

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

ESCUELA DE FORMACION DE TECNÓLOGOS

VALIDACIÓN DEL MÉTODO RESPIROMÉTRICO PARA DETERMINAR DBO₅ EN AGUAS RESIDUALES Y NATURALES EN EL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCION DEL TÍTULO DE TECNÓLOGO EN AGUA Y
SANEAMIENTO AMBIENTAL**

STEPHANIE IVONNE LÓPEZ LOMA

stephye.4@gmail.com

DIRECTOR: ING. SANTIAGO GUERRA, Msc.

santiago.guerra@epn.edu.ec

CO-DIRECTOR: ING. LUIS JARAMILLO, MSc.

luis.jaramillo@epn.edu.ec

Marzo, 2018

CERTIFICACIÓN

Como responsables del trabajo de titulación “Validación del método respirométrico para determinar DBO₅ en aguas residuales y naturales en el Distrito Metropolitano de Quito” desarrollado por Stephanie Ivonne López Loma, estudiante de la carrera de Tecnología en Agua y Saneamiento Ambiental, habiendo supervisado la realización de este trabajo y realizado las correcciones correspondientes, damos por aprobada la redacción final del documento escrito para que prosiga con los trámites correspondientes a la sustentación de la Defensa oral.

Ing. Santiago Stalin Guerra Salcedo MSc.

DIRECTOR

Ing. Luis Ángel Jaramillo Sánchez MSc.

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Stephanie Ivonne López Loma, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Stephanie Ivonne López Loma

DEDICATORIA

A lo largo de mi vida estudiantil he soñado con este momento, culminar mis estudios en la gloriosa Escuela Politécnica Nacional, ha sido un camino lleno de retos y logros, que los he podido sobrellevar gracias a la compañía y enseñanzas de todas aquellas personas que estuvieron conmigo, por ello es grato para mí dedicar este trabajo de titulación a:

Mi padre Dios, por ser mi luz y mi guía, por permitirme tener el apoyo de mi familia y de todas aquellas personas que formaron parte de este camino y que además me brindaron su apoyo y amistad.

Mi padre Edwin López, por ser una parte importante de mi corazón, quien gracias a su esfuerzo, cariño y trabajo me ayudo a formar mis principios y los pilares de mi educación.

Mi madrecita Guadalupe Loma, por regalarme la vida y hacer de ella lo más lindo y hermoso, por brindarme todo su amor, por ser la persona más importante en mi vida y por mostrarme el camino hacia la superación.

Mi hermano querido Jefferson López, por darme siempre lo mejor de sí y ser mi ejemplo de superación, por brindarme su tiempo y sus valiosos consejos impulsando mis deseos de ser mejor.

AGRADECIMIENTO

Al culminar el presente trabajo de titulación quiero agradecer a:

Dios por regalarme fortaleza y entendimiento en todas aquellas situaciones que se presentaron en esta etapa de mi vida.

Mi madre y hermano, quienes con su amor y comprensión me alentaron siempre y en todo momento a seguir adelante y cumplir mi meta.

A la Escuela Politécnica Nacional al igual que todos mis maestros quienes me compartieron sus conocimientos y enseñanzas a lo largo de la carrera.

A mi director de tesis Santiago Guerra Msc. quien gracias a su apoyo, confianza y capacidad ayudó a que este trabajo culminara con éxito.

A la Ing. Valeria Díaz y todos los ingenieros que forman parte del Laboratorio de la Secretaría de Ambiente, que muy amablemente me abrieron las puertas y permitieron que alcanzara un crecimiento personal como profesional, en especial a la Ingeniera Pamela Freire por ser mi maestra y guía en la realización de este proyecto de titulación.

A mis amigos Jorge y Noemí, personas incondicionales quienes me han brindado su amistad y compañía en todo momento.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción	1
1.1	Objetivo General.....	2
1.2	Objetivos Específicos	2
1.3	Alcance.....	2
1.4	Marco teórico.....	3
1.4.1	Características generales de las aguas residuales	3
1.4.2	Demanda Bioquímica de oxígeno método respirométrico	4
1.4.3	Validación.....	5
1.4.4	Normatividad	7
1.4.5	Limitaciones e interferencias	7
2.	Metodología	9
2.1	Puesta a punto	9
2.2	Criterios de aceptación	12
2.2.1	Exactitud.....	12
2.2.2	Precisión.....	12
2.3	Equipos	12
2.4	Reactivos.....	14
2.5	Materiales	14
2.6	Validación	15

3.	Resultados y discusión	17
3.1	Alcance.....	17
3.2	Principio.....	32
3.3	Preparación de soluciones.....	33
3.4	Experimentos de validación	35
3.5	Criterios de aceptación	41
3.5.1	Control:.....	41
3.5.2	Precisión.....	41
3.5.3	Ensayos de Aptitud.....	42
3.6	Implementación del método validado de DBO ₅ respirométrico.....	42
3.7	Análisis de resultados.....	43
3.7.1	Resultados de la prueba t en los ríos.....	45
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	48
4.1	Conclusiones	48
4.2	Recomendaciones	49
	Referencias bibliográficas	50
	Anexos	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen de análisis (WTW, 2017).	9
Tabla 2. Equipo OxiTop	12
Tabla 3. Equipos de laboratorio	13
Tabla 4. Equipo de protección	13
Tabla 5. Reactivos (RICE, Eugene W., 2012).	14
Tabla 6. Materiales para la Validación	15
Tabla 7. Parámetros y objetivos de validación para Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅).....	15
Tabla 8. Intervalo de trabajo	16
Tabla 9. Características de curvas de DBO (WTW, 2017).	17
Tabla 10. Inóculo-1: Pruebas de recuperación en 30 mg/l.	18
Tabla 11. Prueba de NaOH en 30 mg/l	19
Tabla 12. Adición de inóculo-1 en 300 mg/l con volúmenes: 2ml, 5ml, 10ml.....	20
Tabla 13. Resultados inóculo 2.....	21
Tabla 14. Prueba de %R en 30 mg/l con Levaduras dilución 20	23
Tabla 15. Levaduras dilución 40	24
Tabla 16. Bacterias dilución 2	25
Tabla 17. Bacterias dilución 1	26
Tabla 18. Datos de DBO ₅	27
Tabla 19. Prueba F	27

Tabla 20. Prueba t	28
Tabla 21. Concentración: 30 mg/l	29
Tabla 22. Concentración: 150 mg/l	30
Tabla 23. Concentración: 300 mg/l	30
Tabla 24. Purezas.....	31
Tabla 25.Preparación de agua de dilución.	32
Tabla 26. Preparación de soluciones. (RICE, Eugene W., 2012)	33
Tabla 27. Régimen de alimentación.....	34
Tabla 28. Volumen de nutrientes para alimentación de inóculo	35
Tabla 29. ANOVA nivel: 1	36
Tabla 30. Análisis estadístico ANOVA nivel 1	36
Tabla 31. Prueba F ANOVA nivel 1.....	36
Tabla 32. ANOVA nivel: 2	37
Tabla 33. Análisis estadístico ANOVA nivel 2	37
Tabla 34. Prueba F ANOVA nivel 2.....	37
Tabla 35. ANOVA nivel: 3	38
Tabla 36. Análisis estadístico ANOVA nivel 3	38
Tabla 37. Prueba F ANOVA nivel 3.....	38
Tabla 38. Resumen de ANOVA	39
Tabla 39. MRC.....	39

Tabla 40. Estimación de Incertidumbre	41
Tabla 41. Límite de Repetibilidad, $r_{95\%}$	41
Tabla 42. Límite de reproducibilidad, $R_{95. \%}$	41
Tabla 43. Análisis de DBO_5 en Ríos del DMQ.....	42
Tabla 44. Límites máximos permisibles para descargas líquidas. (Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, 2016).....	43
Tabla 45. Estándar concentración: 300 mg/l	43
Tabla 46. Prueba t, Río Guayllabamba	45
Tabla 47. Prueba t, Río Monjas	45
Tabla 48. Prueba t, Río Machángara	46
Tabla 49. Prueba t, Río San Pedro	46
Tabla 50. Prueba t, Río Pita.....	47
Tabla 51. Origen de variaciones nivel 1	53
Tabla 52. Origen de variaciones nivel 2	54
Tabla 53. Origen de variaciones nivel 3	54
Tabla 54. Datos de ANOVA día 1	56
Tabla 55. Datos ANOVA nivel 1: Día 2	57
Tabla 56. Datos de ANOVA día 3	57
Tabla 57. Datos de ANOVA Día 4.....	58
Tabla 58. Datos ANOVA nivel 2: Día 1	59
Tabla 59. Datos de ANOVA nivel 2: Día 2.....	59

Tabla 60. Datos ANOVA nivel 2: Día 3	60
Tabla 61. Datos ANOVA nivel 2: Día 4	61
Tabla 62. Datos ANOVA nivel 3: Día 1	61
Tabla 63. Datos ANOVA nivel 3: Día 2	62
Tabla 64. Datos ANOVA nivel 3: Día 3	63
Tabla 65. Datos ANOVA nivel 3: Día 4	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de curvas de DBO (WTW, 2017).	17
Figura 2. Curva de DBO ₅ % R: 30 mg/l.....	18
Figura 3. Prueba de NaOH	19
Figura 4. Curva de DBO ₅ Adición de Inóculo	20
Figura 5. Inóculo 2: % R 30 mg/l.....	22
Figura 6. Levaduras dilución 20	23
Figura 7. Levaduras dilución 40	24
Figura 8. Bacterias dilución 2.....	25
Figura 9. Bacterias dilución 1	26
Figura 10. Concentración: 30 mg/l	29
Figura 11. Concentración: 150 mg/l	30
Figura 12. Concentración: 300 mg/l	31
Figura 13. MRC 87 mg/l.....	40
Figura 14. Diagrama de Ishikawa.....	40
Figura 15. Estándar concentración: 300 mg/l.....	44
Figura 16. Muestra Río Guayllabamba	54
Figura 17. Muestra Río Monjas	55
Figura 18. Muestra Río Machángara.....	55
Figura 19. Muestra Río Pita	55

Figura 20. Muestra Río San Pedro.....	56
Figura 21. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 1	56
Figura 22. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 2	57
Figura 23. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 3	58
Figura 24. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 4	58
Figura 25. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 1	59
Figura 26. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 2	60
Figura 27. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 3	60
Figura 28. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 4	61
Figura 29. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 1	62
Figura 30. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 2	62
Figura 31. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 3	63
Figura 32. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 4	64

Índice de Anexos

Anexo 1. Ejemplo de cálculo para la obtención de la DBO_5 esperada.....	53
Anexo 2. Preparación de solución estándar de acuerdo a su pureza	53
Anexo 3. Origen de variaciones nivel 1	53
Anexo 4. Origen de variaciones nivel 2	54
Anexo 5. Origen de variaciones nivel 3	54
Anexo 6. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Guayllabamba	54
Anexo 7. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Monjas.....	55
Anexo 8. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Machángara	55
Anexo 9. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Pita	55
Anexo 10. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río San Pedro	56
Anexo 11. Datos ANOVA nivel 1: Día 1	56
Anexo 12. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 1	56
Anexo 13. Datos ANOVA nivel 1: Día 2	57
Anexo 14. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 2	57
Anexo 15. Datos ANOVA nivel 1: Día 3	57
Anexo 16. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 3	58
Anexo 17. Datos ANOVA nivel 1: Día 4	58
Anexo 89. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 4	58
Anexo 19. Datos ANOVA nivel 2: Día 1	59

Anexo 21. Datos ANOVA nivel 2: Día 2	59
Anexo 22. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 2	60
Anexo 23. Datos ANOVA nivel 2: Día 3	60
Anexo 24. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 3	60
Anexo 25. Datos ANOVA nivel 2: Día 4	61
Anexo 26. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 4	61
Anexo 27. Datos ANOVA nivel 3: Día 1	61
Anexo 28. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 1	62
Anexo 29. Datos ANOVA nivel 3: Día 2	62
Anexo 30. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 2	62
Anexo 31. Datos ANOVA nivel 3: Día 3	63
Anexo 32. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 3	63
Anexo 33. Datos ANOVA nivel 3: Día 4	63
Anexo 34. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 4	64
Anexo 35. Certificado de análisis: Sulfato de magnesio heptahidratado.	65
Anexo 36. Certificado de análisis: Glucosa	66
Anexo 37. Certificado de análisis: Ácido Glutámico	67
Anexo 38. Certificado de análisis: Hidróxido de Sodio	68
Anexo 39. Certificado de análisis: Cloruro de amonio	69
Anexo 40. Certificado de análisis: Cloruro férrico.....	70

Anexo 41. Certificado de análisis: Cloruro de calcio dihidratado	71
Anexo 42. Certificado de análisis: MRC de DBO.....	72

1. INTRODUCCIÓN

La calidad de agua de los cuerpos hídricos garantiza un desarrollo sostenible de la vida acuática y del ser humano. Una de las características esenciales de las sustancias es la biodegradabilidad, ya que permite la depuración de las aguas debido a la presencia de microorganismos, los cuales aprovechan estos componentes como fuente de energía para su metabolismo y reproducción. La presencia de cantidades elevadas de materia orgánica en el agua produce gran proliferación de bacterias aerobias mismas que consumen y generan escasez de oxígeno disuelto necesario para la sobrevivencia y desarrollo de las especies que habitan estas fuentes. Razón por la cual es fundamental realizar un análisis de las características físico-químicas, para determinar los niveles de contaminación por materia orgánica contenida en el agua (Knobelsdorf, 2005).

En la ciudad de Quito la Secretaría de Ambiente es la dependencia que se encarga de monitorear los 5 ríos que atraviesan a la ciudad, los cuales son: Guayllabamba, Monjas, Machángara, Pita y San Pedro, los tres primeros son receptores de las descargas de aguas residuales domésticas e industriales, las mismas que pueden contener diversos componentes inorgánicos y orgánicos, como resultado de las actividades realizadas por la población que habita el DMQ. Es por eso que se debe realizar, además de monitoreo, la caracterización de las aguas de estos ríos.

Dentro de la caracterización de aguas residuales la Demanda Bioquímica de Oxígeno o DBO es un parámetro característico de la presencia de materia orgánica en el agua residual, cuyo análisis requiere un período de cinco días para la obtención de resultados, razón por la cual es conocido como DBO₅. El equipo completo de OxiTop para la determinación de DBO₅ mediante el método respirométrico es un sistema diseñado para determinar la DBO por medio del cambio de presión dentro de la botella incubada en 5 días debido a la transformación del oxígeno consumido por microorganismos en dióxido de carbono (WTW, 2017).

En la actualidad, la Secretaría de Ambiente realiza análisis de DBO₅ siguiendo procedimientos que no se encuentran validados. Por esta razón y con el objeto de obtener criterios de aceptación en los resultados y demostrar que el método de análisis es adecuado para el uso previsto, fue necesaria la validación de éste, con el fin de afianzar el resultado del análisis de DBO mediante las diversas prácticas y

experimentación del desempeño del método, así como también la estimación de la incertidumbre del resultado, y ser lo suficientemente fiable. Del mismo modo la implementación del procedimiento para el análisis de DBO_5 complementa la caracterización del agua que realiza la Secretaría del Ambiente y ayuda en la evaluación de la calidad del agua de los ríos antes mencionados.

1.1 Objetivo General

Validar el método respirométrico para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en cinco días (DBO_5) en aguas residuales y naturales en el Distrito Metropolitano de Quito.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar las características y funcionamiento del equipo completo de OxiTop.
- Establecer los parámetros de validación: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de aceptación, exactitud, precisión, sensibilidad e incertidumbre.
- Colocar los criterios de aceptación y rechazo en el procedimiento específico de ensayo en función de los parámetros de validación.
- Analizar los resultados obtenidos.
- Implementar el método validado de DBO_5 respirométrico para el análisis del agua en los 5 ríos principales de Quito.

1.3 Alcance

El alcance del presente proyecto es el siguiente:

- Manipulación y comprobación de funcionamiento del equipo completo OxiTop.
- Puesta a Punto del método.- En la puesta a punto se comprobó y determinó las diversas variables para establecer las posibles acciones de corrección previa al análisis del DBO_5 en aguas residuales.
- Validación.- La validación del DBO_5 respirométrico, fue sustentada en el procedimiento específico de RICE, Eugene W. (2012) del mismo modo también se realizó la fijación de los parámetros con sus respectivos objetivos de validación.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características generales de las aguas residuales

Desde tiempos de la antigüedad las poblaciones alrededor del mundo buscaban diversos medios para obtener producción, bienestar y desarrollo, mediante actividades que contribuyeran a satisfacer sus necesidades básicas tanto materiales, psicológicas, sociales y ecológicas (Espigares y Pérez, s.f).

Mejorar la calidad de vida de la humanidad no ha sido una tarea fácil ya que el desarrollo en diversas áreas se ha fundamentado en el uso de agua y demás recursos naturales, los cuales al ser transformados mediante diversos tipos de procesos generan líquidos con altas cargas contaminantes que son vertidos en diversos cuerpos hídricos modificando así sus características naturales, lo cual impide el desarrollo normal del ser humano y los ecosistemas. Esta contaminación hídrica ha orillado a buscar alternativas para la disposición final del agua residual derivada del uso doméstico, agrícola e industrial (Espigares y Pérez, s.f).

De ahí la importancia de determinar la calidad del agua residual mediante la caracterización física, química y microbiológica, de lo cual son considerados como principales parámetros el pH, temperatura, sólidos suspendidos y disueltos, nitrógeno, fósforo, metales pesados y materia orgánica (López, 2007).

El enfoque de estudio de este proyecto es la materia orgánica ya que constituye una parte importante del agua residual, además es uno de los contaminantes que puede alterar las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua, y a su vez debilitar el desarrollo normal de los ecosistemas involucrados (Dávila, 2009).

Para el tratamiento de las aguas residuales es importante conocer el contenido de materia orgánica e inorgánica, el mismo que se puede obtener en función de parámetros importantes como la DQO y DBO (Espigares y Pérez, s.f).

Demanda química de oxígeno (DQO): determina la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica y materia susceptible a este proceso en función de un oxidante químico. La DQO se determina digstando un volumen de muestra en oxidantes como el dicromato de potasio en el caso de aguas residuales y el permanganato de potasio para el agua de consumo humano. La demanda química de oxígeno abarca la DBO, ya que al digstar un volumen de muestra, este proceso no diferencia entre materia orgánica y sus

interferentes, pero los cuantifica a ambos, razón por la cual el DQO siempre será mayor que ésta (Hernán, 2007).

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO): determina la cantidad de oxígeno requerido por los microorganismos para degradar la materia orgánica existente en una muestra de agua. Este parámetro se determina mediante la prueba de incubación de una muestra sembrada durante 5 días a 20° C mediante el Método Winkler o diferentes métodos manométricos como el Método Respirométrico (Hernán, 2007),

1.4.2 Demanda Bioquímica de oxígeno método respirométrico

El trabajo que se realiza en los laboratorios es exigente en cuanto al número de muestras se refiere, es por eso que se ha buscado una alternativa que facilite la obtención de resultados confiables basándose en técnicas respirométricas (Respirometría, s.f).

La respirometría es una técnica que proporciona una medida directa de oxígeno consumido por microorganismos mediante un manómetro que mide el cambio de presión. Los resultados son obtenidos mediante un bioensayo en un recipiente cerrado y enriquecido de oxígeno en condiciones de agitación y temperatura constantes. Se lo realiza en cinco días ya que aproximadamente el 80 % de la materia orgánica es degradada por bacterias aerobias en este lapso, lo que hace que este sea uno de los métodos más eficientes para la determinación de DBO (Respirometría, s.f).

Método respirométrico

Es un procedimiento manométrico que mide el cambio de presión producido en el interior de una botella, al generar un vacío debido a la absorción de CO₂ presente en la cámara como resultado de la respiración microbiana.

Para que el manómetro registre el cambio de presión es necesaria la absorción del gas generado en la botella, esto se logra de diferentes maneras:

- Adicionando la cantidad adecuada de un hidróxido alcalino de manera que esté en contacto directo con el gas.
- Adicionando un buffer en estado líquido que absorba el CO₂ en su totalidad.

Es importante determinar la cantidad de reactivos a ser utilizados para garantizar un cambio de presión sin alterar el valor real de consumo de oxígeno (WTW , 2017).

Para realizar el test se vierte la muestra en una botella ámbar parcialmente llena con un agitador magnético en su interior, luego se adiciona una semilla o inóculo, el cual contiene un volumen compuesto de bacterias que degradará la materia, después se adiciona un inhibidor de nitrificación para posteriormente tapar con un caucho perforado, en el cual se coloca pastillas de hidróxido de sodio. Esta tapa o capuchón asegura un cierre hermético de la botella al colocar el manómetro, este dispositivo revelará el valor de cambio de presión mediante una pantalla digital. Se lleva las botellas sembradas a una base magnética en una incubadora a temperatura constante durante cinco días. El instrumento manométrico proporciona el valor de la absorción de oxígeno diaria, pero es conveniente esperar al quinto día para obtener el resultado final del análisis (WTW , 2017).

Para que un resultado analítico sea apto para la toma de decisiones, este debe ser bastante confiable, por lo cual se hace necesaria la validación del método experimental (WTW , 2017).

1.4.3 Validación

Todos los días alrededor del mundo se realizan análisis en diversas áreas, con la finalidad de obtener resultados con un alto grado de confiabilidad, capaces de generar decisiones y respuestas ante una problemática (Mayarí, 2005).

Eurachem (2016) define, “Validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas.”

La validación de un método consiste en una fase de comprobación de resultados, mediante el estudio y experimentación de cada una de las etapas donde el o los parámetros seleccionados son evaluados de acuerdo al requerimiento del método (PAHO, 2002).

Para empezar a validar un método es necesario establecer los parámetros de validación: selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de aceptación, exactitud, precisión, sensibilidad e incertidumbre (PAHO, 2002).

Selectividad

Es cuantificar el analito deseado en presencia de interferencias agregadas intencionalmente (Eurachem, 2016).

Linealidad

Es la aproximación de una curva de calibración a una línea recta determinada, como resultado de realizar diversas mediciones en un intervalo de concentraciones. La ausencia de linealidad en un procedimiento depende netamente del equipo con el que se esté trabajando (Eurachem, 2016).

Límite de detección

También conocido como valor mínimo detectable, es decir el nivel más bajo de concentración medible del método que proporcione un nivel de confianza (Eurachem, 2016).

Límite de cuantificación

Se define como la magnitud mínima que puede cuantificarse con un criterio de exactitud aceptable (Eurachem, 2016).

Rango de aceptación

Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable (Eurachem, 2016).

Exactitud

La exactitud es el resultado expresado en porcentaje, obtenido de la diferencia entre un valor experimental y un valor teórico, el cual está determinado por un material de referencia certificado o MRC (Eurachem, 2016).

Precisión

Mide el nivel de concordancia entre los resultados obtenidos de una secuencia de mediciones repetidas de un analito específico, desarrolladas de acuerdo a las exigencias del método (Eurachem, 2016).

Sensibilidad

La sensibilidad es la variabilidad de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la concentración del analito con el uso de curvas de calibración (Eurachem, 2016).

Incertidumbre

La incertidumbre es un parámetro indicador comparativo de la calidad de medición y dispersión de los valores que pudieran ser asociados a la concentración de un analito (Crubellati, 2009).

1.4.4 Normatividad

Las actividades desarrolladas en el laboratorio se basan en un sistema de gestión de calidad acorde la norma INEN ISO/IEC 17025:2006 “Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo”. Por ende es sustancial realizar la validación de nuevas técnicas analíticas, con el fin de establecer mediante la experimentación que las diferentes características de desarrollo del método cumplen con el criterio de calidad necesario y considerarlo apto para ser aplicado.

De la misma manera, se considera los valores de límites máximos permisibles establecidos en la Norma Técnica para el control de descargas líquidas (NT002) de la Ordenanza 138 aplicada al Distrito Metropolitano de Quito.

1.4.5 Limitaciones e interferencias

En el análisis de DBO existen diversos factores que pueden afectar e interferir en los resultados, entre estos tenemos:

- La presencia de compuestos azufrados, hierro y todas sus formas.
- Evolución de los gases distintos del CO_2 que introducen errores en las mediciones de la presión o el volumen, lo cual es poco común en la presencia de oxígeno disuelto. La presencia de nitritos es la interferencia más común en las muestras de DBO_5 incubadas.
- La absorción del CO_2 incompleta presentará errores sin las cantidades y las concentraciones apropiadas del absorbente alcalino NaOH.

- Fluctuaciones de temperatura o una mezcla inadecuada presentará errores.
- La presencia de cloro residual, ya que su función principal es inhibir el crecimiento bacteriano (DR. Calderon Labs., 2007).

Previo a la prueba de DBO_5 es necesario la determinación de DQO lo que necesariamente requiere una cuantificación de cloruros, a su vez proporciona conocimiento de su presencia o no en las muestras antes de ser analizadas (RICE, Eugene W., 2012).

2. METODOLOGÍA

2.1 Puesta a punto

En la puesta a punto para el análisis de DBO₅ respirométrico se observaron y corrigieron las diferentes variantes, las cuales permitieron establecer las condiciones adecuadas para la validación. Por lo cual se consideró:

Concentración de la DBO a partir del DQO

El cálculo de la DBO teórica está dado en función del 66% del DQO, y de acuerdo a este valor se determina el volumen necesario para el análisis en la siguiente tabla:

Tabla 1. Volumen de análisis (WTW, 2017).

Valor esperado de DBO [mg / l]	Volumen de muestra a ser utilizado [ml]	Factor
0-40	432	1
0-80	365	2
0-200	250	5
0-400	164	10
0-800	97	20
0-2000	43,5	50

Así también para el cálculo de la DBO₅, WTW (2017) plantea la siguiente formula:

$$DBO_5 = [(DBO \text{ experimental} * \text{Factor}) - 2] \text{ mg/l}$$

Dónde:

DBO experimental: resultado obtenido del OxiTop, al finalizar los cinco días.

Factor: valor correspondiente de acuerdo al volumen de muestra a ser utilizado, como se visualiza en la tabla 1.

Selección del Inóculo

El inóculo o semilla es un volumen de carga bacteriana que es utilizado para la degradación de la materia orgánica presente en las muestras, motivo por lo cual es importante tener una carga representativa de bacterias, el consumo de oxígeno debe estar entre 1,5 mg/l y 2,0 mg/l, ya que estos valores representan la cantidad mínima necesaria para la sobrevivencia de las especies acuáticas, además es primordial visualizar las curvas de DBO para identificar los posibles problemas relacionados con el desarrollo de las bacterias a lo largo de 5 días de duración del análisis. Para determinar las características de la semilla se realizó la prueba de porcentaje de recuperación en 30 mg/l, la cual consistió en sembrar 2 ml de inóculo en un estándar de ácido glutámico y Glucosa con una concentración de 30 mg/l, durante 5 días a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó los cálculos necesarios y se determinó la cantidad de mg/l de oxígeno que consumen las bacterias.

Para la preparación del estándar de ácido glutámico y glucosa se añadió cantidades iguales de cada reactivo, es decir 15mg/l, y se realizó una regla de tres simple para obtener el valor teórico de DBO, como se muestra en el Anexo 1, tomando como base lo mencionado en el *Standard Methods* en el cual se expresa que una concentración de 300 mg/L tiene un consumo de oxígeno de $198 \pm 30,5$ mg/l.

Así también, el porcentaje de recuperación se expresa como (%R) y debe ser del $100 \pm 15\%$ para todas los niveles de concentración estipuladas para la validación del DBO₅ respirométrico.

Por consiguiente se establece la fórmula para el cálculo del %R en cada concentración (WTW , 2017).

$$\%R = \frac{\text{Valor del DBO5 experimental (mg /l)}}{\text{Valor del DBO5 teorico (mg /l)}} * 100$$

De acuerdo con RICE, Eugene W. (2012) el inóculo o semilla se lo puede obtener de las siguientes maneras:

- Preparación casera de inóculo utilizando residuos orgánicos como verduras, frutas, cereales, carne o pollo.

De acuerdo con lo mencionado se elaboró un inóculo a partir de agua reposada en un kilogramo de hígados de pollo durante 24 horas, se lo etiquetó como Inóculo-1.

- Tomar un volumen del sobrenadante de aguas residuales domésticas libres de surfactantes.

Se dejó reposar en un recipiente desechos orgánicos con un volumen de agua libre de cloro, se recogió el sobrenadante, se lo etiquetó como Inóculo-2.

- Obtener una preparación de semilla con una población microbiana inicial.
Se optó por experimentar con levaduras utilizadas en la elaboración de cerveza, ya que es una fuente con alta carga de microorganismos. Se almacenó y etiquetó como "Levaduras".
- Recolectar un volumen representativo de un sistema de tratamiento biológico de aguas residuales.

Se recolectó un volumen del efluente de una planta de tratamiento de un camal, y se lo etiquetó como "Bacterias".

Para todos los inóculos se realizaron las pruebas de porcentaje de recuperación en la primera concentración de la validación (30 ppm).

Una vez definidas las mejores recuperaciones y características adecuadas del desarrollo microbiano se seleccionó el inóculo de "Bacterias" (dilución 1) para la validación y se tomó como última prueba el porcentaje de recuperación y se confirmó su efectividad en dos concentraciones establecidas para la validación y en un estándar de 300 mg/l.

Del funcionamiento del equipo OxiTop

El manómetro consta de una pantalla de dos dígitos y dos botones "S" y "M" con el siguiente funcionamiento:

El botón "S" al presionarlo durante un segundo muestra el valor de oxígeno consumido en cualquier día.

El botón "M" al presionarlo señala rápidamente el valor de oxígeno consumido del último día.

Una vez preparada la muestra en la botella ámbar se coloca el OxiTop a manera de tapa roscada. Para iniciar el análisis se oprimen los dos botones juntos por 2 segundos para

encerrar el manómetro y comenzar una nueva fase de trabajo. Es importante prestar atención, si al pulsar cualquiera de los dos botones se visualiza las letras LO, ya que esto nos indica que el nivel de carga es baja, por lo que se reemplazará por nuevas baterías previo al análisis.

2.2 Criterios de aceptación

2.2.1 Exactitud

Obtenida de la precisión y la veracidad denominada como porcentaje de recuperación (%R) menor o igual al 15%.

2.2.2 Precisión

Denominada como porcentaje de coeficiente de variación (%CV) menor o igual al 5%.

2.3 Equipos

Para la validación el método respirométrico de DBO₅ se utilizó el equipo completo de OxiTop® IS12. En la tabla 2 se detalla los accesorios y características del equipo.

Tabla 2. Equipo OxiTop

Equipo OxiTop	
Botella ámbar	De cuello roscado, de 510 ml de capacidad
Agitadores magnéticos	De entre 4cm y 6cm de largo para garantizar una mezcla completa.
Capuchón de goma perforado	Sirve para contener las pastillas de hidróxido de sodio y además proporciona un cierre hermético al atornillar la cabeza de OxiTop.
Cabezales de medición OxiTop	Son tipos de manómetros que detectan el cambio de presión. Consta de una pantalla de dos dígitos, contiene dos botones especificados con las letras S y M respectivamente. Su límite de detección es de 1 mg/l
Plataforma de agitación doce ranuras integradas	Generan campos electromagnéticos alterno que hacen girar los agitadores magnéticos dentro de la botella.

Incubadora	Asegura la regulación de temperatura necesaria a 20 ± 5 °C, mediante termostatos integrados.
-------------------	--

La tabla 3 describe los equipos adicionales utilizados para el procedimiento de DBO, estos son:

Tabla 3. Equipos de laboratorio

Equipos	Sorbona
	Refrigerador
	Equipo de Ultrasonido
	Micropipetas electrónicas
	Balanzas analíticas
	pHmetro

Para el trabajo dentro de cualquier laboratorio es importante el uso del equipo de protección.

A continuación la tabla 4 muestra los componentes del equipo de protección básico:

Tabla 4. Equipo de protección

Equipo de protección	Mandil
	Guantes de látex
	Mascarilla, gafas y orejeras de ser necesario.

2.4 Reactivos

Los reactivos que se utilizaron para la elaboración de las diferentes soluciones fueron de grado reactivo y se los pudo preparar en diferentes concentraciones como se visualiza a continuación la tabla 5:

Tabla 5. Reactivos (RICE, Eugene W., 2012).

Reactivo	Soluciones	Concentración
Dihidrogenofosfato sódico: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Buffer fosfato	1,5 N
Cloruro de amonio: NH_4Cl	Cloruro de amonio	0,71 N
Cloruro de calcio: CaCl_2	Cloruro de calcio	0,25 N
Sulfato de magnesio heptahidratado: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio	0,41 N
Cloruro férrico hexahidratado: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro férrico	0,018 N
Solución alcalina: NaOH	Hidróxido de sodio	6 N
Solución ácida: H_2SO_4	Ácido	1 N
Ácido glutámico (GLU): $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	Ácido glutámico	150 mg/l
Glucosa: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Glucosa	150 mg/l

El agua de la fuente que se utilizó fue desmineralizada, es decir libre de aniones, cationes y sólidos disueltos totales, para la elaboración de todas las soluciones.

2.5 Materiales

Para realizar la validación fue importante el uso de materiales clase "A" calibrados, ya que "se encuentran dentro de los límites de error del volumen fijados por las normas DIN e ISO" (Brand, 2003), en la tabla 6 se visualiza los materiales utilizados para la validación.

Tabla 6. Materiales para la Validación

Micropipetas	Material volumétrico de vidrio clase "A"	Material adicional
De 1 a 10 µm.	Probetas de 250 ml y 500 ml	Cucharas metálicas
De 10 a 100 µm.	Balones de 50 ml, 100 ml, 500 ml y 1000 ml	Papel encerado
De 100 a 1000 µm.	Vasos de precipitación de 50 ml, 250 ml, 500 ml y 1000ml	Papel aluminio
De 1 a 10 ml.	Pipetas Pasteur.	Parafilm

2.6 Validación

La validación del DBO₅ respirométrico, se sustentó en el procedimiento específico de RICE, Eugene W. (2012), para lo cual se realizó la fijación de los parámetros con sus respectivos objetivos de validación como se detalla a continuación en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros y objetivos de validación para Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅)

PARÁMETROS		OBETIVOS DE VALIDACIÓN	
Selectividad/ Especificidad		Cuantificar al analito en presencia de interferentes	
EXACTITUD	Veracidad	<%R> (Rango del Porcentaje de Recuperación) 100±15%	
	Precisión	Repetibilidad	%CVR. (Coeficiente de Variación de Repetibilidad en todos los niveles de concentración) <5%
		Reproducibilidad	%CVR (Coeficiente de Variación de Reproducibilidad en todos los niveles de concentración) <5%
Incertidumbre		U % ; K=2 (Porcentaje de Incertidumbre en todos los niveles de concentración)	
Intervalo de Trabajo		Concentración mínima y máxima (mg/l) que se puede cuantificar con exactitud.	

De la misma manera la tabla 8 muestra las siguientes concentraciones de trabajo para la validación de la DBO5:

Tabla 8. Intervalo de trabajo

Concentraciones DQO (mg/l)	DBO teórico (mg/l)
30	19,8
50	33
150	99

Las concentraciones de validación se establecieron tomando como base el rango de trabajo del método de DQO acreditado y vigente en el laboratorio.

Para la preparación de cada una de las concentraciones se realizó el cálculo respectivo de acuerdo al Anexo 1.

Dentro de la validación se desarrolló un Análisis de Varianza (ANOVA) de 4X4, es decir se preparó 4 repeticiones por cada concentración en un día, durante 4 días, donde se obtuvo también las condiciones ideales de repetibilidad y reproducibilidad. Una vez finalizado el ANOVA los resultados obtenidos fueron analizados mediante un estudio estadístico fundamentado en el cálculo de medias, varianzas y determinación de porcentaje de recuperación, lo cual ayudó a determinar la veracidad y precisión del método.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Alcance

Puesta a punto

Para efecto de análisis y comparación de resultados, a continuación en la figura 1 se observa las curvas de desarrollo de DBO:

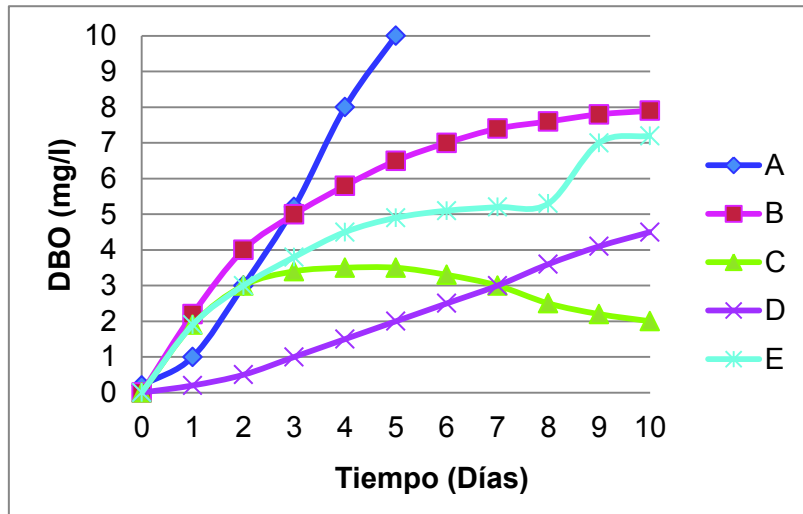


Figura 1. Ejemplos de curvas de DBO (WTW, 2017).

En la tabla 9 se describe las características de las curvas de DBO de la figura 1:

Tabla 9. Características de curvas de DBO (WTW, 2017).

Curvas	Características
A	El valor de la DBO _n es demasiado alto, el contenido de oxígeno en la botella no era suficiente. La muestra debe estar diluida u otro rango de medición seleccionado.
B	Curso normal de un gráfico de DBO _n .
C	El sistema no proporcionó ningún resultado correcto para el cálculo DBO _n . Posibles causas: siembra inadecuada con microorganismos, fugas, no dosificación o una dosificación demasiado baja de gránulos de NaOH, etc.
D	Las bacterias no pueden adaptarse a las condiciones ambientales especificadas, o la adición de microorganismos, fue insuficiente.
E	Se produjo un proceso no deseado, proceso nitrificación no deseada.

Preparación casera: Sobrenadante de agua de hígados de pollo

Inóculo-1

Los resultados obtenidos en la experimentación con el inóculo 1 en una concentración de 30 mg/l de estándar, fueron:

Tabla 10. Inóculo-1: Pruebas de recuperación en 30 mg/l.

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	8	30	32	34	36	36	182	NO
2	12	29	31	33	35	35	177	NO
3	12	29	32	33	33	33	167	NO
4	23	30	32	35	36	36	182	NO

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO₅ esperado: 19,8 mg/l

La figura 2 muestra la curva de crecimiento bacteriano del inóculo 1.

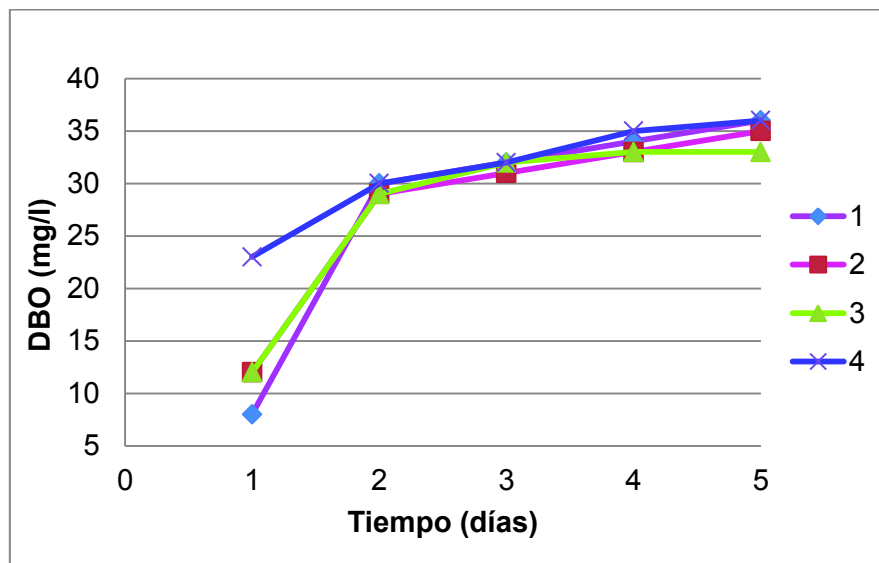


Figura 2. Curva de DBO₅ % R: 30 mg/l

Mediante la evaluación gráfica y numérica fue posible deducir que las curvas tenían características similares al literal "C" de la Tabla 9, es decir, una siembra inadecuada o

mala dosificación de NaOH. Lo que conllevó a realizar una prueba de dosificación tanto de hidróxido de sodio como de inóculo.

Dosificación de NaOH

Para determinar los resultados obtenidos en la dosificación de NaOH se desarrolló la siguiente tabla:

Tabla 11. Prueba de NaOH en 30 mg/l

Unidades	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
2	6	43	43	42	42	42	152	NO
3	5	42	43	43	42	42	152	NO
4	8	43	44	43	42	42	152	NO
6	6	42	43	42	42	43	155	NO

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO₅ esperado: 19,8 mg/l

A continuación se muestra las curvas de DBO obtenidas en las dosificaciones de NaOH.

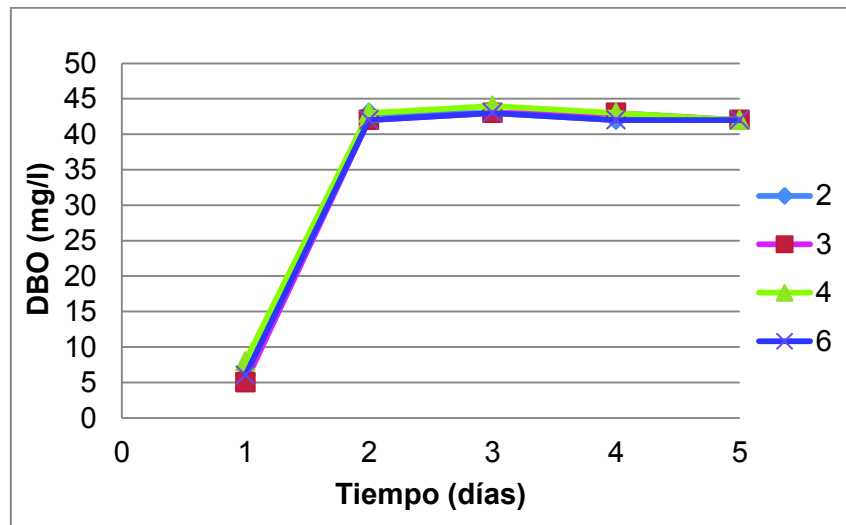


Figura 3. Prueba de NaOH

Observación

Las recuperaciones con las diferentes cantidades de pastillas de NaOH no fueron satisfactorias, pero se observó que el número de pastillas no generó variación significativa en los resultados, por lo que se siguió utilizando 4 pastillas para las siguientes pruebas.

Dosificación de inóculo

La siguiente prueba fue la dosificación de inóculo, donde se seleccionó 2ml, 5ml y 10ml de semilla y se realizó la prueba en un estándar de 300 mg/l, para comprobar su efectividad en una solución patrón. La tabla 12 detalla los resultados conseguidos:

Tabla 12. Adición de inóculo-1 en 300 mg/l con volúmenes: 2ml, 5ml, 10ml

Volumen	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% Recuperación
2 ml	3	31	41	42	42	208	105
5ml	5	31	38	40	42	208	105
10ml	6	31	43	44	44	218	110

Concentración del estándar: 300 mg/l

DBO₅ esperado: 198 mg/l

Así también en la figura 4 se graficó las curvas de crecimiento para determinar las características del inóculo.

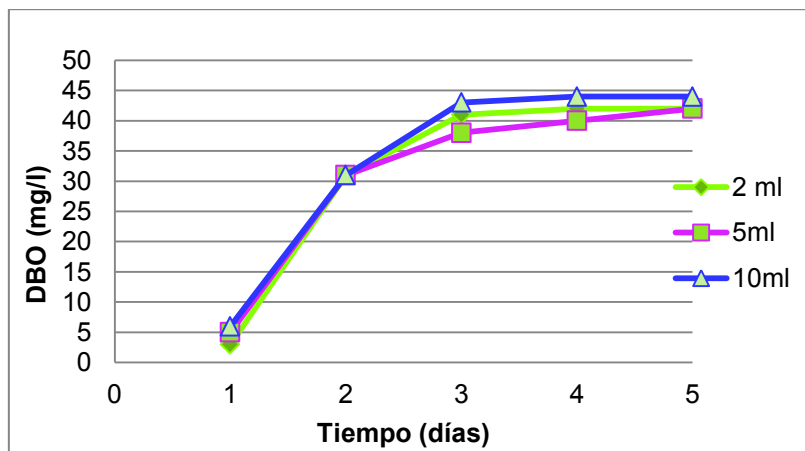


Figura 4. Curva de DBO₅ Adición de Inóculo

Observación

Las recuperaciones obtenidas con los diferentes volúmenes de inóculo cumplían con lo establecido de $100\pm 15\%$, por lo que se procedió a analizar las curvas de DBO_5 de cada volumen, en la cual se observó que persisten las características de la curva "C" de la Tabla 9, ya que los resultados no tienen variación significativa se utilizó 2ml de semilla para los siguientes análisis.

Acotando a las observaciones anteriores se dedujo que los factores considerados para las correcciones no eran fuente de error en estas pruebas, los porcentajes de recuperación no concuerdan con lo establecido ($100\pm 15\%$), en este caso y de acuerdo a las curvas de crecimiento se concluyó que el factor que interviene directamente en los resultados es la característica propia del inóculo, por lo que no se utilizó para la validación del método.

Sobrenadante de residuos domésticos (material orgánico)

Inóculo-2

Se desarrolló un segundo inóculo a partir de residuos domésticos y se lo utilizó en la prueba de DBO_5 con un estándar de 30mg/l.

La tabla 13 muestra los valores obtenidos en la experimentación con el inóculo 2.

Tabla 13. Resultados inóculo 2

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO_5 (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	16	43	43	43	43	43	207	NO
2	17	43	43	43	43	43	207	NO

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO_5 esperado: 19,8 mg/l

En la figura 5 se observa el crecimiento bacteriano del inóculo 2.

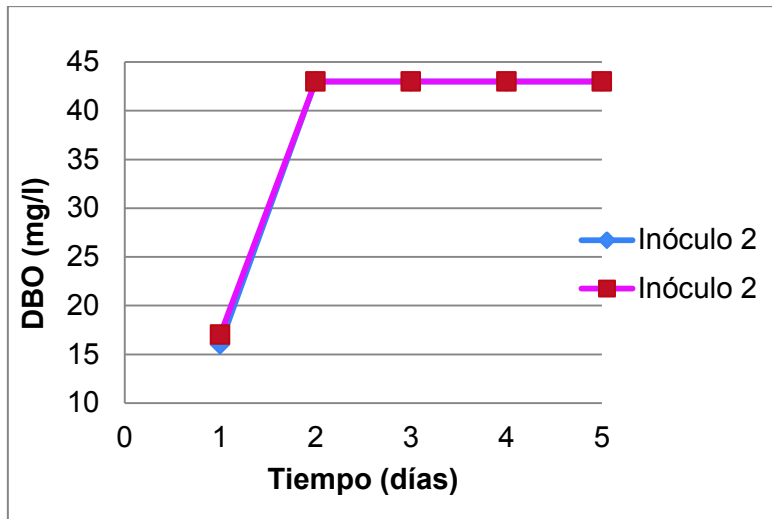


Figura 5. Inóculo 2: % R 30 mg/l

La interpretación de la gráfica y los resultados numéricos señalaron un desarrollo de las bacterias no acorde con lo esperado (curva “B” Figura 1, Tabla 9), marcando una semejanza a la curva “E” de la Figura 1, que indica la presencia de bacterias nitrificantes en el proceso de degradación de la materia. A consecuencia no fue viable desarrollar más pruebas previas a la validación con este inóculo.

Levaduras

Se obtuvo un inóculo de levaduras procedente del proceso de preparación de cerveza de cebada, de acuerdo al criterio analítico se realizaron diferentes diluciones del inóculo, para determinar su efectividad, por consiguiente se desarrolló de la siguiente manera:

Levaduras: Dilución 20

A partir del inóculo de levaduras puro se realizó una dilución 20 y se desarrolló la prueba de DBO₅ en un estándar de 30 mg/l.

Los resultados alcanzados en el análisis de DBO₅ utilizando el inóculo con una dilución 20 se encuentran detallados en la tabla 14.

Tabla 14. Prueba de %R en 30 mg/l con Levaduras dilución 20

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	2	3	11	29	34	34	162	NO
2	2	3	8	20	29	29	136	NO
3	2	3	10	26	33	33	157	NO
4	2	3	10	24	33	33	157	NO

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO₅ esperado: 19,8 mg/l

De la misma manera se determinó las características del inóculo a través de la figura 6.

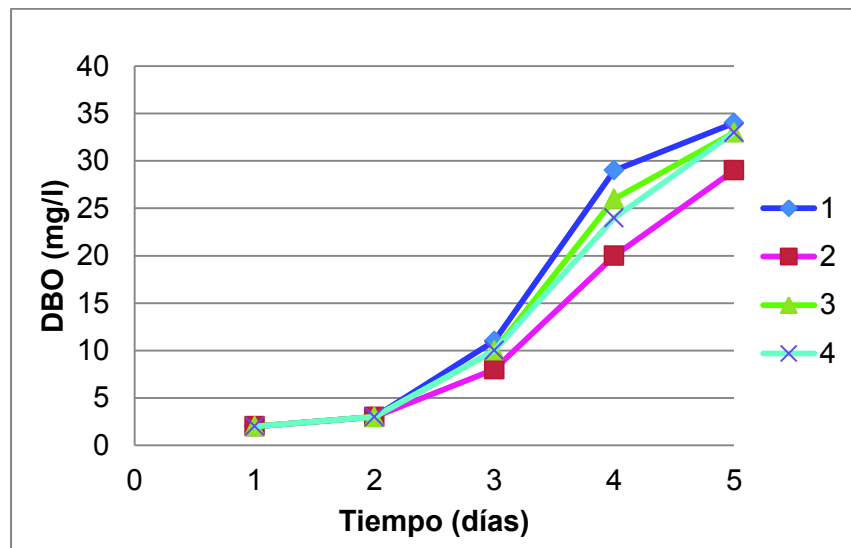


Figura 6. Levaduras dilución 20

Los resultados de la prueba de recuperación fueron cercanos al valor esperado de 100 ± 15 , se visualizó que las curvas tenían semejanza a la curva "A" de la Figura 1, Tabla 9, que menciona que la curva muestra esta tendencia por la dilución realizada, de manera que se desarrolló una nueva prueba con una dilución 40 ya que el inóculo presentaba una carga significativa de microorganismos que servirían para la validación del método.

Levaduras: Dilución 40

Los datos reflejados en la tabla 15 son los conseguidos de la experimentación en un estándar de 30 mg/l utilizando levaduras a una dilución 40.

Tabla 15. Levaduras dilución 40

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	2	7	12	14	16	16	81	NO
2	2	4	13	16	18	18	91	SI
3	2	4	13	17	19	19	96	SI

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO₅ esperado: 19,8 mg/l

En la figura 7 se visualiza las curvas de crecimiento de las levaduras a una dilución 40.

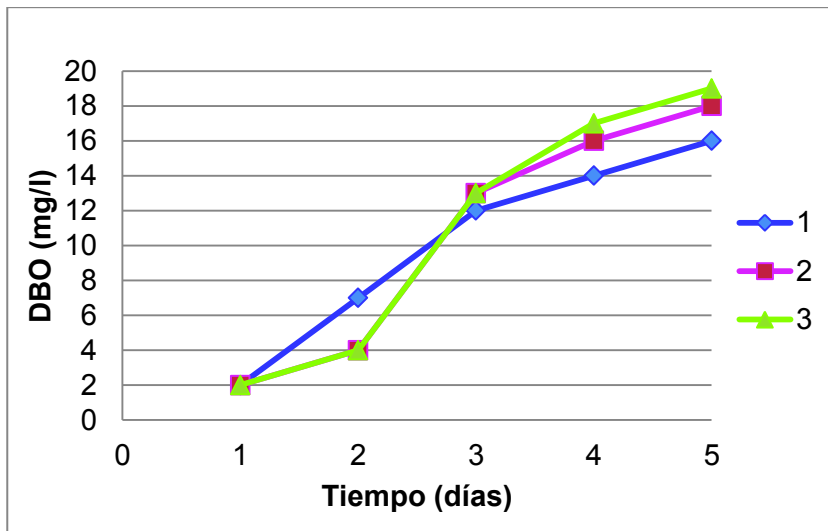


Figura 7. Levaduras dilución 40

Para esta prueba los resultados de recuperación fueron buenos aunque se observó un inconveniente en uno de los resultados, esto fue debido a una mala homogenización del inóculo antes de la siembra, además se visualizó que las curvas de crecimiento no fueron como las esperadas del literal “B” de la Figura 1, sino que se asemejaban a la curva “A”, que según la tabla 9 se caracteriza por la falta de oxígeno en la botella o a una dilución inadecuada.

Bacterias

Posteriormente se obtuvo un inóculo de bacterias de una planta de tratamiento de un camal, este se lo trabajó de la siguiente manera:

Bacterias: Dilución 2

Para obtener el porcentaje de recuperación de la experimentación se desarrolló la tabla 16, a partir de los resultados del DBO₅ de un estándar de 30 mg/l utilizando el inóculo "Bacterias" con una dilución 2.

Tabla 16. Bacterias dilución 2

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	4	12	15	16	18	18	91	SI
2	3	11	14	16	17	17	86	SI
3	4	12	15	17	18	18	91	SI

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO₅ esperado: 19,8 mg/l

De la misma forma en la figura 8 se visualiza las curvas de desarrollo bacteriano obtenido en el análisis de DBO₅

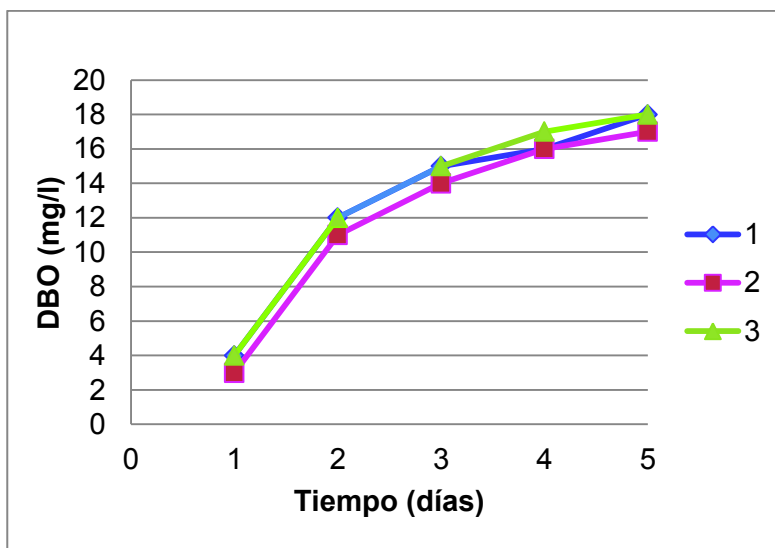


Figura 8. Bacterias dilución 2

Los porcentajes de recuperación se encontraban dentro de $100\pm 15\%$, y las curvas de crecimiento mostraban una curva B de la Figura 1, la cual evidenciaba un desarrollo normal de las bacterias. Pese a que los %R eran buenos se realizó una nueva prueba utilizando el inóculo con dilución 1 para mejorar los resultados obtenidos.

Bacterias: Dilución 1

Para la siguiente prueba se utilizó el inóculo con una dilución 1, es decir puro, los valores obtenidos (Tabla 17) son los siguientes:

Tabla 17. Bacterias dilución 1

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	11	19	21	23	24	22	111	SI
2	12	20	22	23	24	22	111	SI
3	11	20	21	23	24	22	111	SI

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO₅ esperado: 19,8 mg/l

La figura 9 refleja las curvas de crecimiento bacteriano obtenidas a partir del análisis de DBO₅ con el inóculo de bacterias dilución 1.

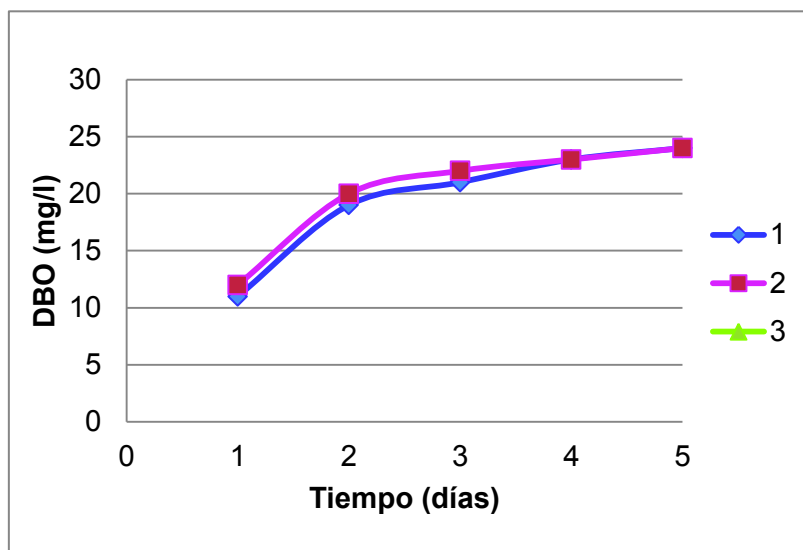


Figura 9. Bacterias dilución 1

Los resultados reflejaron valores uniformes y una mejora en el %R coincidiendo con la curva "B" de la Figura 1 con características de desarrollo normal bacteriano.

Pese a las variaciones de las curvas de crecimiento tanto para las levaduras como para las bacterias se realizó una prueba F y una prueba t con los resultados obtenidos, para saber si existe diferencia significativa entre el uso de un inóculo y otro.

1.1. Prueba F y prueba t

¿Existe diferencia significativa entre el inóculo de levaduras y el inóculo de bacterias?

La tabla 18 muestra los resultados obtenidos en la experimentación mediante el uso de Bacterias y Levaduras.

Tabla 18. Datos de DBO₅

Repeticiones	Datos	
	Bacterias	Levaduras
Nº		
1	18	16
2	17	18
3	18	19
¿Existe diferencia significativa?	NO	

A través de la tabla 19 se determinaron los datos obtenidos en la prueba F entre el inóculo de bacterias y levaduras.

Tabla 19. Prueba F

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	Bacterias	Levaduras
Media	17,66	17,66
Varianza	2,33	0,33
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	7	
P(F<=f) una cola	0,12	
Valor crítico para F (una cola)	19	

De la misma manera la tabla 20 nos muestra los datos obtenidos en la prueba t de los inóculos de bacterias y levaduras.

Tabla 20. Prueba t

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacterias	Levaduras
Media	17,66	17,66
Varianza	2,33	0,33
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1,33	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0,5	
Valor crítico de t (una cola)	2,13	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2,78	

En la tabla 10 se observó que la F calculada es menor que la f crítica, al igual que en la tabla 11 la t calculada es menor a la t crítica, estos resultados responden a la pregunta planteada, que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con los dos inóculos.

Con el análisis de las pruebas F y t se determina que es factible el uso de cualquiera de los dos inóculos, pero es importante visualizar las gráficas de DBO de cada uno, ya que mediante estas se observa el desarrollo y consumo de materia orgánica en el análisis. Debido a que las características de la curva del inóculo de levaduras indicaban una falta de oxígeno y una inadecuada dilución, esta semilla no fue utilizada para la validación del método.

Cabe mencionar que se seleccionó el inóculo de Bacterias con dilución 1 para la validación ya que la curva de DBO presentó características de desarrollo normal de crecimiento bacteriano y un porcentaje de recuperación dentro del 100±15 %.

Prueba de inóculo en las concentraciones de validación

En la tabla 21 se muestra los porcentajes de recuperación obtenidos en la primera concentración de validación.

Tabla 21. Concentración: 30 mg/l

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	11	19	21	23	24	22	111	SI
2	12	20	22	23	24	22	111	SI

Concentración del estándar: 30 mg/l

DBO₅ esperado: 19,8 mg/l

En la figura 10 se observa el desarrollo bacteriano a lo largo de 5 días de prueba.

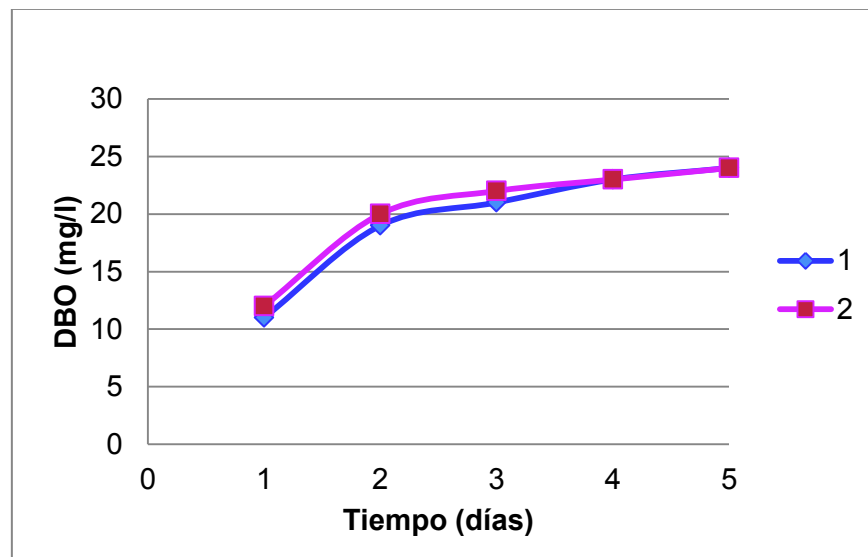


Figura 10. Concentración: 30 mg/l

Concentración: 150 mg/l

En la tabla 22 se observa los resultados obtenidos de la prueba en la tercera concentración de la validación.

Tabla 22. Concentración: 150 mg/l

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	4	12	15	17	19	93	94	SI
2	4	12	15	17	19	93	94	SI

Concentración del estándar: 150 mg/l

DBO₅ esperado: 99 mg/l

En la figura 11 se aprecia curvas iguales de crecimiento bacteriano a partir de los resultados de la experimentación en un estándar de 150 mg/l.

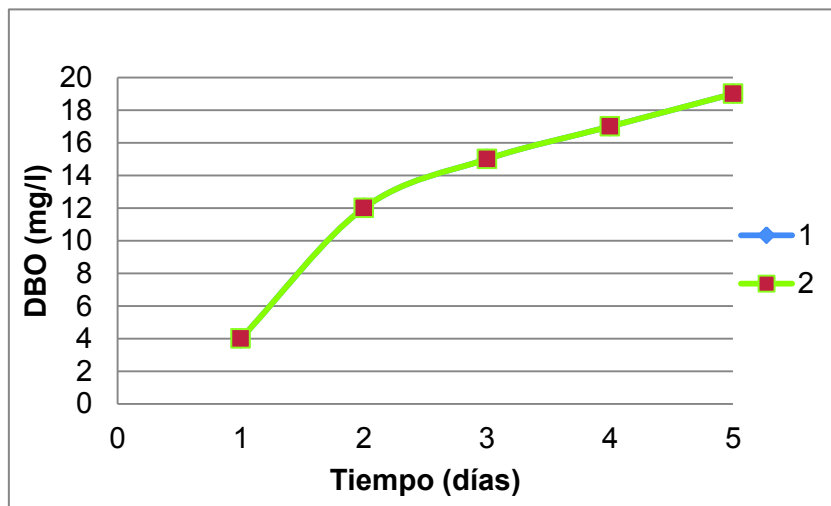


Figura 11. Concentración: 150 mg/l

Concentración: 300 mg/l

Para verificar que los resultados obtenidos en las dos concentraciones anteriores fueron adecuados, se realizó también una prueba utilizando un estándar de 300mg/l. La tabla 23 indica los valores DBO obtenidos en la experimentación.

Tabla 23. Concentración: 300 mg/l

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	5	12	22	28	36	178	90	SI
2	5	12	22	28	36	178	90	SI

Concentración del estándar: 300 mg/l

DBO₅ esperado: 198 mg/l

La figura 12 presenta la curva de desarrollo bacteriano del análisis en una concentración de 300mg/l.

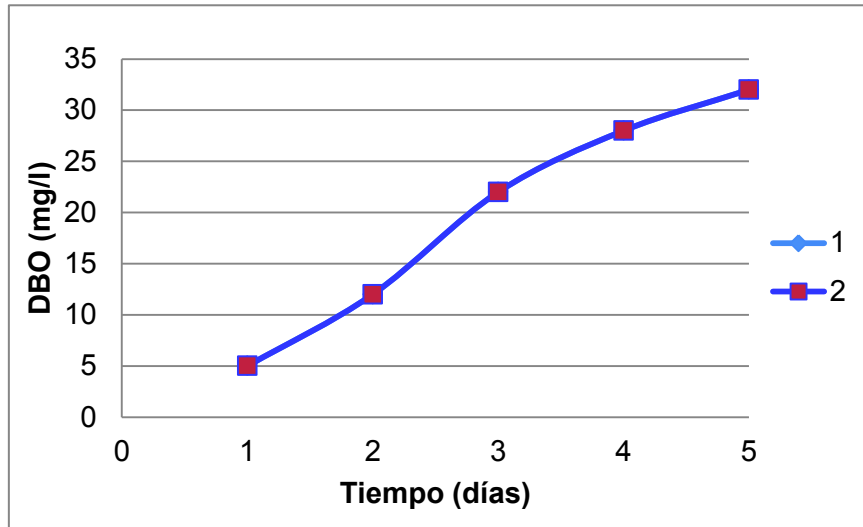


Figura 12. Concentración: 300 mg/l

El análisis gráfico y numérico de las pruebas en las diferentes concentraciones presentó un desarrollo normal bacteriano y porcentajes de recuperación dentro de lo establecido, lo que confirmó que el inóculo “Bacterias” (dilución 1) cumplía con las características requeridas para la validación, por tanto se comenzó con el ANOVA.

Preparación de soluciones

Para la preparación de la solución estándar de ácido glutámico y glucosa se estimó la pureza de los reactivos y se realizó una regla de tres simple como se muestra a continuación en la tabla 24:

Tabla 24. Purezas

Reactivo	Pureza (%)
Ácido glutámico	99
Glucosa	99,8

Solución de 300 mg/l

Como ya se mencionó anteriormente en la preparación de soluciones estándar se utiliza partes iguales de cada reactivo y el cálculo se muestra en el Anexo 2.

Preparación de agua de dilución

El agua de dilución se la utiliza cuando la carga orgánica de una muestra sobrepasa los 1000 mg/l.

A continuación en la tabla 25 se detalla los volúmenes específicos para la elaboración del agua de dilución según RICE, Eugene W. (2012)

Tabla 25.Preparación de agua de dilución.

Solución	Para un volumen de:	
	1000 (ml)	500 (ml)
Sulfato de magnesio (ml)	1	0,5
Cloruro de amonio (m)	1	0,5
Cloruro de calcio (ml)	1	0,5
Cloruro férrico (ml)	1	0,5

Se realiza una regla de tres simple de acuerdo al volumen que se desea preparar.

3.2 Principio

La muestra y el inóculo se coloca dentro de una botella ámbar y por medio de la agitación, el oxígeno presente en la cámara de la botella se disuelve en el líquido. Los microorganismos consumen el oxígeno durante el proceso de degradación de la materia orgánica, produciendo dióxido de carbono y agua.

El dióxido de carbono es absorbido por el hidróxido de sodio ubicado en el vaso de caucho en la parte superior de la botella, que a su vez permite el cierre hermético de la misma. Esta neutralización del dióxido de carbono produce un vacío dentro de la botella. Esta diferencia de presión es medida directamente por el sensor electrónico de presión ubicado dentro del sistema Oxitop en (mg/l), con un volumen constante, incubado en obscuridad durante 5 días a temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.3 Preparación de soluciones

La preparación de soluciones se lo puede realizar con anticipación, pero se debe tomar en cuenta el revisarlas antes de ser utilizadas e identificar si existe algún tipo de precipitación, si fuere el caso es necesario desecharlas y prepararlas de nuevo, para asegurar la efectividad del método.

En la tabla 26 se detalla la preparación de cada solución.

Tabla 26. Preparación de soluciones. (RICE, Eugene W., 2012)

Soluciones	Preparación
Buffer fosfato, 1,5N	Disolver 207 g de dihidrogenofosfato sódico, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en agua. Neutralizar a pH 7,2 con NaOH 6N y diluir a 1 l.
Cloruro de amonio, 0,71 N	Disolver 38,2 g de cloruro amónico, NH_4Cl , en agua. Neutralizar a pH 7,0 con NaOH. Diluir a 1,0 l.
Cloruro de calcio, 0,25 N	Disolver 27,7 g de CaCl_2 en agua y diluir hasta 1.
Sulfato de magnesio, 0,41 N	Disolver 101 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua y diluir hasta 1 l.
Cloruro férrico, 0,018 N	Disolver 4,84 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua y diluir hasta 1 l.
Hidróxido de sodio, 6N	Disolver 336 g de NaOH en aproximadamente 700 ml de agua y diluir a 1 l. Precaución: Añadir NaOH al agua lentamente y usar mezcla constante para evitar la acumulación excesiva de calor.
Ácido, 1N	Añadir 28 ml de H_2SO_4 concentrado a 700 ml de agua. Diluir a 1 l.
Ácido glutámico – glucosa	Secar a 103°C durante 1 h. Añadir 15,0 g de glucosa y 15,0 g de ácido glutámico a agua destilada y diluir a 1 l. Neutralizar a pH 7,2 utilizando NaOH a 6N. Esta solución debe ser preparada el momento de realizarse el análisis.

Las soluciones de cloruro de amonio, cloruro férrico y sulfato de magnesio deben almacenarse en temperatura de 4°C , mientras que la solución buffer de fosfato, el hidróxido de sodio y la solución de ácido sulfúrico deben ser almacenadas a temperatura

ambiente. Todas alejadas de la luz y cerradas herméticamente para evitar precipitaciones o crecimiento bacteriano.

Solución de nutrientes

Esta solución sirve como fuente de nutrientes para las bacterias. Se la prepara en un litro de agua desmineralizada añadiendo las siguientes soluciones:

- 1 ml de buffer de fosfato
- 1 ml de sulfato de magnesio
- 1 ml de cloruro de calcio
- 1 ml de cloruro férrico

Es preferible preparar la solución en el momento de trabajo para evitar cualquier tipo de contaminación o desarrollo bacteriano.

Para establecer un periodo de alimentación se dio seguimiento al inóculo sembrándolo a los 5 días, 10 días, 15 días y 20 días. En la tabla 27 se observa los resultados obtenidos de la experimentación en los diferentes períodos.

Tabla 27. Régimen de alimentación

Repeticiones (días)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
5	11	19	20	22	24	22	111	SI
10	13	20	22	23	24	22	111	SI
15	12	17	19	21	22	20	101	SI
20	7	13	15	17	19	17	86	SI

Se determinó que el % de recuperación empieza a reducir a los 15 días pero aún tiene una recuperación del 101%, por lo cual se estableció el periodo de alimentación a los 15 días.

De la misma manera para determinar el volumen de alimentación se seleccionó al azar 10 ml, 20 ml y 30 ml de solución de nutrientes, se vertió cada uno de los volúmenes de nutrientes por separado 24 horas antes del análisis para asegurar que los nutrientes sean consumidos por las bacterias. La tabla 28 muestra los resultados alcanzados con

los diferentes volúmenes para un porcentaje de recuperación en una solución de 30 mg/l.

Tabla 28. Volumen de nutrientes para alimentación de inóculo

Repeticiones (volúmenes)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
10 ml	10	17	19	21	23	21	106	SI
20ml	13	19	22	23	25	23	116	SI
30ml	15	21	24	27	30	28	141	NO

De los resultados obtenidos se escogió el volumen de 20ml ya que sobrepasa el 100% de recuperación, lo que garantiza una población microbiana suficiente para la degradación de materia orgánica.

3.4 Experimentos de validación

Lugar:

- Laboratorio de Investigación, Análisis y Monitoreo – IAM-Q, Secretaría de Ambiente

Equipo:

- EQUIPO OxiTop IS 12 WTW

Analista:

- Stephanie Ivonne López Loma

Fecha:

- **Desde:** 04/12/2017
- **Hasta:** 14/02/2018

Tomando como base la información documental, los ensayos y correcciones realizados en la puesta a punto del método, se dio inicio a la validación en las concentraciones establecidas anteriormente, los datos obtenidos se detallan a continuación:

ANOVA NIVEL 1

Concentración: 30 mg/l

DBO₅: 19,8 mg/l

En la tabla 29 se detallan los resultados obtenidos en el ANOVA nivel 1:

Tabla 29. ANOVA nivel: 1

ANOVA				
Concentración: 30 mg/l				
DBO₅		19,8 mg/l		
Análisis	Días			
	1	2	3	4
Repetición 1	20	21	23	21
Repetición 2	20	20	20	20
Repetición 3	21	21	21	21
Repetición 4	19	21	21	20
Promedio por día	20	20,75	21,25	20,5
Promedio general	20,63			
Porcentaje de recuperación (%R)	104			

La tabla 30 presenta el dato estadístico del ANOVA nivel 1.

Tabla 30. Análisis estadístico ANOVA nivel 1

Desviación estándar de Repetibilidad (Sr)	Desviación estándar de Reproducibilidad (SR)	Precisión intermedia (SL)	Coficiente de variación de Repetibilidad (% CVr)	Coficiente de variación de Reproducibilidad (% CVR)
0,842	0,896	0,094	4,081	4,342

A continuación se detalla los resultados de la prueba F del nivel 1 de la validación.

Tabla 31. Prueba F ANOVA nivel 1

Prueba F		¿Existe diferencia significativa?
F Calculado	1,53	No existe diferencia significativa
F Crítico	3,49	

ANOVA NIVEL 2

Concentración: 50 mg/l

DBO₅: 33 mg/l

En la tabla 32 se aprecia los resultados del ANOVA nivel: 2

Tabla 32. ANOVA nivel: 2

ANOVA				
Concentración: 50 mg/l				
DBO₅	33 mg/l			
Análisis	Días			
	1	2	3	4
Repetición 1	31	33	33	34
Repetición 2	30	32	34	32
Repetición 3	33	32	34	32
Repetición 4	31	32	29	31
Promedio por día	31,25	32,25	32,5	32,25
Promedio general	32,063			
Porcentaje de recuperación (%R)	97			

En la tabla 33 se puede visualizar el Análisis estadístico ANOVA nivel 2.

Tabla 33. Análisis estadístico ANOVA nivel 2

Desviación estándar de Repetibilidad (Sr)	Desviación estándar de Reproducibilidad (SR)	Precisión intermedia (SL)	Coficiente de variación de Repetibilidad (% CVr)	Coficiente de variación de Reproducibilidad (% CVR)
1,507	1,507	0,000	4,700	4,700

Así también la tabla 34 nos presenta los resultados obtenidos de la prueba F en Análisis estadístico ANOVA nivel 2.

Tabla 34. Prueba F ANOVA nivel 2

Prueba F		¿Existe diferencia significativa?
F Crítico	0,54	No existe diferencia significativa
F Calculado	3,49	

ANOVA NIVEL 3

Concentración: 150 mg/l

DBO₅: 99 mg/l

Los resultados que se describen en la tabla 35 fueron obtenidos en el ANOVA nivel 3.

Tabla 35. ANOVA nivel: 3

ANOVA				
Concentración: 150 mg/l				
DBO₅		99 mg/l		
Análisis	Días			
	1	2	3	4
Repetición 1	86	88	98	93
Repetición 2	88	98	93	93
Repetición 3	88	98	93	88
Repetición 4	86	88	88	93
Promedio por día	87	93	93	91,75
Promedio general	91,19			
Porcentaje de recuperación (%R)	92			

A continuación la tabla 36 hace referencia al análisis estadístico del ANOVA nivel 3.

Tabla 36. Análisis estadístico ANOVA nivel 3

Desviación estándar de Repetibilidad (Sr)	Desviación estándar de Reproducibilidad (SR)	Precisión intermedia (SL)	Coefficiente de variación de Repetibilidad (% CVr)	Coefficiente de variación de Reproducibilidad (% CVR)
3,794	4,352	4,542	4,161	4,772

En la tabla 37 se puede observar los resultados obtenidos en la prueba F del ANOVA nivel 3.

Tabla 37. Prueba F ANOVA nivel 3

Prueba F		¿Existe diferencia significativa?
F Crítico	2,26	No existe diferencia significativa
F Calculado	3,49	

Culminada la etapa de validación se resumen los resultados finales en la siguiente tabla:

Tabla 38. Resumen de ANOVA

ANOVA de DBO₅			
Nivel	1	2	3
Concentración estándar	30,00	50,00	150,00
DBO teórica	19,80	33,00	99,00
Promedio general	20,63	32,06	91,19
% R (± 15 %)	104,00	97,00	92,00
% CVr (<5 %)	4,08	4,70	4,16
%CVR (<5 %)	4,34	4,70	4,77
F calculado	1,53	0,54	2,26
F critico	3,49		
¿Existe diferencia significativa?	NO		

Discusión de resultados

Con el análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos se determinó que se cumplen con los criterios establecidos en la tabla 7, por lo cual se demuestra que el método es reproducible y comparable.

Al desarrollar la prueba F, se pudo determinar que los resultados son homogéneos entre sí y que no existe diferencia significativa. Además el análisis gráfico de las curvas de crecimiento bacteriano de las figuras 21 a la 32 indica un desarrollo normal de los microorganismos, lo que permite fortalecer los resultados obtenidos los análisis estadísticos.

Material de referencia certificado - MRC

Validado el método se analizó un MRC para determinar su efectividad.

DBO₅: 87 mg/l

La tabla 39 señala la medición de la DBO₅ del MRC.

Tabla 39. MRC

Repetición	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	35	37	56	81	89	87	100	SI

En la figura 13 se observa el crecimiento bacteriano en el análisis del MRC de DBO₅

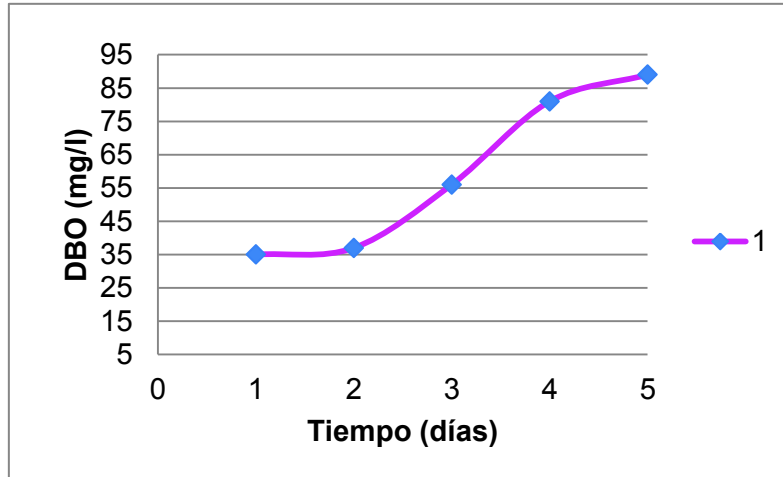


Figura 13. MRC 87 mg/l

Los datos observados en la tabla 39 indican un 100% de recuperación, cumpliendo no solo con el porcentaje establecido en la validación sino que además cumple con las especificaciones y requerimientos del MRC. Así también se observa en la figura 13 que la curva de crecimiento bacteriano presenta características de desarrollo normal y propicio para la determinación de DBO₅.

Determinación de Incertidumbre

Para la determinación de la incertidumbre se consideró diversas causas detalladas en la figura 14.

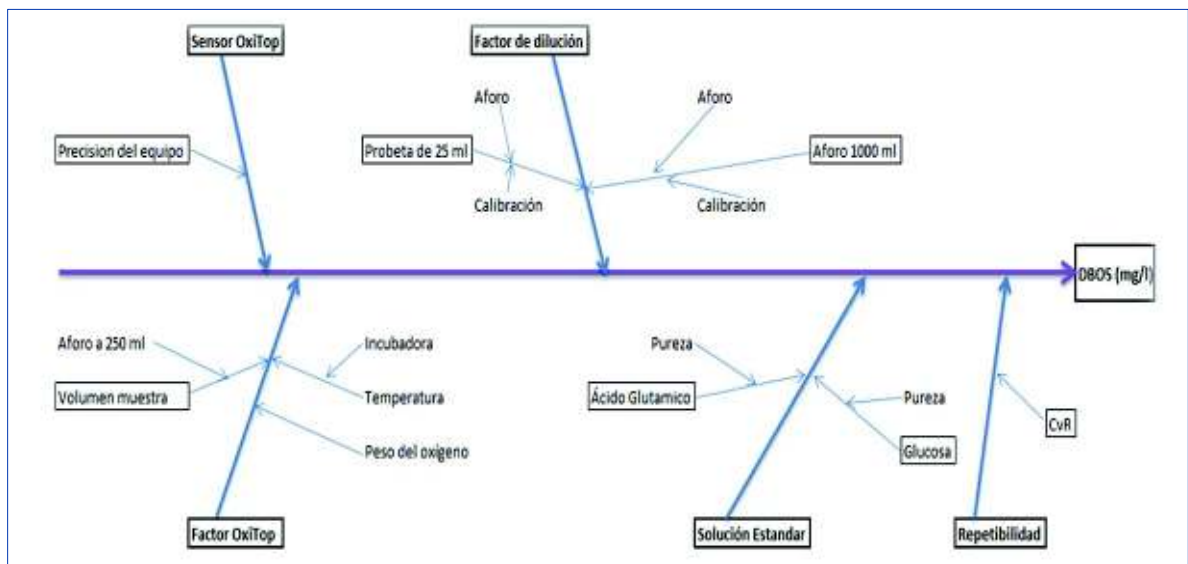


Figura 14. Diagrama de Ishikawa

A continuación la tabla 40 puntualiza los datos obtenidos en la incertidumbre del método.

Tabla 40. Estimación de Incertidumbre

Concentración esperada mg/l	uc mg/l	Uc	U expandida %	Incertidumbre del método
19,8	1,725	0,087	17,4243	17,4243
33,0	2,875	0,087	17,4243	
99,0	7,651	0,077	15,4568	

3.5 Criterios de aceptación

3.5.1 Control:

- Blanco: $DBO_5 \leq 2$ mg/l
- Inóculo: El estándar de 300 mg/l (Ácido Glutámico y Glucosa) $\rightarrow 198 \pm 30$ mg/l

3.5.2 Precisión

- Repetibilidad.- la diferencia absoluta de las dos mediciones de la Demanda Bioquímica de Oxígeno no debe exceder el límite de Repetibilidad, $r_{95\%}$, de acuerdo al rango definido en la siguiente tabla:

Tabla 41. Límite de Repetibilidad, $r_{95\%}$

Rango	Límite de repetibilidad, $r_{95\%}$
19,8 - 33	3
34 - 99	6

- **Reproducibilidad.**- La diferencia absoluta de las dos mediciones de la Demanda Bioquímica de Oxígeno no debe exceder el límite de Reproducibilidad, $R_{95\%}$, de acuerdo al siguiente rango definido:

Tabla 42. Límite de reproducibilidad, $R_{95\%}$

Rango	Límite de reproducibilidad, $R_{95\%}$
19,8 - 33	3
34 - 99	7

3.5.3 Ensayos de Aptitud

En caso de que no se cumpla los criterios se confirmará el dato mediante repetición de la medición y de ser el caso el ensayo completo. Si persiste el incumplimiento el RLAB tomará las medidas correspondientes e informará al analista responsable.

3.6 Implementación del método validado de DBO₅ respirométrico

Una vez validado el DBO₅ respirométrico se implementó el método en los cinco ríos principales de Quito, como se mencionó en 2.1 se analizó primero el DQO de cada muestra y se obtuvo el 66% para tomar el volumen de análisis de DBO.

En la tabla 43 se detallan los resultados obtenidos del análisis de los ríos.

Tabla 43. Análisis de DBO₅ en Ríos del DMQ

Ríos	DQO (mg/l)	DBO ₅ teórico (mg/l)	Análisis (días)					DBO ₅ (mg/l)	% R	Cumple
			1	2	3	4	5			
Guayllabamba	193	127	9	13	16	20	27	133	104	SI
			9	13	17	21	28	138	108	
			9	13	16	20	27	133	104	
Monjas	221	146	7	12	17	23	26	128	88	SI
			7	12	16	23	26	128	88	
			7	12	18	24	27	133	91	
Machángara	250	165	10	17	23	31	36	178	108	SI
			10	17	23	31	37	183	111	
			9	15	22	29	36	178	108	
Pita	29	19	6	9	12	17	20	18	94	SI
			5	8	12	17	20	18	94	
			5	8	13	16	19	17	89	
San Pedro	41	27	15	18	22	26	31	29	107	SI
			17	20	26	29	32	30	111	
			15	19	22	27	32	30	111	

3.7 Análisis de resultados

El análisis de los ríos se los realizó por triplicado, para la implementación del método validado se desarrolló una prueba t para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de los resultados obtenidos en las repeticiones de cada muestra.

Ya que el DBO₅ fue validado hasta la concentración de 150 mg/l se incubó las muestras junto con un estándar de concentración de 300 mg/l para verificar su efectividad en concentraciones superiores a las validadas.

Para complementar la discusión de los resultados se realizó una comparación con la Norma Técnica de la Ordenanza 138 aplicada al Distrito Metropolitano de Quito, descrita en la tabla 44.

Tabla 44. Límites máximos permisibles para descargas líquidas. (Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, 2016)

Parámetro	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible	
			Alcantarillado	Cauce de agua
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO ₅	mg/l	170	100

A continuación la tabla 45 señala los resultados de la DBO₅ obtenida en un estándar de concentración de 300 mg/l.

Tabla 45. Estándar concentración: 300 mg/l

Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación	Cumple
1	9	17	24	29	36	178	90	SI
2	9	17	24	29	36	178	90	SI
3	9	17	24	29	37	183	92	SI

Concentración del estándar: 300 mg/l

DBO₅ esperado: 198 mg/l

En la siguiente figura se puede apreciar el desarrollo bacteriano en la determinación de DBO₅ en una concentración de 300 mg/l.

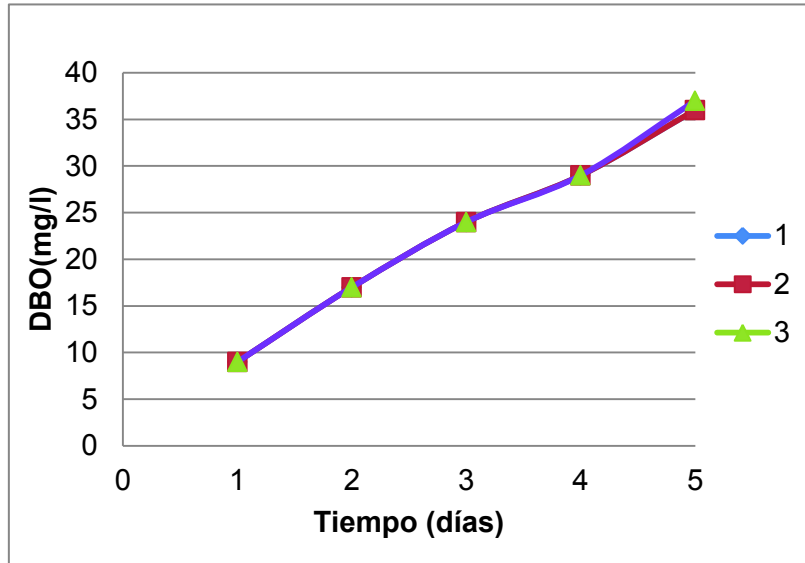


Figura 15. Estándar concentración: 300 mg/l

En las tabla 41 se observó que los valores obtenidos muestran una recuperación dentro del porcentaje de $100\pm 15\%$, establecido en la validación, además los resultados obtenidos en la tabla 43 muestra que el procedimiento funciona correctamente en concentraciones superiores a 150 mg/l, así también, al compararlos con la tabla 42 de Límites máximos permisibles para descargas en cauce se estableció que el contenido de carga orgánica en los ríos Guayllabamba, Monjas y Machángara es superior a lo indicado en la normativa, para ello es importante considerar que estos ríos son los principales receptores de descargas de aguas residuales provenientes de uso doméstico, municipal, comercial, agrícola e industrial provenientes del Distrito Metropolitano de Quito.

De la misma manera los resultados obtenidos en los análisis de los ríos San Pedro y Pita, determinaron que se cumplió con los criterios establecidos en la validación del DBO₅ y además que se encuentran dentro de los límites mencionados en la tabla 42. Cabe señalar que el río Pita es una de las principales fuentes de abastecimiento de agua para el DMQ.

Asi también se pudo observar en las figuras 16, 17, 18, 19,y 20, correspondientes a los anexos 7, 8, 9 ,10 y 11, que las curvas de desarrollo bacteriano mostraron una tendencia normal de crecimiento dentro del análisis realizado a las muestras de agua de los ríos mencionados.

3.7.1 Resultados de la prueba t en los ríos

Río Guayllabamba

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en la prueba t del análisis del Río Guayllabamba.

Tabla 46. Prueba t, Río Guayllabamba

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	135,5	135,5
Varianza	12,5	12,5
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	12,5	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0	
Valor crítico de t (una cola)	2,91	

Río Monjas

A continuación se muestra la prueba t realizada para los análisis del Río Monjas.

Tabla 47. Prueba t, Río Monjas

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	128	130,5
Varianza	0	12,5
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	6,25	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-1	
Valor crítico de t (una cola)	2,91	

Río Machángara

En la siguiente tabla se aprecia los resultados de la prueba t del análisis del Río Machángara.

Tabla 48. Prueba t, Río Machángara

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	180,5	180,5
Varianza	12,5	12,5
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	12,5	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0	
Valor crítico de t (una cola)	2,91	

Río San Pedro

En seguida se muestra los resultados de la prueba t del análisis del Río San Pedro

Tabla 49. Prueba t, Río San Pedro

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	18	17,5
Varianza	0	0,5
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0,25	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1	
Valor crítico de t (una cola)	2,9	

Río Pita

En la siguiente tabla se visualiza los resultados de la prueba t del análisis del Río Pita.

Tabla 50. Prueba t, Río Pita

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	29,5	30
Varianza	0,5	0
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0,25	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-1	
Valor crítico de t (una cola)	2,91	

Los resultados obtenidos en las pruebas t de los 5 ríos analizados arrojaron valores favorables ya que para todos los casos la t calculada fue menor que la t crítica, lo que además indica que no existe diferencia significativa entre las medias.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Para lograr la validación se estableció el cumplimiento de los objetivos propuestos inicialmente en el proyecto.

- Mediante la manipulación en la puesta a punto se determinó las características específicas y el funcionamiento del equipo completo de OxiTop, así como también el mantenimiento y limpieza de sus componentes.
- Ya que la base fundamental para el desarrollo de este método es el Inóculo, se estableció un régimen de control y mantenimiento del mismo, así, se determinó que se debe alimentarlo con 20 ml agua de nutrientes cada 15 días, además como control de inóculo se debe realizar una prueba en un estándar de ácido glutámico – glucosa de 300 mg/l, de no cumplir con el porcentaje de recuperación establecido en la validación se debe considerar una nueva fuente de microorganismos.
- Los parámetros de validación fueron establecidos de acuerdo a la experimentación y valoración estadística de los resultados obtenidos en el ANOVA, los cuales quedan acentuados en el procedimiento del método, no así los parámetros de linealidad y sensibilidad ya que son específicamente para la validación de métodos que trabajan con la relación entre una concentración de un analito y su resultado, mediante el uso de curvas de calibración, ya que el DBO₅ no se fundamenta en este principio no se estimó dichos parámetros.
- Una vez desarrollado el análisis estadístico del ANOVA, se cumplió con los criterios de validación y apoyado en el análisis del MRC en el cual se obtuvo una recuperación el 100% se concluye que el método de DBO₅ respirométrico se encuentra validado, por lo cual la aplicación del método es efectiva y proporciona valores confiables.
- Con el método validado y establecido el procedimiento, se implementó para el análisis de los ríos de la red hídrica que controla la Secretaría de Ambiente, los cuales son: Guayllabamba, Monjas, Machángara, San Pedro y Pita, a su vez se realizó una comparación con la normativa aplicada en el Distrito Metropolitano de Quito donde se pudo evidenciar el exceso de carga orgánica en los tres primeros ríos, no así en los últimos dos ya que los valores cumplen con lo establecido en la

norma. Mediante el análisis estadístico incluyendo una prueba F se determinó que no existe diferencia significativa.

- Al tener conocimientos que las muestras de los ríos contienen diferentes interferentes, en especial aquellos que se determinó alta carga orgánica, y de acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el método es selectivo, ya que pudo cuantificar el analito en presencia de otros analitos.
- Actualmente el procedimiento es utilizado en el laboratorio de la Secretaría de Ambiente para el análisis de aguas residuales y naturales, siguiendo los parámetros obtenidos después de la validación y establecidos en el procedimiento específico.

4.2 Recomendaciones

- Cada vez que se determine la DBO de una muestra se debe graficar la curva de crecimiento bacteriano para observar su desarrollo y determinar si las características de la semilla son las necesarias para el análisis, de no ser así es recomendable tomar las acciones correctivas necesarias, ya sea cambiar el cronograma de alimentación del inóculo u obtener uno nuevo.
- Una vez finalizado el análisis desechar las muestras al igual que el inóculo en la planta de tratamiento previo una estabilización del pH. Es aconsejable tener mucho cuidado al destapar la botella ya que en su interior puede contener gases tóxicos, además es aconsejable manejar con precaución los cauchos que contienen el hidróxido de sodio, ya que éste se encuentra en su punto máximo de reacción y puede causar daños a la salud de quien lo manipule incorrectamente, razón por la cual es importante manipular la botella utilizando el equipo de protección y en una área ventilada.
- Desarrollado el método y aplicado en el análisis de ríos se pudo visualizar concentraciones superiores a los niveles establecidos en la validación, por lo cual se recomienda ampliar el rango de trabajo para la determinación de DBO₅.
- Cada 20 muestras se analizará un Material de Referencia Certificado, para verificar el cumplimiento de la veracidad del método.
- Establecer un plan de calibración externa tanto para material volumétrico como para los equipos utilizados para el análisis de DBO.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andreo, M. (Enero de 2000). Centro Regional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Recuperado el 28 de Abril de 2017, de Breve Enciclopedia del Ambiente: <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/DBO.htm>
2. Brand. (2003). Recuperado el 19 de enero, 2018 de https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/spanish/GK900_03_Material_vol_umetrico_s.pdf
3. Crubellati, R., Di Risio, C., Beita-Sandí, W., Castro-de Esparza, M. L., Campos, C., Peñaranda, S., & Simone, P. (2009). Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en mediciones químicas.
4. Dávila López, M. N. (2009). Validación de los métodos DQO, DBO5 y sólidos suspendidos totales en el análisis de aguas residuales para el laboratorio de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira (Doctoral dissertation, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira).
5. DR. Calderon Labs. (Julio de 2007). Laboratorio de Química Ambiental. Recuperado el 20 de Abril de 2017, de http://www.drcalderonlabs.com/Metodos/Analisis_De_Aguas/Determinación_de_DBO5.htm
6. Espigares, M., Pérez, J. Aguas residuales. Composición, Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.
7. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Recuperado el 19 de Mayo de 2017, de www.eurachem.org
8. González, M. O., Martínez, C. R., & Zhurbenko, D. R. (2010). Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48(2), 162-176.
9. Hernán, C. (Diciembre de 2007). IDEAM. Recuperado el 8 de Junio de 2017, de <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Demanda+Qu%C3%ADmica+de+Ox%C3%ADgeno..pdf/20030922-4f81-4e8f-841c-c124b9ab5adb>

10. Knobelsdorf, M. (14 de Julio de 2005). Tesis Doctorales en Red. Recuperado el 27 de 04 de 2017, de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5909/08Mjkm08de18.pdf>; sequence=8
11. López C., Buitrón G., García H. & Cervantes F. (2007). Tratamiento biológico de aguas residuales: principios, modelación y diseño. Recuperado el 09 de Mayo de 2018, <https://books.google.com.ec/books?id=IxNBDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=tratamiento+de+aguas+residuales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjD9tOo-P3aAhWMvFMKHfVOA5cQ6AEIMTAC#v=onepage&q=tratamiento%20de%20aguas%20residuales&f=false> WTW . (12 de Enero de 2017). WTW a xylem brand. Recuperado el 27 de 04 de 2017, de http://old.omnilab.de/hpb/export/2/BSB_E.PDF
12. Mayarí, R., Espinosa, M., Gutiérrez, J., & Ruiz, M. (2005). Validación de La Determinación de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas y Aguas Residuales. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 36.
13. Municipio del Distrito Metropolitano de Quito. 2016. Norma técnica para el control de descargas líquidas (NT002). Ecuador.
14. PAHO. (2002). Validación de Métodos Analíticos- Buenas Practicas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico, Anexo 3, Informe 36. Recuperado el 19 de Septiembre de 2017, http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACIoN_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
15. Respirometría. (n.d.). Recuperado el 27 de junio, 2017 de <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/22553/Capitulo2.pdf>
16. Ricard Boqué, A. M. (2013). EL ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA). Recuperado el 29 de Abril de 2017, de <http://rodi.urv.es/quimio/general/anovacast.pdf>
17. RICE, Eugene W. et al, "Standard Methods. For the Examination of Water and Wastewater", Edition 22, 2012, pp 2-66 a 2-67. DE-012

ANEXOS

Anexo 1. Ejemplo de cálculo para la obtención de la DBO₅ esperada

300 mg/l produce 198 mgO₂/l
 30 mg/ l produce X

$$X = \frac{30 \text{ mg/l} * 198 \text{ mgO}_2/\text{l}}{300 \text{ mg/l}}$$

$$X = 19,8 \text{ mg/l}$$

Anexo 2. Preparación de solución estándar de acuerdo a su pureza

Ácido Glutámico

Glucosa

150 mg/l es al 99%

150 mg/l es al 99,8%

X es al 100%

X es al 100%

$$X = \frac{150 \text{ mg/l} * 100\%}{99\%}$$

$$X = \frac{150 \text{ mg/l} * 100\%}{99,8\%}$$

$$X = 151,51 \text{ mg/l}$$

$$X = 150,30 \text{ mg/l}$$

Anexo 3. Origen de variaciones nivel 1

Tabla 51. Origen de variaciones nivel 1

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM)
Entre grupos (B)	3	3,25	1,08
Dentro de grupos (W)	12	8,50	0,71
TOTAL	15	11,75	1,79

Anexo 4. Origen de variaciones nivel 2

Tabla 52. Origen de variaciones nivel 2

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM)
Entre grupos (B)	3	8,250	2,750
Dentro de grupos (W)	12	39,500	3,292
TOTAL	15	47,750	6,042

Anexo 5. Origen de variaciones nivel 3

Tabla 53. Origen de variaciones nivel 3

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM)
Entre grupos (B)	3	154,688	51,563
Dentro de grupos (W)	12	193,750	16,146
TOTAL	15	348,438	67,708

Anexo 6. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Guayllabamba

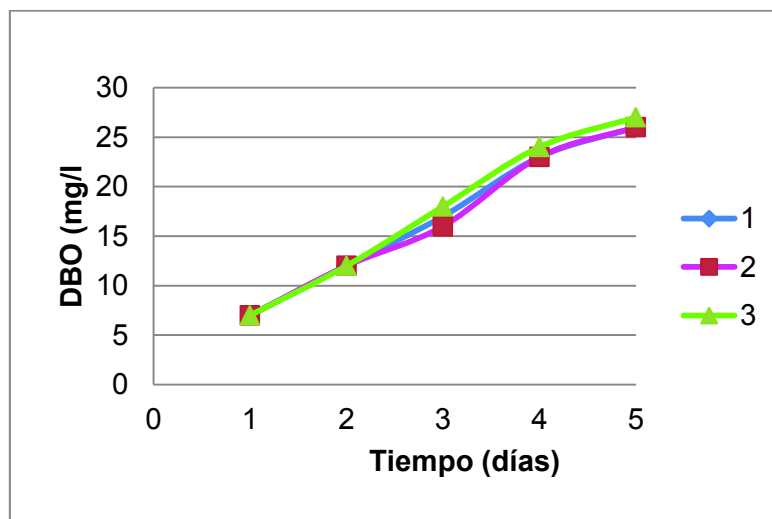


Figura 16. Muestra Río Guayllabamba

Anexo 7. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Monjas

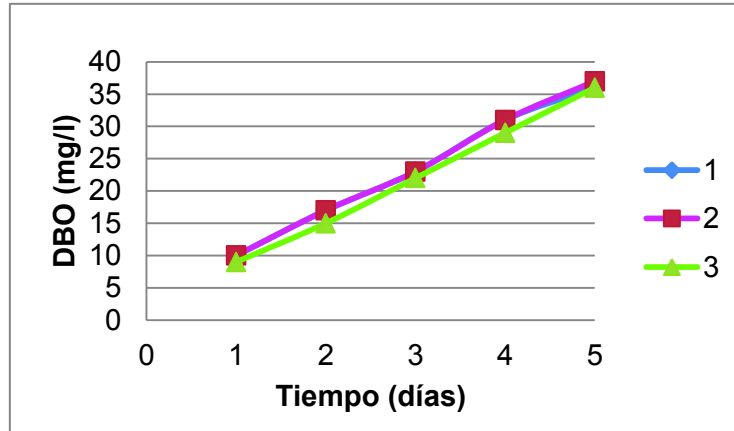


Figura 17. Muestra Río Monjas

Anexo 8. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Machángara

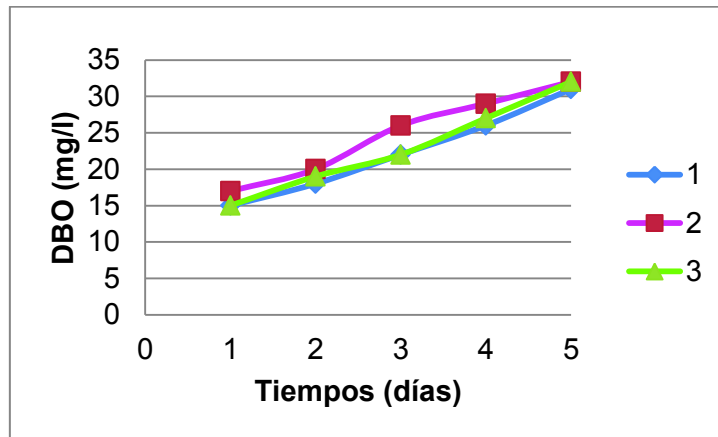


Figura 18. Muestra Río Machángara

Anexo 9. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río Pita

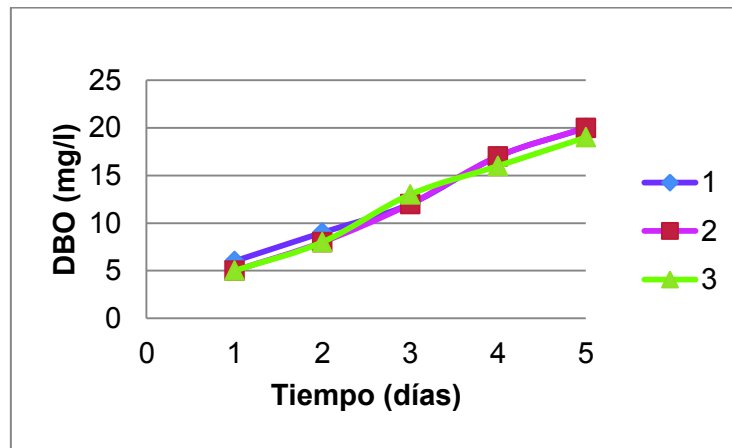


Figura 19. Muestra Río Pita

Anexo 10. Curva de crecimiento bacteriano en análisis del Río San Pedro

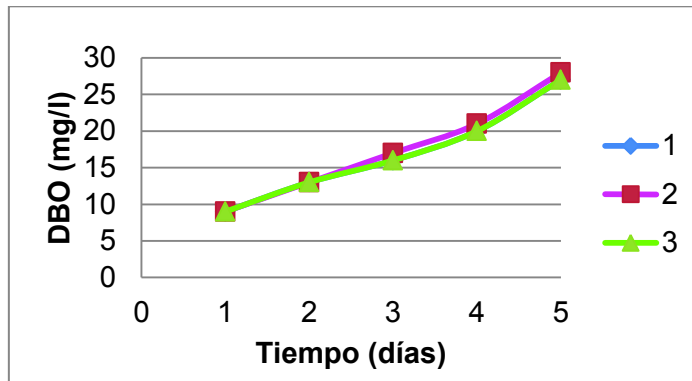


Figura 20. Muestra Río San Pedro

ANOVA nivel 1

Anexo 11. Datos ANOVA nivel 1: Día 1

Tabla 54. Datos de ANOVA día 1

ANOVA Día 1							
Concentración						30 mg/l	
DBO ₅ teórico						19,8mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación
1	7	15	17	19	22	20	101
2	7	15	17	19	22	20	101
3	8	17	19	21	23	21	106
4	6	13	15	18	21	19	96

Anexo 12. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 1

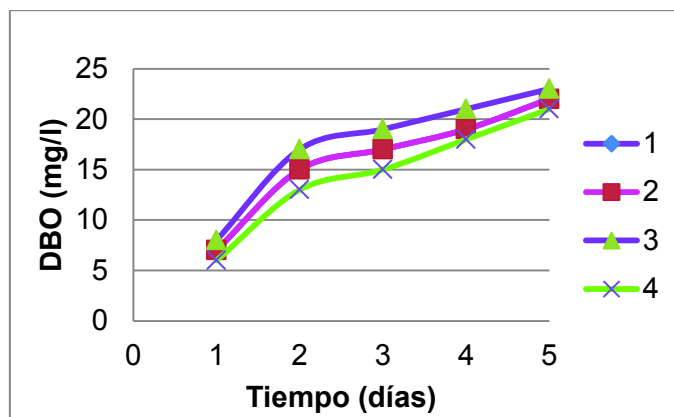


Figura 21. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 1

Anexo 13. Datos ANOVA nivel 1: Día 2

Tabla 55. Datos ANOVA nivel 1: Día 2

ANOVA Día 2							
Concentración						30 mg/l	
DBO₅ teórico						19,8mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	7	17	19	22	23	21	106
2	6	15	18	20	22	20	101
3	7	17	19	21	23	21	106
4	7	17	19	21	23	21	106

Anexo 14. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 2

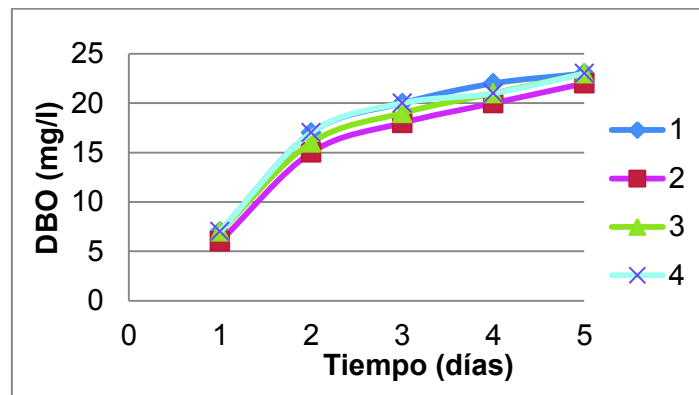


Figura 22. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 2

Anexo 15. Datos ANOVA nivel 1: Día 3

Tabla 56. Datos de ANOVA día 3

ANOVA Día 3							
Concentración						30 mg/l	
DBO₅ teórico						19,8mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	7	17	19	22	25	23	116
2	6	17	20	21	22	20	101
3	7	17	19	21	23	21	106
4	7	17	19	21	23	21	106

Anexo 16. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 3

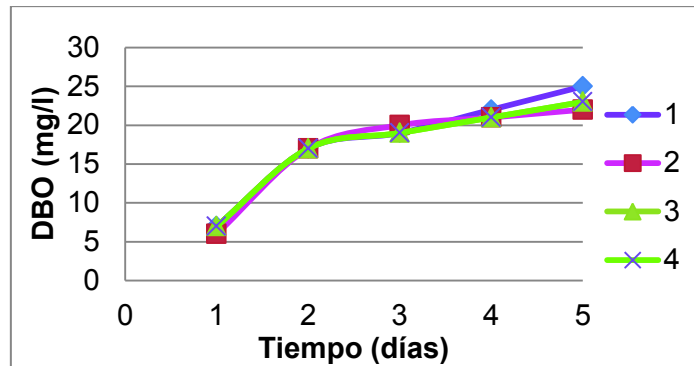


Figura 23. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 3

Anexo 17. Datos ANOVA nivel 1: Día 4

Tabla 57. Datos de ANOVA Día 4

ANOVA Día 4							
Concentración						30 mg/l	
DBO ₅ teórico						19,8mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación
1	7	17	19	22	23	21	106
2	6	17	20	21	22	20	101
3	7	17	19	21	23	21	106
4	6	17	19	21	22	20	101

Anexo 89. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 4

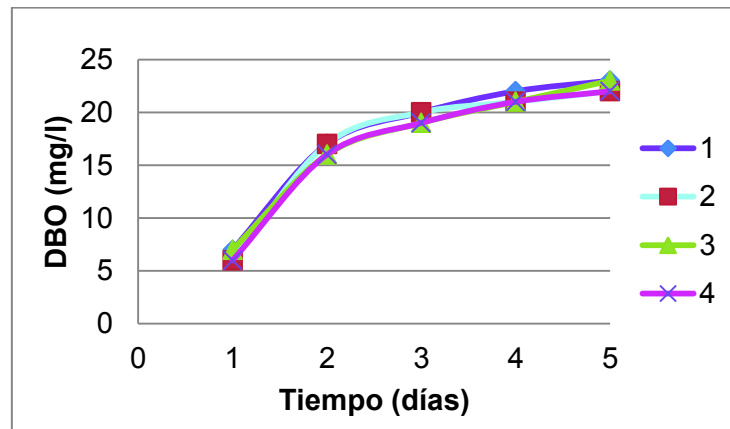


Figura 24. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 1: Día 4

Anexo 19. Datos ANOVA nivel 2: Día 1

Tabla 58. Datos ANOVA nivel 2: Día 1

ANOVA Día 1							
DQO						50 mg/l	
DBO₅ teórico						33mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	8	23	28	31	33	31	94
2	9	24	27	29	31	29	88
3	7	22	26	28	30	33	100
4	5	20	25	27	29	31	94

Anexo 20. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 1

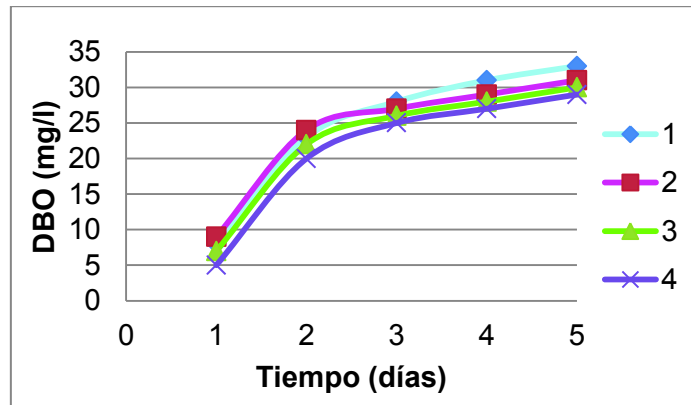


Figura 25. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 1

Anexo 21. Datos ANOVA nivel 2: Día 2

Tabla 59. Datos de ANOVA nivel 2: Día 2

ANOVA Día 2							
DQO						50 mg/l	
DBO₅ teórico						33mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	8	23	28	32	35	33	100
2	9	24	28	33	36	32	97
3	8	23	29	32	34	32	97
4	7	22	27	31	34	32	97

Anexo 22. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 2

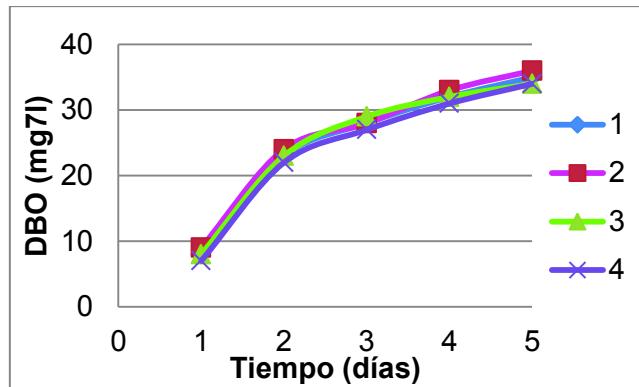


Figura 26. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 2

Anexo 23. Datos ANOVA nivel 2: Día 3

Tabla 60. Datos ANOVA nivel 2: Día 3

ANOVA Día 3							
DQO						50 mg/l	
DBO ₅ teórico						33mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación
1	8	23	27	31	35	33	100
2	9	24	28	33	36	34	103
3	6	22	29	32	38	36	109
4	5	20	25	27	31	29	88

Anexo 24. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 3

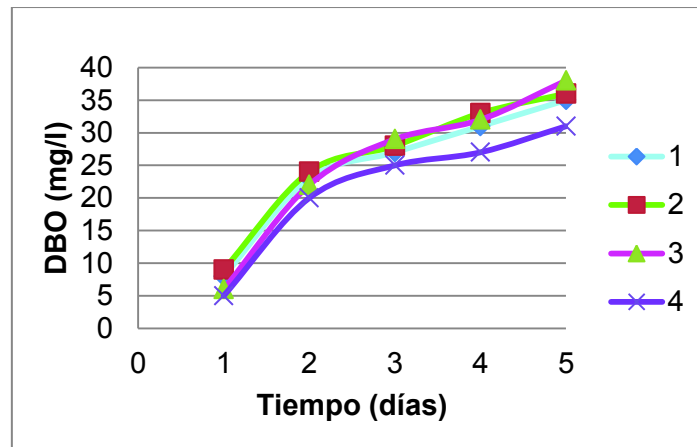


Figura 27. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 3

Anexo 25. Datos ANOVA nivel 2: Día 4

Tabla 61. Datos ANOVA nivel 2: Día 4

ANOVA Día 4							
DQO						50 mg/l	
DBO₅ teórico						33mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	8	23	28	31	36	34	103
2	9	26	30	32	34	32	97
3	9	24	29	32	34	32	97
4	6	20	25	27	33	31	94

Anexo 26. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 4

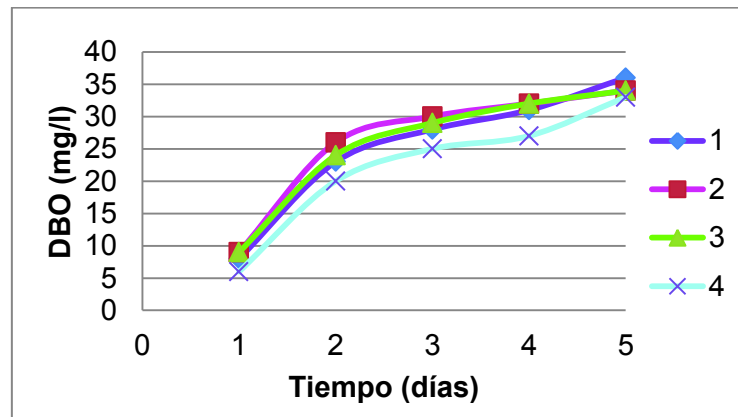


Figura 28. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 2: Día 4

Anexo 27. Datos ANOVA nivel 3: Día 1

Tabla 62. Datos ANOVA nivel 3: Día 1

ANOVA Día 1							
DQO						150 mg/l	
DBO₅ teórico						99 mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	4	9	12	15	17	83	84
2	4	9	13	16	18	88	89
3	5	8	12	16	18	88	89
4	5	8	12	15	17	83	84

Anexo 28. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 1

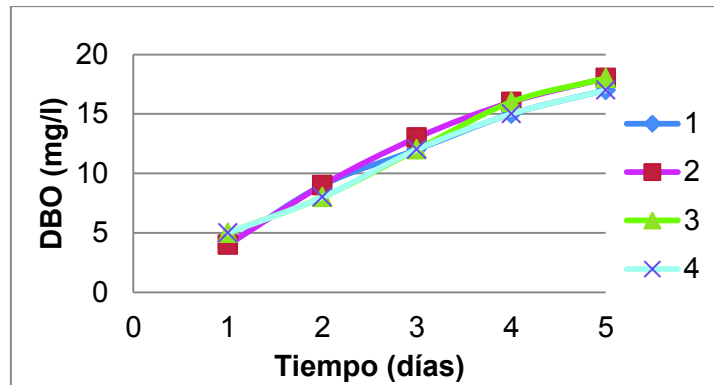


Figura 29. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 1

Anexo 29. Datos ANOVA nivel 3: Día 2

Tabla 63. Datos ANOVA nivel 3: Día 2

ANOVA Día 2							
DQO						150 mg/l	
DBO ₅ teórico						99 mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO ₅ (mg/l)	% De recuperación
1	4	10	13	16	18	88	89
2	4	12	15	17	20	98	99
3	6	13	16	18	20	98	99
4	5	11	14	16	18	88	89

Anexo 30. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 2

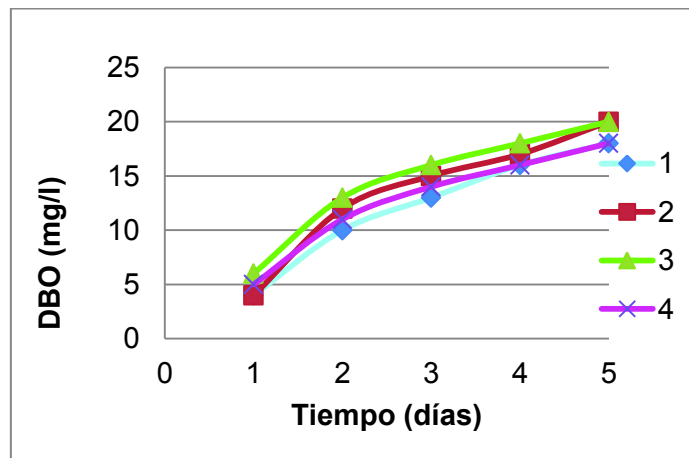


Figura 30. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 2

Anexo 31. Datos ANOVA nivel 3: Día 3

Tabla 64. Datos ANOVA nivel 3: Día 3

ANOVA Día 3							
DQO						150 mg/l	
DBO₅ teórico						99 mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	4	12	15	17	20	98	99
2	4	12	15	17	19	93	94
3	4	11	14	16	19	93	94
4	4	10	13	15	18	88	89

Anexo 32. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 3

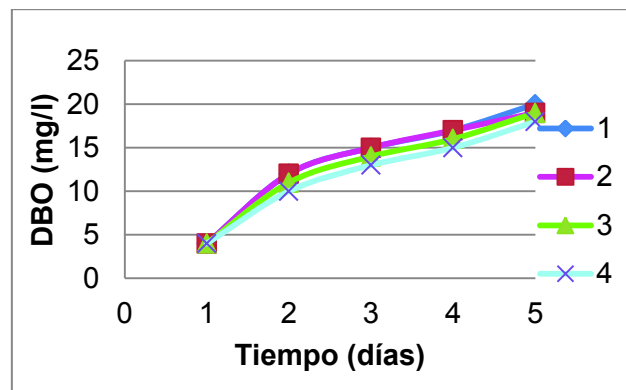


Figura 31. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 3

Anexo 33. Datos ANOVA nivel 3: Día 4

Tabla 65. Datos ANOVA nivel 3: Día 4

ANOVA Día 4							
DQO						150 mg/l	
DBO₅ teórico						99 mg/l	
Repeticiones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	DBO₅ (mg/l)	% De recuperación
1	4	13	16	18	19	93	94
2	4	12	15	17	19	93	94
3	4	11	14	16	18	88	89
4	6	13	16	18	19	93	94

Anexo 34. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 4

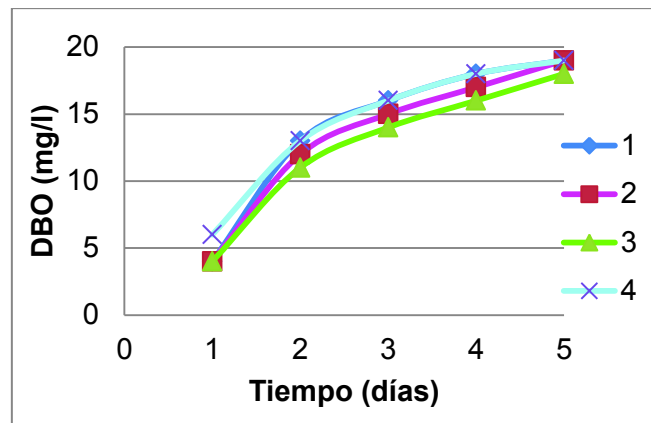


Figura 32. Curva de crecimiento bacteriano de ANOVA nivel 3: Día 4

Anexo 35. Certificado de análisis: Sulfato de magnesio heptahidratado.

Certificate of Analysis

Page 1 of 1



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001:2008 standard by DNV Certificate number CERT-08052-2006-AQ-HOU-ANAB

This is to certify that units of the above mentioned lot number were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/FCC/NF/EP/BP/JP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMF's with the FDA. The following are the actual analytical results obtained:

Catalog Number	M63	Mfg. Date	9/14/2012
Lot Number	124232		
Description	MAGNESIUM SULFATE, HEPTAHYDRATE, A.C.S.		
Country of Origin	India	Recommended Retest Date	Sep-2017
Chemical Origin	Inorganic-non animal		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	Colorless to white crystals or crystalline powder
AMMONIUM	%	<= 0.002	<0.0020
ASSAY	%	Inclusive Between 98 102	100.3
CALCIUM	%	<= 0.02	<0.020
CHLORIDE	ppm	<= 5	<5.0
HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<= 5	<5.0
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.005	0.003
IRON (Fe)	ppm	<= 5	<5.0
MANGANESE (Mn)	ppm	<= 5	2.0
NITRATE (NO3)	%	<= 0.002	<0.0020
PH 5% SOLN @ 25 DEG C		Inclusive Between 5.0 8.2	5.8
POTASSIUM (K)	%	<= 0.005	0.0020
SODIUM (Na)	%	<= 0.005	0.0020
STRONTIUM (Sr)	%	<= 0.005	0.0020



Edgar E. Hare
Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as a extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.

Anexo 36. Certificado de análisis: Glucosa

Certificate of Analysis

Page 1 of 1



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001:2008 standard by SAI Global Certificate Number CERT - 0064970

This is to certify that units of the above mentioned lot number were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/FCC/NF/EP/BP/JP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMF's with the FDA. The following are the actual analytical results obtained:

Catalog Number	D16	Quality Test / Release Date	3/11/2014
Lot Number	138431		
Description	DEXTROSE, ANHYDROUS, A.C.S.		
Country of Origin	United States	* Suggested Retest Date	Mar-2019
Chemical Origin	Organic - Plant		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	White granular powder
CHLORIDE	%	<= 0.01	<0.010
HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<= 5	<5.0
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
IGNITION RESIDUE	%	<= 0.02	<0.020
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.005	<0.005
IRON (Fe)	ppm	<= 5	<5.0
LOSS ON DRYING @ 105 C	%	<= 0.2	0.01
SPECIFIC ROTATION @ 25 C	DEGREES (+ OR -)	Inclusive Between +52.5 - +53.0	52.9
STARCH		= PASS TEST	PASS TEST
SULFATE & SULFITE	%	<= 0.005	<0.005
TITRATABLE ACID	mEq/g	<= 0.002	<0.0020



Edgar E. Hane

Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as a extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.
*Based on suggested storage condition.

Anexo 37. Certificado de análisis: Ácido Glutámico

Certificate of Analysis

Page 1 of 1



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001:2008 standard by SAI Global Certificate Number CERT - 0064970

This is to certify that units of the above mentioned lot number were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/FC/NF/EP/JP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMF's with the FDA. The following are the actual analytical results obtained.

Catalog Number	A125	Quality Test / Release Date	10/25/2013
Lot Number	136533		
Description	L (+) GLUTAMIC ACID, REAGENT		
Country of Origin	Taiwan	* Suggested Retest Date	Oct-2018

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	White fine crystals
ASSAY	%	>= 99	100.2
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST



Edgar E. Howe

Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as an extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.
*Based on suggested storage condition.

Anexo 38. Certificado de análisis: Hidróxido de Sodio

Certificate of Analysis

Page 1 of 1



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001:2008 standard by SAI Global Certificate Number CERT - 0084970

This is to certify that units of the above mentioned lot number were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/ FCC/ NF/ EP/ BP/ JP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMF's with the FDA. The following are the actual analytical results obtained:

Catalog Number	S318	Quality Test / Release Date	3/19/2014
Lot Number	141103		
Description	SODIUM HYDROXIDE, A.C.S.		
Country of Origin	United States	* Suggested Re-test Date	Mar-2019
Chemical Origin	Inorganic		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	WHITE PELLETS
ASSAY	%	>= 97.0	99.1
CALCIUM	%	<= 0.005	<0.0050
CHLORIDE	%	<= 0.005	<0.005
HEAVY METALS (as Ag)	%	<= 0.002	<0.0020
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
IRON (Fe)	%	<= 0.001	<0.0010
MAGNESIUM	%	<= 0.002	<0.0020
MERCURY (Hg)	ppm	<= 0.1	<0.10
NICKEL (Ni)	%	<= 0.001	<0.0010
NITROGEN COMPOUNDS	%	<= 0.001	<0.0010
PHOSPHATE (PO4)	%	<= 0.001	<0.0010
POTASSIUM (K)	%	<= 0.02	<0.020
SODIUM CARBONATE	%	<= 1.0	0.3
SULFATE (SO4)	%	<= 0.003	<0.0030



Edgar E. Howe
Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as a extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.
*Based on suggested storage condition.

Anexo 39. Certificado de análisis: Cloruro de amonio

Certificate of Analysis

Page 1 of 1



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001 2008 standard by SAI Global Certificate Number CERT - 0064970

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/IFCC/INF/EP/BJP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMFs with the FDA. The following are the actual analytical results obtained:

Catalog Number	A661	Quality Test / Release Date	9/18/2015
Lot Number	156428		
Description	AMMONIUM CHLORIDE, A.C.S.		
Country of Origin	India	* Suggested Retest Date	Sep-2020
Chemical Origin	Synthetic		
ESE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		
Chemical Comment	This product is free of genetically modified organisms (GMO's).		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	White Crystal
ASSAY	%	>= 99.5	100.2
CALCIUM	%	<= 0.001	0.0006
HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<= 5	<5.0
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
IGNITION RESIDUE	%	<= 0.01	0.007
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.005	0.003
IRON (Fe)	ppm	<= 2	<2.0
MAGNESIUM	ppm	<= 5	2.4
PH 5% SOLUTION @ 25 DEG C		Inclusive Between 4.5 - 5.5	4.9
PHOSPHATE (PO4)	ppm	<= 2	<2
SULFATE (SO4)	%	<= 0.002	<0.0020



Edgar E. Howe

Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as a extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.
*Based on suggested storage condition.

Anexo 40. Certificado de análisis: Cloruro férrico

Certificate of Analysis

Page 1 of 1



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001:2008 standard by SAI Global Certificate Number CERT - 0064970

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/FCG/NF/EP/JP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMFs with the FDA. The following are the actual analytical results obtained.

Catalog Number	188	Quality Test / Release Date	5/23/2014
Lot Number	143039		
Description	FERRIC CHLORIDE, A.C.S.		
Country of Origin	United States	* Suggested Retest Date	May-2019
Chemical Origin	Inorganic-non animal		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	YELLOWISH BROWN LUMPS
ASSAY	%	Inclusive Between 97 - 102	100.0
CALCIUM	%	<= 0.01	<0.010
COPPER (Cu)	%	<= 0.003	<0.0030
FERROUS IRON (FE+2)	%	<= 0.002	<0.0020
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.01	0.001
MAGNESIUM	%	<= 0.005	<0.0050
NITRATE (NO3)	%	<= 0.01	0.007
PHOSPHATE COMPOUNDS	%	<= 0.01	<0.010
POTASSIUM (K)	%	<= 0.005	<0.0050
SODIUM (Na)	%	<= 0.05	<0.050
SULFATE (SO4)	%	<= 0.01	<0.010
ZINC (Zn)	%	<= 0.003	<0.0030



Edgar E. Hase

Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as a extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.
*Based on suggested storage condition.

Anexo 41. Certificado de análisis: Cloruro de calcio dihidratado

Certificate of Analysis

Page 1 of 1



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO 9001:2008 standard by SAI Global Certificate Number CERT - 0064970

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/FCCNF/EPBP/IP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMF's with the FDA. The following are the actual analytical results obtained:

Catalog Number	C79	Quality Test / Release Date	1/8/2015
Lot Number	148902		
Description	CALCIUM CHLORIDE, DIHYDRATE, A.C.S.		
Country of Origin	Japan	* Suggested Retest Date	Jan-2020
Chemical Origin	Inorganic		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	WHITE CRYSTALS AND GRANULES
AMMONIUM	%	<= 0.005	0.005
ASSAY	%	Inclusive Between 99.0 - 105.0	100.5
BARIUM (Ba)	%	<= 0.005	0.005
HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<= 5	5.0
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.01	0.010
IRON (Fe)	%	<= 0.001	0.0010
MAGNESIUM	%	<= 0.005	0.005
OXIDIZING SUBSTANCES	%	<= 0.003	0.0030
PH 5% SOLUTION @ 25 DEG C		Inclusive Between 4.5 - 8.5	4.8
POTASSIUM (K)	%	<= 0.01	0.010
SODIUM (Na)	%	<= 0.02	0.020
STRONTIUM (Sr)	%	<= 0.1	0.10
SULFATE (SO4)	%	<= 0.01	0.010



Edgar E. Hane

Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as an extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.
*Based on suggested storage condition.

Anexo 42. Certificado de análisis: MRC de DBO

Certificate of Analysis

Certified Reference Material

Demand - WP (Whole Volume)

Product ID QC3130-500ML

Lot LRAA0285

Expiration Date December 31, 2017

Storage Conditions Store at 4°C

Analyte	Units	Certified Value ^{1,4}	k ⁵	Standard Deviation ²	Acceptance Interval ³
5-day BOD	mg/L	87.3 ± 3.22	2.00	12.7	44.7 to 130
Carbonaceous BOD (CBOD)	mg/L	75.6 ± 4.15	2.00	13.4	34.8 to 116
Chemical oxygen demand (COD)	mg/L	139 ± 2.94	2.00	10.2	112 to 166
Total organic carbon (TOC)	mg/L	54.2 ± 1.22	2.00	3.67	45.5 to 62.9

Sample Information

DESCRIPTION

- This sample is supplied in a 500ml HDPE bottle as a whole-volume solution.
- This sample is not preserved. Analyze immediately after opening.

PREPARATION INSTRUCTIONS

- 1) The sample is ready to analyze. Shake well prior to opening.

This sample should be analyzed as soon as possible after opening. It is necessary to seed dilutions of this standard prior to BOD and CBOD analysis. A nitrification inhibitor must be used when analyzing for CBOD. Analyze using your normal procedures.

1 Certified value - based on the robust mean of round robin, interlaboratory study and analytically verified by RTC with associated uncertainties from the preparation and analysis of procedures.
 2 The standard deviation is the robust statistical standard deviation from the round robin interlaboratory study.
 3 Acceptance limits are based on Interlaboratory Study Results. These ranges are recommendations only.
 4 U₉₅ - Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U₉₅) corresponding to the 95% confidence interval. U₉₅ is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.
 5 k: Coverage factor derived from a t-distribution table, based on the degrees of freedom of the data set. Confidence interval = 95%.

Traceability: The standard was manufactured under an ISO/IEC 17025:2005 certified quality system. The balance used to weigh raw materials is accurate to ± 0.0001 g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

Homogeneity: Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared using a one-way analysis of variance approach as described by TNFEL-V3-2009 Appendix A.2. See instructions for minimum sub-sample size.

THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH ISO/IEC 17025:2005 (AC Class Cert AT-1467) and ISO GUIDE 342:009 (AC Class Cert AR-1470).

MSDS reports for components comprising greater than 1.0% of the solution or 0.1% for components known to be carcinogens are available upon request.

Robert O'Brien - QC Supervisor

Mark Pooler - QA Supervisor

Certification Date June 17, 2015
 Version 182-6 17 2015

1820 2



SIGMA-ALDRICH
 2501 Solder Springs Rd., Laramie, Wyoming 82070 USA
 307-742-5450
 rtechgroup@siel.com www.sigmaaldrich.com