debido a la repetibilidad de la medida inicial del patrón.
- Incertidumbre debido a la temperatura de incubación.
- Medición final de oxígeno después de incubar el patrón.

Para el cálculo de la incertidumbre reportada por el proveedor, el valor de incertidumbre reportado por el proveedor se divide entre $\sqrt{6}$, usando una distribución triangular, para obtener la incertidumbre del equipo:

$$U_{equipo} = \frac{u}{\sqrt{6}}$$

Reemplazando u por 0,3 que es la que reporta el proveedor:

$$U_{equipo} = \frac{0,3}{\sqrt{6}} = 0,1225$$

Para la estimación de la incertidumbre aportada por la resolución del equipo se realiza el siguiente cálculo, suponiendo una distribución rectangular para la resolución:

$$U_{resolucion} = \frac{u}{\sqrt{12}}$$

Donde la resolución u es 0,01, este valor se reemplaza en la ecuación anterior:

$$U_{\text{resolucion}} = \frac{0,0,1}{\sqrt{12}} = 2,887 \times 10^{-3}$$

Para el cálculo de la incertidumbre debido a la medición inicial de oxígeno, es decir antes de la incubación, se realizan 10 mediciones iniciales y se calcula la desviación estándar y el promedio. Las mediciones se presentan en el Anexo 9.

Esta desviación estándar se divide entre el número de medidas para obtener la incertidumbre debida la titulación inicial del patrón:

$$U_{\text{medición inicial}} = \frac{0,2293}{\sqrt{10}} = 0,0725$$

Para la medición de oxígeno final se realiza procede de la misma forma, para una distribución normal, la incertidumbre de medidas repetidas. Las mediciones de oxígeno final se presentan en el Anexo 10.

Dividiendo la desviación estándar calculada por el número de medidas para obtener la incertidumbre debido a la medición de oxígeno final.

$$U_{\text{medición final}} = \frac{0,1408}{\sqrt{10}} = 0,0445$$

La temperatura de incubación es un parámetro clave que aporta a la incertidumbre debido a que afecta la solubilidad del oxígeno, se realizan medidas sucesivas de la temperatura de la incubadora, para estimar la incertidumbre asociada a la temperatura de incubación. Las medidas realizadas se presentan en el Anexo 11.

Esta desviación se divide entre el número de medidas para obtener la incertidumbre debido a la temperatura de la incubadora:

$$U_{T \text{ incubadora}} = \frac{0,2201}{\sqrt{10}} = 0,0696$$

Las incertidumbres calculadas se combinan para obtener la incertidumbre combinada debido a la medición de oxígeno:

$$U_{c4} = \sqrt{(U_{\text{equipo}})^2 + (U_{\text{resolucion}})^2 + (U_{\text{medición inicial}})^2 + (U_{\text{medición final}})^2 + (U_{T \text{ incubadora}})^2}$$

Reemplazando:

$$U_{c4} = \sqrt{(0,1225)^2 + (2,887 \times 10^{-3})^2 + (0,0725)^2 + (0,0445)^2 + (0,0696)^2} \\ = 0,165$$

Incertidumbre estándar combinada de la medición del patrón

La incertidumbre combinada se obtiene de la combinación de todas las incertidumbres combinadas anteriormente calculadas:

$$U_{CMEDICION \ DEL \ PATRÓN} = \sqrt{\sum U_{\text{calculadas}}^2}$$

Incertidumbres combinadas calculadas.

Resumen Incertidumbres Combinadas Calculadas (U)	Valor
U _{c2}	0,399
U _{c3}	0,055
U _{c4}	0,165
U _{cmediciónpatrón}	0,435

Incertidumbre estándar relativa de la preparación del patrón

Con el valor del volumen de las botellas Winkler (310 mL), calculamos la IER (Incertidumbre estándar relativa), la que corresponde a la relación entre la incertidumbre combinada y el volumen, así:

$$IER_{preparación\ del\ patrón} = U_C / \text{Volumen balón}$$

$$IER_{preparación\ del\ patrón} = 0,435 / 310\text{mL} = 1,403 \times 10^{-3}$$

Para hallar la incertidumbre relativa total (U_{total}), se combinan las incertidumbres estándar relativas para la pesada de los reactivos y para la preparación del patrón.

$$U_{total} = \sqrt{(IER_{Peso\ Reactivos})^2 + (IER_{preparación\ del\ patrón})^2}$$

$$U_{total} = \sqrt{(1,089 \times 10^{-3})^2 + (1,403 \times 10^{-3})^2} = 1,776 \times 10^{-3}$$

5.8 Incertidumbre expandida

Para el cálculo de la incertidumbre expandida Generalmente se desea un alto nivel de confianza. Esta se calcula por la multiplicación de las incertidumbres estándar combinadas por un factor de cubrimiento (k). Este factor es basado en el nivel de confianza deseado y para un nivel de confianza del 95%, k es 2 (valor crítico de t para el análisis de más de seis datos). El resultado se llama incertidumbre expandida U

$$U = (k)(IER) \text{ [Ecuación 12]}$$

Reemplazando los valores:

$$U = (2)(1,776 \times 10^{-3}) = 3,552 \times 10^{-3}$$

La incertidumbre expandida U indica entonces un intervalo, llamado intervalo de confianza, que representa una fracción de los valores en los que puede probablemente tomar el mensurando.

RECOMENDACIONES

- En la medición de oxígeno disuelto, cuando se compara la medición de O_2 disuelto, puede realizarse un análisis estadístico más amplio, que incluya mayor cantidad de réplicas, e incluso un análisis de la varianza (ANOVA). Así mismo para la calibración del patrón, estos ensayos proporcionarían mayor conocimiento acerca de la precisión de las metodologías. Además de analizar los resultados estadísticos, comparando diferentes magnitudes y escoger las más apropiadas para relacionar los resultados con la experiencia de la medición.
- Se puede también evaluar el efecto de interferencias en la medición de oxígeno de muestras reales.
- Para la medición de patrones de concentraciones diferentes puede tomarse un intervalo mayor de concentraciones para que el método sea aplicable a una mayor cantidad de muestras. Seguir realizando experimentos que permitan obtener límites de cuantificación más bajos.
- Por otro lado en la metodología previa a la estandarización, pueden analizarse muestras reales provenientes de diferentes fuentes para evaluar las interferencias o sustancias presentes que puedan afectar la medición de la DBO_5 . Así mismo para las muestras usadas para la estandarización puede usarse mayor cantidad de muestras reales superficiales y residuales.
- En el cálculo de incertidumbre, puede extenderse las magnitudes que aportan a la misma, con la medición de incertidumbres del muestreo, repetibilidad a través de los días de análisis, reproducibilidad en diferentes analistas. Evaluar la incertidumbre causada por la variación de la temperatura en la incubación, y obtener una cantidad de datos bastante amplia para realizar análisis de la varianza (ANOVA).