

**VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE AGUA: DQO, DBO₅,
SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS Y DISUELTOS A TRAVÉS DE
EVIDENCIAS ESTADÍSTICAS CONFORME A LO DISPUESTO EN LA NORMA
ISO 17025 DEL 2005 Y LA IDENTIFICACIÓN DE MESOFILOS, COLIFORMES
TOTALES Y FECALES, EN LA UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL SOCORRO**

GINA TATIANA IBAÑEZ REYES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

**VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE AGUA: DQO, DBO₅,
SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS Y DISUELTOS A TRAVÉS DE
EVIDENCIAS ESTADÍSTICAS CONFORME A LO DISPUESTO EN LA NORMA
ISO 17025 DEL 2005 Y LA IDENTIFICACIÓN DE MESOFILOS, COLIFORMES
TOTALES Y FECALES, EN LA UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL SOCORRO**

GINA TATIANA IBAÑEZ REYES

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

**CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

Tutor

**Química MARÍA FABIOLA ARENAS ESTÉVEZ
JEFE DEL LABORATORIO DE AGUAS Y MICROBIOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL SOCORRO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios ya que gracias a El he tenido la fuerza suficiente para enfrentar cualquier obstáculo y porque al convertirme en su hija soy embajadora de su nombre y de las proezas que ha realizado en mi vida y en las personas que le conocen.

A mi mami hermosa MARIA MERCEDES REYES PATIÑO ya que es el mayor ejemplo de perseverancia, amor, fortaleza, cariño, templanza y porque sola saco adelante a sus hijos y nos formó lo que hoy somos, a mis hermanos Christian y Laura ya que con ellos aprendo a diario sobre el amor, la paciencia y porque siempre he sabido que cuento con ellos sin importar lo grande que sea el obstáculo. Mi familia es esa voz que en medio de la tormenta me anima a seguir adelante y a no desmayar.

A mis tíos Edgar Moyano y Francelina Reyes ya que me acogieron en su casa como si fuese su hija, que me brindaron abrigo, sustento y un techo para vivir mientras me encontraba estudiando y cuando realice la práctica.

A mis amigos que siempre han estado a mi lado, empujándome a intentarlo y motivándome aún cuando no lo creía posible y que siempre han compartido mis tristezas y alegrías.

Gracias a todos por estar allí cuando más los he necesitado.

A el.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Industrial de Santander por formar cada día mejores ingenieros y por brindarme la oportunidad de pertenecer a la familia UIS.

A todo el personal de la Universidad Libre Seccional Socorro por el apoyo y por facilitar los medios para cumplir los objetivos propuestos; en especial a el Doctor Rafael Olarte por hacer posible que yo realizase la práctica en las instalaciones de la Seccional Socorro y a la Química María Fabiola Arenas Estévez por el aporte de sus conocimientos y la formación que me fue brindada.

A todas las personas que de una u otra forma aportaron para que lograra terminar mi carrera sin tropiezos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEORICO	16
1.1 NORMA ISO 17025	16
1.2 VALIDACIÓN	16
1.1.1 Parámetros de Desempeño de la Validación.	16
1.1.1.1 Exactitud	17
1.1.1.2 Precisión	17
1.1.1.3 Recuperación	17
1.1.1.4 Límite de Detección	17
1.1.1.5 Incertidumbre	18
1.1.1.6 Rango de trabajo e intervalo de aplicación del método	19
1.1.1.7 Blanco.	19
1.1.1.8 Muestra	19
1.1.1.9 Muestra Adicionada	19
1.1.1.10 Muestra Certificada	19
1.1.2 Grupo básico de Validación.	20
1.3DQO	20
1.4 DBO ₅	21
1.5 SÓLIDOS TOTALES	21
1.6 SÓLIDOS DISUELTOS	22
1.7 SÓLIDOS SUSPENDIDOS	22
1.8 COLIFORMES Y MESOFILOS	22
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24

2.1 PREVALIDACIÓN	25
2.2 PLAN DE VALIDACIÓN	26
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
2.3.1 Rechazo de datos	27
2.4 INFORME DE VALIDACIÓN	27
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	29
3.1 RECHAZO DE DATOS	29
3.2 EXACTITUD	30
3.3 PRECISIÓN	33
3.4 RECUPERACIÓN	33
3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN	33
3.6 INCERTIDUMBRE	35
3.7 IDENTIFICACION MICROBIOLÓGICA	36
3.7.1 Siembra	37
3.7.2 Identificación	38
3.7.3 Tinción Gram (Técnica de contraste).	40
3.7.4 Resultados	42
4. CONCLUSIONES	43
5. RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45
ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Exactitud del Patrón Bajo	30
Figura 2. Exactitud del Patrón Medio	31
Figura 3. Exactitud Patrón Alto	31
Figura 4. Exactitud Dilución 1:10	32
Figura 5. Exactitud de la Muestra Certificada	32
Figura 6. Matrices coliformes utilizadas	37
Figura 7. Matrices mesofilos utilizadas	38
Figura 8. Aislamiento de colonias coliformes	39
Figura 9. Aislamiento de colonias mesofilos	39
Figura 10. Tinción Gram de coliformes	40
Figura 11. Tinción Gram de mesofilos	41

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Resumen de Validaciones pruebas fisicoquímicas	29
Tabla 2. Comparación de los límites de detección de la Validación	34
Tabla 3. Resumen de Prevalidación pruebas Microbiológicas	37

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Estructura de los Planes de Validación.	48
ANEXO B. Prueba t de Student.	50
ANEXO C. Diagrama de Flujo del Procedimiento de DBO ₅ Winkler	52
ANEXO D. Diagrama de Flujo del Procedimiento de DQO	53
ANEXO E. Diagrama de Flujo del Procedimiento para Sólidos Suspendidos y Sólidos Disueltos	54
ANEXO F. Diagrama de Flujo del Procedimiento de Sólidos Totales	55
ANEXO G. Curva de Calibración de colorimetría para DQO tomada como referencia en la validación	56
ANEXO H. Tablas de dilución para DBO ₅ tomadas en cuenta para la Validación	57
ANEXO I. Descripción del Procedimiento de DBO ₅ durante la Validación	58
ANEXO J. Descripción del Procedimiento de DQO durante la Validación	60
ANEXO K. Descripción del Procedimiento de Sólidos Suspendidos y Sólidos Disueltos tomado para la Validación	62
ANEXO L. Descripción del Procedimiento de Sólidos Totales tomado en la Validación	64
ANEXO M. Descripción del Procedimiento de Identificación Microbiológica	66
ANEXO N. Resultados de las Validaciones y de la Prevalidación	71

ABREVIATURAS

UNILIBRE: Universidad Libre Seccional Socorro

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DQO C: Demanda Química de Oxígeno por Colorimetría

DQO V: Demanda Química de Oxígeno por Volumetría

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno en cinco días

ISO: International Organization for Standardization—Organización Internacional de Estandarización

CV: Coeficiente de Variación

SST: Sólidos Suspendidos Totales

SDT: Sólidos Disueltos Totales

ST: Sólidos Totales

FAS: Tiosulfato de Sodio Amoniacal

LDM: Límite de Detección del Método

RESUMEN

TITULO: VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE AGUA: DQO, DBO₅, SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS SUSPENDIDOS Y DISUELTOS A TRAVÉS DE EVIDENCIAS ESTADÍSTICAS CONFORME A LO DISPUESTO EN LA NORMA ISO 17025 DEL 2005 Y LA IDENTIFICACIÓN DE MESOFILOS, COLIFÒRMES TOTALES Y FECALES, EN LA UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL SOCORRO¹

AUTOR: IBAÑEZ REYES, Gina Tatiana ²

PALABRAS CLAVES: Validación, Estadística, ISO 17025, DQO, DBO₅, Sólidos, Coliformes, Mesofilos, Coeficiente de Variación.

El objetivo de la práctica empresarial fue realizar la Validación de cinco técnicas fisicoquímicas de análisis de agua (DQO, DBO₅, Sólidos Totales, Sólidos Suspendidos y Disueltos) junto con la prevalidación de dos técnicas microbiológicas (identificación de Mesofilos y Coliformes Totales y Fecales), en el laboratorio de Aguas y Microbiología de la Universidad Libre Seccional Socorro con una secuencia de pruebas teniendo en cuenta diferentes matrices de agua, patrones y muestras certificadas, realizando un análisis estadístico para observar la confiabilidad de las pruebas, aplicando las regulaciones de la norma ISO 17025 del 2005.

De los resultados de las validaciones de las pruebas fisicoquímicas es importante mencionar que ninguna muestra tuvo un porcentaje de error superior al 5% y los porcentajes de recuperación fueron superiores al 95%; aunque algunas de las matrices no cumplían con la precisión indicada en la validación el procedimiento permite modificar el número de datos tomados logrando así que este parámetro sea verificable.

La determinación de la DQO que fue desarrollada por la técnica volumétrica y colorimétrica; esta validación indica que es más sensible la volumetría logrando así dar resultados hasta con dos decimales mientras que la colorimetría con uno solo, la prueba de DBO₅ también desarrollada por volumetría se da con dos decimales a diferencia de la técnica gravimétrica que solo permite un decimal. En conclusión, la técnica volumétrica es más precisa que la colorimétrica o gravimétrica.

En cuanto a la identificación microbiológica se concluye que los medios utilizados para la detección de Mesofilos, Coliformes Totales y Fecales son selectivos; que el medio Chromocult (Coliformes) es específico para bacterias Gram Negativas; mientras que el medio Plate Count (Mesofilos) permite cultivar bacterias Gram Negativas y Gram Positivas que tengan una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C.

¹Práctica Empresarial

² Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director Crisóstomo Barajas Ferreira. Tutor María Fabiola Arenas Estévez

SUMMARY

TYTLE: VALIDATION OF THE TECHNOLOGIES OF WATER ANALYSIS: COD, BOD₅, TOTAL SOLID, SOLID SUSPENDS AND SOLID DISSOLVES ACROSS STATISTICAL EVIDENCES IN CONFORMITY WITH ARRANGED IN THE ISO NORM 17025 OF 2005 AND IDENTIFICATION OF MESOPHILICS, TOTAL AND FECAL COLIFORMS IN THE SECTIONAL SOCORRO OF THE UNIVERSITY LIBRE.³

AUTHOR: IBAÑEZ REYES, Gina Tatiana⁴

KEY WORD: Validation, Statistics, ISO 17025, COD, BOD₅, Solid, Coliforms, Mesophilics, Coefficient of Variation.

The aim of the managerial practice was to realize the Validation of five physicochemical technologies of water analysis (COD, BOD₅, Total Solid, Suspends Solid and Dissolveds Solid) together with the prevalidation of two microbiological technologies (Identification Mesophilics, Coliforms Totals and Fecals Coliforms), in the laboratory of Waters and Microbiology of the Sectional Socorro of the University Libre with a sequence of tests bearing in mind different samples of water, patterns and certified samples, realizing an analysis statistics to observe the reliability of the tests, applying the regulations of the ISO 17025 of 2005.

Of the results of the validations of the physicochemical tests it is important say that no sample had a percentage of mistake superior to 5% and the percentages of recovery they were superior to 95%; though some of the sample were not complied with the precision indicated in the validation the procedure it allows to modify the number of taken information managing so this parameter is verifiable.

The determination of the COD that was developed by the volumetric and colorimetric technology; this validation indicates that the volumetry is more sensitively archieving like that to give results up to with two decimals whereas the colorimetry with the alone one, the test of BOD₅ also developed by volumetry one gives with two decimals unlike the technology gravimetric that alone allows a decimal. In conclusion, the volumetric technology is more precise than colorimetric or gravimetric.

As for the identification microbiological one concludes that the means used for the detection of Mesophilics, Totals Coliforms and Fecals Coliforms they are selective; that the way Chromocult (Coliforms) is specific for bacteria Gram Negatives; whereas the half Plate Count (Mesophilics) allows to cultivate bacteria Gram Negatives and Gram Positives that have an ideal included temperature of growth between 20°C and 45°C.

³ Managerial practice

⁴ Faculty of Physicochemical Engineerings. School of Chemical Engineering. Director Crisóstomo Barajas Ferreira. Tutor Maria Fabiola Arenas Estévez

INTRODUCCIÓN

La validación tiene por objetivo demostrar con alto grado de confianza, por medio de réplicas y de evidencia documentada que un proceso o prueba producirá de forma consistente y permanente datos que reunirán las características de calidad predefinidas. La implementación de la norma ISO 17025/2005 en los laboratorios permite demostrar la competencia técnica incluida la gestión de calidad, obteniendo la confiabilidad de los resultados.¹

Conscientes de este compromiso las directivas de la Universidad Libre Seccional Socorro en especial la jefe del Laboratorio de Aguas y Microbiología han permitido el desarrollo del Proyecto de Grado: Validación de las técnicas de análisis de agua: DQO, DBO₅, Sólidos Totales, Sólidos Suspendidos y Disueltos y prevalidación de Mesofilos, Coliformes Totales y Fecales; a través de evidencias estadísticas conforme a lo dispuesto en la norma ISO 17025 del 2005. Con el objetivo de demostrar, por medio de un análisis estadístico, que las técnicas utilizadas en el Laboratorio de Aguas y Microbiología (cinco fisicoquímicas y dos microbiológicas) en matrices de agua natural y residual, son realmente eficientes y arrojan resultados confiables.

En el desarrollo del siguiente trabajo se evidencian todas las etapas del desarrollo de la Validación, iniciando con la prevalidación, ensayos preliminares, validación, análisis estadístico, informe y mejoras para los procedimientos establecidos en el Laboratorio.

¹ Norma ISO 17025 "Requisitos generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración". 2005

1. MARCO TEORICO

1.1 NORMA ISO 17025

La norma ISO 17025:2005, "Requisitos generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración", es una norma que demuestra que los laboratorios de prueba y calibración utilizan un sistema de calidad, son técnicamente competentes y son capaces de generar resultados técnicamente válidos. La norma cubre todos los aspectos de la gestión de laboratorios; desde la preparación de muestras y la capacidad de realizar pruebas analíticas, hasta el sistema de registros e informes. Incluye revisiones de control de documentos, acciones correctivas y preventivas, equipos, errores de medición, muestreo y evidencia de rastreabilidad.²

1.2 VALIDACIÓN

Validar es demostrar con un alto grado de confianza, por medio de evidencia documentada que un proceso específico producirá de forma consistente productos que reunirán las características de calidad predefinidas. (CORTÉS, JANETH, & SANDINO, 2002) Este proceso además ofrece evidencia de que un método es capaz de servir para su propósito planteado, para tal fin se deben reflejar las condiciones reales de ensayo, esto puede conseguirse usando patrones con un número conocido de analito (es el componente de interés analítico de una muestra. Son especies químicas cuya concentración se desea conocer).

1.1.1 Parámetros de Desempeño de la Validación. Son las propiedades, características o capacidades del método.

² US PHARMACOPEIA. [En línea] Proceso de Validación. <http://www.usp.org/ES/aboutUSP/ISOcertified.html> [citado el 30 de marzo de 2010]

1.1.1.1 Exactitud. La exactitud, es la cercanía de un resultado al valor verdadero por comparación con los valores de referencia de un material caracterizado (material de referencia). Es ideal que el material de referencia sea de matriz natural lo mas similar posible a las muestras de interés. (RODRIGUEZ, 2004). La exactitud como porcentaje de error se expresa:

$$\% \text{ Error} = \frac{x_{\text{exp}} - x_{\text{real}}}{x_{\text{real}}} \times 100$$

Si el %Error < 1 existe un defecto

Si el %Error > 1 hay un exceso

1.1.1.2 Precisión. Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas. Usualmente se expresa en términos del coeficiente de variación (CV): (LABORATORIO, 2010)

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Donde **s** es la desviación estándar y \bar{x} es el

promedio

1.1.1.3 Recuperación. Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como:

$$\%R_M = \frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \times 100$$

%R_M Porcentaje de Recuperación

C_M Concentración promedio de la muestra no adicionada

C_{MA} Concentración de la muestra adicionada

C_A Concentración conocida adicionada a la muestra

1.1.1.4 Límite de Detección. La práctica común identifica varios límites de detección, pero se tomarán:

- Límite de detección del método—LDM: Concentración de analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco. Para siete réplicas de la muestra, la medida debe ser 3,14*s veces superior al blanco, donde **s** es la desviación estándar de

siete muestras. Para determinar el LDM se analizan diez partes de esta solución y se calcula la desviación estándar, a partir de una tabla de distribución desigual de t (la distribución t de Student), se selecciona el valor de t para n-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 95%. (IDEAM, 1999)

- Límite de detección instrumental—LDI: Concentración de analito que produce una señal superior a cinco veces la relación señal/ruido del instrumento; se ha establecido en 1,645 veces el valor **s** de los análisis de blancos. Resulta útil para valorar la concentración del analito necesaria para producir una señal que permita calcular un LDM estimado. (LABORATORIO, 2010)

1.1.1.5 Incertidumbre. La incertidumbre de una medición es un parámetro asociado con el resultado de esa medición, que caracteriza la dispersión de los valores que se podrían atribuir razonablemente al mensurando.

- La incertidumbre estándar es la incertidumbre del resultado de una medición expresado como una desviación estándar (**s**).
- La evaluación tipo A es el método de evaluación de la incertidumbre por medio del análisis estadístico de una serie de observaciones. Está determinada por los análisis estadísticos.
- La evaluación tipo B es el método de evaluación de la incertidumbre por medios distintos al análisis estadístico de una serie de observaciones. Está determinada por la desviación de los instrumentos y equipos utilizados
- La incertidumbre estándar combinada es la incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando el resultado se obtiene de los valores de otras cantidades, y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, los cuales son las varianzas o covarianzas de estas otras cantidades ponderadas de acuerdo a cómo el resultado de la medición varía con cambios en estas cantidades.

$$u_c(m) = \sqrt{u_A^2(m) + u_B^2(m)}$$

u_A Incertidumbre tipo A

u_B Incertidumbre tipo B

La última cifra significativa de un resultado escrito debe ser congruente con la incertidumbre (debe estar en la misma posición decimal). (INCONTEC, 2005)

1.1.1.6 Rango de trabajo e intervalo de aplicación del método. El rango de trabajo se da tomando en cuenta la validación y las muestras que se utilizaron, va desde la mínima concentración que puede ser medida con una exactitud y precisión aceptables hasta el rango dado en la validación; para el intervalo de aplicación del método se tiene en cuenta que va desde la mínima cantidad detectable hasta la concentración que se podría leer con la máxima dilución posible aceptable de acuerdo con las condiciones de la validación y las fisicoquímicas de la muestra (no mayor de 1:10). (LABORATORIO, 2010)

1.1.1.7 Blanco. Es un sistema físico que no contiene muestra real o el analito de interés, pero que debe contener todos los reactivos que se utilizan en el método de análisis, y ser sometido a las mismas condiciones y al mismo procedimiento que las muestras reales y los estándares. En lugar de muestra, el volumen faltante se completará con agua grado reactivo que deberá tener la calidad recomendada por el método respectivo. (IDEAM, 1999)

1.1.1.8 Muestra. Sistema físico que sea sometido al procedimiento de análisis siguiendo el método que se está estandarizando, ya sea un Blanco, un estándar, una muestra adicionada o una muestra propiamente dicha. (LABORATORIO, 2010)

1.1.1.9 Muestra Adicionada. Es una muestra real o natural a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito que se estudia. Esta adición debe hacerse en la forma prevista en el diseño de las condiciones de estandarización para que sea reproducible. (LABORATORIO, 2010)

1.1.1.10 Muestra Certificada. Material de referencia, acompañado por un certificado, que posee valores de una o más propiedades, para el cual cada valor certificado está acompañado por su incertidumbre, con un nivel de confianza establecido. (LABORATORIO, 2010)

1.1.2 Grupo básico de Validación. El grupo básico de muestras a realizar en cada ensayo es:

1. BK (Blanco de reactivos y procedimiento)
2. E.b (Estándar de concentración baja; 20 % del intervalo)
3. E.m (Estándar de concentración media; aprox. El 50% del intervalo)
4. E.a (Estándar de concentración alta; aprox. El 90% del intervalo)
5. M1 (Muestra natural, concentración <50% del rango)
6. M2 (Muestra residual, concentración >>M1)
7. M2A.b (M1 adicionada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M2)
8. M1A.a (M1 adicionada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1)
9. Mc (Muestra o estándar certificado).
10. Dilución (La concentración se escoge según el intervalo de trabajo)

En total se deben correr un mínimo de 7 ensayos (con duplicado) en días diferentes que pueden ser continuos o alternos. (LABORATORIO, 2010)

1.3DQO

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es la medida del oxígeno molecular requerido para oxidar el contenido de materia orgánica de una muestra, que es susceptible a la oxidación por un oxidante químico fuerte. Más del 95 % de la materia orgánica es oxidable por una mezcla de ácidos crómico y sulfúrico en ebullición. En esta técnica la muestra se somete a ebullición en un reflujo cerrado, en solución fuertemente ácida, con exceso conocido de dicromato de potasio. Después de la digestión, en la detección por colorimetría, se compara en un espectrofotómetro, el color verde del ácido crómico reducido a 605 nm, con patrones de concentración conocida, el cual es proporcional a la materia orgánica oxidable y por volumetría después de la digestión, el remanente de $K_2Cr_2O_7$ sin reducir se titula con sulfato ferroso de amonio; se usa como indicador de punto final el complejo ferroso de ortofenantrolina (ferroina). La materia orgánica

oxidable se calcula en términos de oxígeno equivalente. Revisar el Anexo D y el Anexo J. (STANDARD, 2005)

1.4 DBO₅

La Demanda Bioquímica de Oxígeno es la medida de la cantidad de oxígeno molecular consumido durante un período de incubación de 5 días, para la degradación bioquímica de la materia orgánica por una población microbiana heterogénea. El ensayo se basa en la adición de solución de manganeso divalente, seguida de un álcali fuerte, a la muestra contenida en un frasco winkler o botella para DBO. El Oxígeno Disuelto (OD) oxida rápidamente una cantidad equivalente del hidróxido manganeso divalente disperso pasando el Mn^{+2} a Mn^{+4} , el cual precipita como un óxido hidratado de color café. En presencia de iones yoduro y acidificación, el manganeso oxidado revierte al estado divalente, con la liberación del yodo equivalente al contenido original del OD. El yodo es entonces titulado con una solución valorada de tiosulfato de sodio. El punto final de la titulación puede ser detectado visualmente, con almidón como indicador. Revisar el Anexo C y el Anexo H. (STANDARD, 2005)

1.5 SÓLIDOS TOTALES

Son todos los residuos sólidos que se obtienen por evaporación directa de la muestra de agua y posterior secado a temperatura de 103 -105 °C. Incluye el residuo filtrable y no filtrable que corresponden a los sólidos disueltos y los sólidos suspendidos. Una muestra bien mezclada es evaporada en un recipiente previamente secado y pesado, el residuo obtenido, se seca a 103 – 105 °C hasta peso constante. El incremento en el recipiente representa los sólidos totales. Revisar el Anexo F y el Anexo L. (STANDARD, 2005)

1.6 SÓLIDOS DISUELTOS

Son aquellos sólidos que pasan a través de un filtro de tamaño de poro de 2,0 μm , bajo condiciones específicas. Una muestra bien mezclada es filtrada y evaporada en un recipiente previamente secado y pesado, el residuo obtenido, se seca a 103 – 105 °C hasta peso constante. El incremento en el recipiente representa los sólidos disueltos. Revisar Anexo E y el Anexo K. (STANDARD, 2005)

1.7 SÓLIDOS SUSPENDIDOS

Los sólidos suspendidos son aquellos que se retienen en un filtro de fibra de vidrio de tamaño de poro de 2,0 μm . Una muestra bien homogenizada se filtra a través de una membrana de microfibra de vidrio estándar previamente seca y pesada. El residuo retenido por la membrana se seca de a 105 °C hasta peso constante. El incremento en el peso del filtro representa el contenido total de sólidos suspendidos en la muestra. Revisar Anexo E y el Anexo K. (STANDARD, 2005)

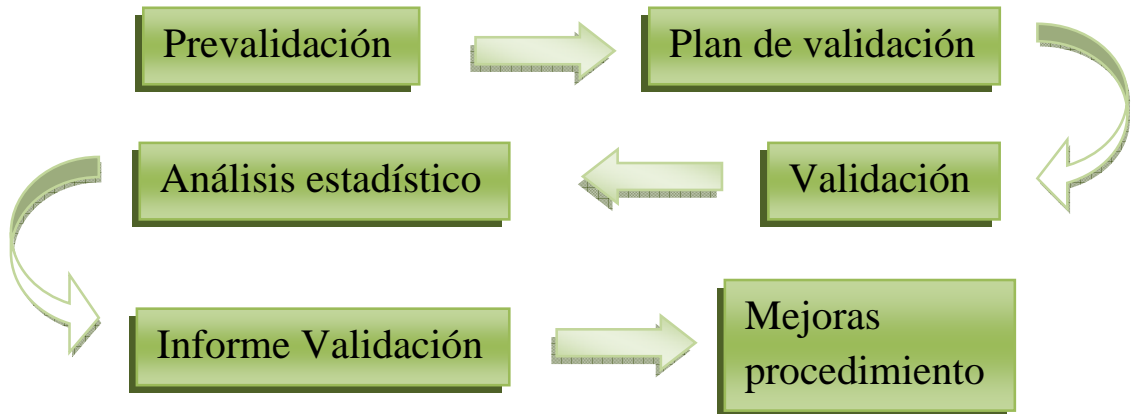
1.8 COLIFORMES Y MESOFILOS

Bacterias que pertenecen a la familia de las Enterobacterias, generalmente los géneros *Escherichia* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp. Todos ellos con excepción de *Escherichia* sp. pueden existir como saprofitos libres, además de ser organismos intestinales. Este grupo son aeróbicas y anaerobias facultativas Gram-negativas, no formadoras de esporas, con formas de varillas, que fermentan la lactosa, formando ácido y gas dentro de un periodo de 24-48 horas a 35-37°C. La muestra de agua se hace pasar mediante vacío por un filtro de celulosa de 0,45 micras de tamaño de poro, para que queden retenidas en él las bacterias de tipo coliformes y mesófilas. El filtro es colocado en un medio de cultivo específico para lo que se desea determinar en la muestra (coliformes

totales y fecales o mesofilos), incubado a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 20 horas.
(UNILIBRE, 2009)

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo se definieron una serie de etapas que se describen a continuación:



FUENTE: El Autor

El proceso de validación se inicia con las actividades de prevalidación, las cuales consisten en la recopilación de la información relacionada con el proceso, existencia de procedimientos para las tareas u operaciones y el entrenamiento a los trabajadores. Posteriormente se procede a elaborar los protocolos en donde se define los objetivos específicos de las evaluaciones a efectuar, se establecen las variables de interés que se quieren monitorear, además de incluir los criterios de aceptación o la comparación de los resultados con los niveles permisibles o resultados esperados. (ESTRADA, 1999)

A continuación se desarrolla la validación en donde se realiza una evaluación de una muestra representativa, en número de lotes de producción o en tiempo. Durante esta fase se recopilan las muestras de las variables que se desean medir y se realizan los análisis o cálculos respectivos. Finalmente con los resultados arrojados por el proceso anterior se hacen las recomendaciones respectivas y conclusiones, que después de cumplir un plan de acción se cierran y se procede a declarar el proceso como válido. (ESTRADA, 1999) Incluso cuando se haya realizado la validación, el laboratorio tendrá que verificar periódicamente que se

cumplen los parámetros documentados, utilizando por ejemplo material de referencia incorporadas a las matrices más representativas. (ENAC, 2002)

2.1 PREVALIDACIÓN

El objetivo de la prevalidación es desarrollar una secuencia de pruebas preliminares a la validación que permitan hacer un Plan donde se contemplen todas las variables necesarias para que se pueda proporcionar información confiable sobre los métodos utilizados en el laboratorio para la determinación de características fisicoquímicas y microbiológicas de aguas crudas, tratadas y residuales tanto urbanos como industriales, basados en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, métodos aceptados oficialmente por el IDEAM, además incluye la toma de muestra, su preparación en el Laboratorio. (UNILIBRE, 2009) La prevalidación contempla una secuencia de pasos para su elaboración:

- Seleccionar el método para cada analito
- Conocer el fundamento físico y químico del método y la técnica
- Realizar los procedimientos de cada técnica a validar teniendo en cuenta como referencia el Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater y adecuándolo a las condiciones de trabajo del laboratorio.
- Calibrar los equipos (prueba de calibración y curva de calibración)
- Rectificar la disponibilidad y manejo correcto de los materiales del laboratorio (vidriería entre otros) señalando las cantidades necesarias
- Tener en cuenta los requerimientos para la limpieza de los materiales
- Efectuar el procedimiento para la descontaminación y limpieza del material y para la disposición de los desechos
- Plasmar un inventario de reactivos (identificación, cuantificación, calidad, grado de pureza, conservación, precauciones)
- Revisar la vigencia y cantidad de los reactivos
- Diseñar un formato para la captación de datos o modificar los existentes

- Realizar el montaje del método; si ya se encuentra montado analizar que coincida con la literatura y si es un método propio que se encuentre documentado explícitamente para definir el intervalo de aplicación del método.

Además de los parámetros ya mencionados para la prevalidación de Mesofilos, Coliformes Totales y Fecales también se tiene en cuenta:

- Siembra y identificación de colonias
- Tinción de Gram para la valoración de morfología

2.2 PLAN DE VALIDACIÓN

El plan de validación (Anexo A) tiene por objetivo guiar al laboratorista sobre la validación que se debe desarrollar, contempla entre otras cosas la técnica a validar, una descripción de la técnica, los equipos a utilizar, materiales y reactivos necesarios, la captura de datos, el intervalo de aplicación del método (obtenido de la prevalidación), el procedimiento de validación (preparación de patrones, adiciones y diluciones), matrices a utilizar (blanco, muestras, muestras certificadas), el plan básico de validación, cálculos para resultados, las fechas programadas y los diagramas de flujo de los equipos y del procedimiento. (IDEAM, 1999) Para desarrollar el plan de validación es necesario:

- Calcular el tiempo total de la validación
- Realizar el plan de validación según los lineamientos (Seguir los parámetros dados para el formato de plan de validación)
- Realizar la estandarización y valoración de patrones y añadidos
- Recolectar, almacenar y adecuar las muestras

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Teniendo los cálculos de las pruebas, se hace un análisis de la confiabilidad de las pruebas por evidencia estadística tomando como referencia el protocolo de

estandarización de métodos analíticos del IDEAM, en el se encuentran contempladas la desviación, el coeficiente de variación, los límites de detección entre otras. Se debe realizar cada día o una vez se termine cada lote.

Utilizando las fórmulas presentadas en las definiciones, calcular:

2.3.1 Rechazo de datos. Calcular el estadístico **T** para los valores extremos de cada grupo (máximo y mínimo), de la siguiente manera:

- Ordenar los datos por ensayos realizados
- Detectar el valor mínimo y máximo de cada muestra x_{bajo} y x_{alto}
- Calcular el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (s)

- Calcular **T** como:
$$T = \frac{x_{alto} - \bar{x}_{prom}}{s}; \text{ para un valor alto}$$
$$T = \frac{\bar{x}_{prom} - x_{bajo}}{s}; \text{ para un valor bajo}$$

- Analizar si el **T** calculado $>$ **T** de tablas (para un nivel de confianza del 95%) y n mediciones, el dato se rechaza. Anexo B.

De acuerdo con el tamaño de las poblaciones que se van a manejar, se pueden rechazar como máximo dos datos; si la aplicación del criterio de rechazo da positiva para más de dos datos, el ensayo deberá repetirse. (LABORATORIO, 2010)

2.4 INFORME DE VALIDACIÓN

El informe permite conocer el resultado de la Validación, resume y presenta todos los protocolos, resultados y deriva conclusiones relacionadas con el estado de validación del proceso. Debe ser revisado y aprobado por el equipo de validación y la administración. (RODRIGUEZ, 2004) Como resultado de la estandarización se deben presentar:

- Plan de validación: Siguiendo con los lineamientos dados en el Procedimiento de Validación

- Soporte técnico: Contiene todos los documentos originales producidos durante el proceso de estandarización, las notas y observaciones del analista, hojas de captura de datos y de cálculos; y demás información que permita la revisión del proceso.
- Informe de validación: Son los resultados finales del proceso, expresados en forma clara con la incertidumbre.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los datos suministrados en la (Tabla 1) son recopilación de los resultados que se encuentran en el Anexo N.

Tabla 1 Resumen de Validaciones pruebas fisicoquímicas

CUADRO RESUMEN PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO							
NOMBRE DEL MÉTODO: Determinación de DQO, DBO5, Sólidos Suspendedos, Sólidos Disueltos y Sólidos Totales							
TÉCNICAS: Colorimétrica y Volumétrica, Volumétrica, Gravimétrica, Gravimétrica y Gravimétrica							
PARÁMETRO	INDICADOR	DBO	DQO C	DQO V	SST	SDT	ST
PRUEBAS REALIZADAS		123	134	134	116	116	131
DECIMALES	Incertidumbre	2	1	2	1	1	1
INCERTIDUMBRE	Combinada	0,06	0,5	0,05	0,3	0,6	0,3
LÍMITE DE DETECCIÓN	Método	0,17	5,0	0,54	2,0	3,1	2,7
	Práctica	0,86	25,2	2,71	9,9	15,6	13,3
PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE %CV	Estándar bajo	6,93	4,9	7,03	3,4	4,5	18,6
	Estándar medio	4,04	0,7	0,61	2,3	1,0	0,3
	Estándar alto	3,71	0,9	1,17	2,0	0,9	0,6
	Dilución 1:10	1,45	1,7	0,66	-	-	-
	Muestra Certificada	2,18	1,6	1,12	9,3	4,5	-
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	Estándar bajo	0,98	2,3	0,73	0,9	3,6	1,4
	Estándar medio	1,27	0,2	0,25	1,4	0,1	0,2
	Estándar alto	2,24	0,1	0,3	0,9	0,3	0,1
	Dilución 1:10	1,01	1,1	0,11	-	-	-
	Muestra Certificada	-	-	-	2,1	6,8	4,6
RANGO DE TRABAJO	Dilución 1:10	0,17 - 20.129,35	5,0 - 5.172,6	0,54 - 5.038,08	2,0 - 1.370,0	3,1 - 2.671,0	2,7 - 6.084,0
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO	Dilución 1:10	0,86 - 20.000,00	25,2 - 5.000,0	2,71 - 5.000,00	9,9 - 1.500,0	15,6 - 3.000,0	13,3 - 7.000,0
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	Añadido alto	96,38	99,9	100,36	99,3	97,5	99,8
	Añadido bajo	96,80	102,0	99,64	97,9	98,5	96,9

Fuente: El Autor

3.1 RECHAZO DE DATOS

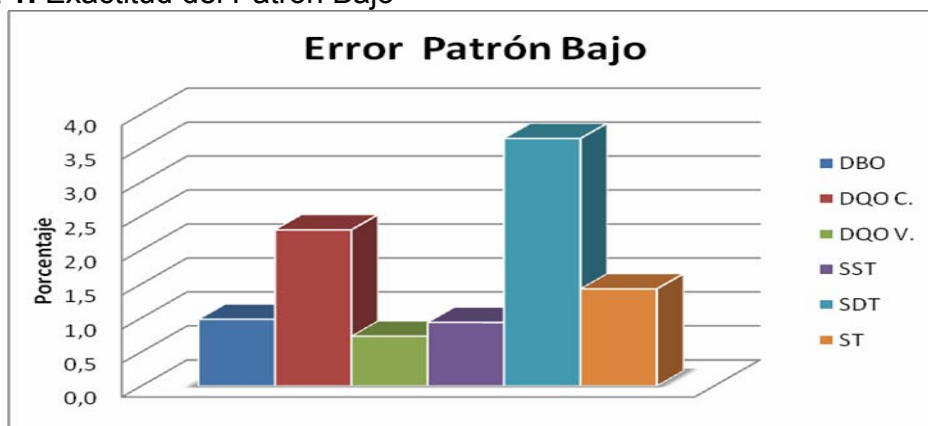
La prueba de t Student para la validación analiza un nivel de confianza del 95% para el número de total de mediciones. El procedimiento de validación permite rechazar hasta dos (2) datos.

Durante la validación existieron dos matrices o muestras que no cumplieron con el nivel de confianza exigido por esta razón se hizo necesario realizar un rechazo de datos:

- **SÓLIDOS TOTALES:** Según el nivel de confianza el blanco y el estándar bajo no cumplen, como la validación permite rechazar hasta dos (2) datos se tienen en cuenta solo los doce (12) últimos datos del blanco para hallar los límites de detección y cuantificación del método. En el estándar bajo el error se debe a la fluctuación tan grande que tuvieron los datos tomados, además como en el blanco el error ocurrió el primer día de validación donde no se le prestó la atención debida al pesaje inicial de las cápsulas y se presentó material particulado.
- **DQO VOLUMETRÍA:** Por la prueba de t Student para el estándar medio se hizo necesario tener en cuenta solo los trece (13) últimos datos, el error se debe a el punto exacto de la titulación y ocurrió el primer día de validación donde no se le prestó la atención debida al punto final.

3.2 EXACTITUD

Figura 1. Exactitud del Patrón Bajo

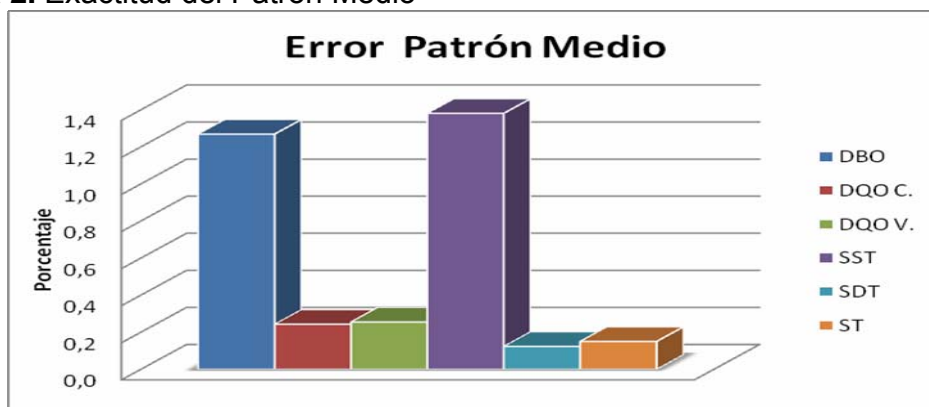


FUENTE: El Autor

La exactitud de las cinco pruebas fisicoquímicas indica que el patrón bajo (Figura 1) tiene el mayor error de los patrones tomados en referencia, esto se debe a que la balanza para las técnicas gravimétricas tiene una fluctuación propia de

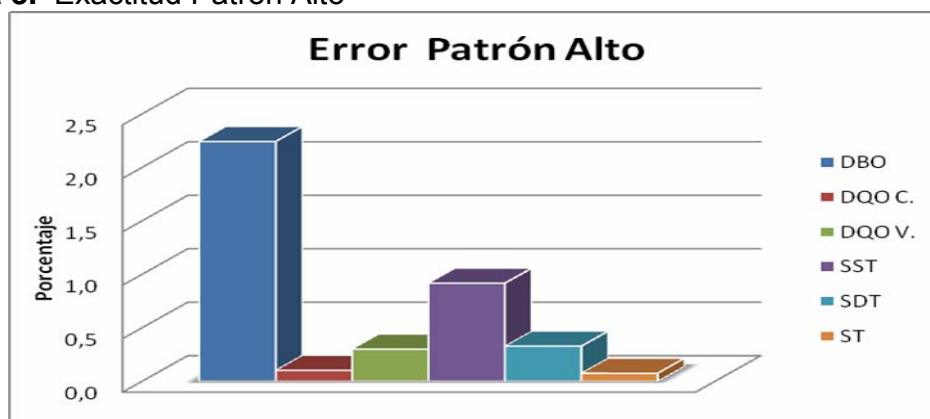
fabricación de ± 3 mg de sólidos que en valores bajos es significativo, para concentraciones bajas el fotómetro también tiende a fluctuar de forma mayor que en concentraciones altas, las pruebas por volumetría tienen el error mas bajo de las tres técnicas y no sólo en el patrón bajo sino en todas las muestras tomadas como referencia.

Figura 2. Exactitud del Patrón Medio



FUENTE: El Autor

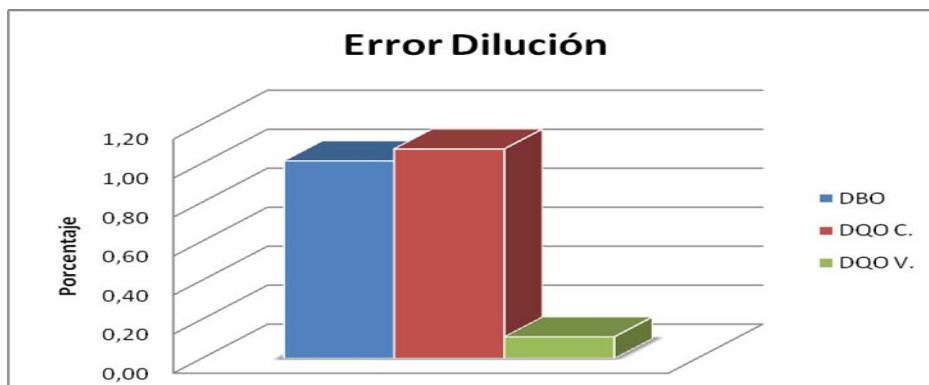
Figura 3. Exactitud Patrón Alto



FUENTE: El Autor

La diferencia del error en el patrón alto (Figura 3) se debe a que el volumen utilizado para la validación de la DBO₅ fue muy bajo, es por esta razón que esta técnica se debe utilizar sólo para muestras con DBO₅ esperada de no superiores a 20.000 mg/L O₂ con una dilución de 1:10 este parámetro se tomó también analizando el error de la dilución pasada en la Validación.

Figura 4. Exactitud Dilución 1:10



FUENTE: El Autor

Figura 5. Exactitud de la Muestra Certificada



FUENTE: El Autor

La exactitud de la muestra certificada (Figura 5) indica que existe una sola muestra que se sale del rango establecido por el laboratorio del 5% y es la de sólidos disueltos, hay que tener en cuenta que el patrón certificado del IDEAM sólo acepta una desviación estándar, y tomando este dato como referencia la validación no se pasa de la desviación admitida por el IDEAM. Aunque se estandarizó la muestra antes de utilizarla en la validación su error fue superior al establecido en el laboratorio, se esperaba que durante la validación se redujera, no se debió tener en cuenta la muestra certificada ya que lleva dentro del laboratorio más de un año y no se habían realizado pruebas para comprobar su vigencia.

3.3 PRECISIÓN

Se tomó como referencia el coeficiente de variación pero al analizar los trece (13) grados de libertad al 95% de confianza para la precisión en el procedimiento de Validación existen muestras que no cumplen entre las que se encuentran:

- SÓLIDOS TOTALES: El blanco, patrón bajo y patrón medio
- SÓLIDOS DISUELTOS: El patrón alto y el añadido alto

Los valores no deben fluctuar teniendo especial atención en el pesaje de las cápsulas, el tiempo de las cápsulas en el desecador, centrando los objetos en la balanza y tomando siempre el primer peso que de la balanza cuando aparezca “g” en el display.

- DBO₅: El añadido bajo.

Atención al realizar la fijación del oxígeno en las muestras, esperar la decantación antes de agregar el ácido sulfúrico y en la titulación no sobrepasar el punto final.

3.4 RECUPERACIÓN

Para el añadido bajo la técnica colorimétrica de la DQO sobrepasa el 100%, vale la pena aclarar que entre una lectura de absorbancia y otra existe $\pm 2,4$ mg/L O₂ y que la lectura de la absorbancia varía significativamente con el tiempo (Anexo G). Para el añadido alto al igual que en el añadido bajo DQO por colorimetría es la única muestra que sobrepasa el 100% en el resto de las muestras la recuperación es superior a la registrada en el añadido bajo.

3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN

Para este caso se analizaron diez (10) partes del blanco y se comparó con la tabla de distribución t (t de Student) con un nivel de confianza del 99% tomando como referencia los nueve (9) grados de libertad. (IDEAM, 1999).

Tabla 2. Comparación de los límites de detección de la Validación

PARÁMETRO	LIMITE DE DETECCIÓN		LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	
	MÉTODO	VALIDACIÓN	PRÁCTICA	VALIDACIÓN
DBO ₅	0,17	0,40	0,86	1,98
DQO C	5,0	7,6	25,2	37,8
DQO V	-	0,54	-	2,71
SST	2,0	3,5	9,9	17,3
SDT	3,1	6,9	15,6	34,7
ST	2,7	3,7	13,3	18,3

Fuente: El Autor

Para la DBO₅ como se observa al comparar el límite de detección del método cuando se desarrolla la validación y por este método se puede notar que existe una diferencia significativa que se amplifica al tener en cuenta el límite de cuantificación de la validación.

En la DQO el límite de detección por el método yodométrico se tuvo en cuenta el cambio que tiene la bureta de $\pm 0,02$ ml hallando así la fluctuación que tiene el método tomando como referencia la normalidad del FAS. Se observa que el límite de detección por yodometría es inferior al de colorimetría; esto se debe a los valores negativos de las concentraciones (colorimetría). Al comparar el límite de detección del método cuando se desarrolla la validación para colorimetría el límite disminuye casi en un 40%, esto se debió a los valores tan variados de los blancos en la validación.

Al analizar los sólidos suspendidos los límites disminuyen en casi un 40% debido a que en la validación existieron valores muy altos en los blancos. Para sólidos disueltos al comparar el límite de detección del método cuando se desarrolla la validación y por este método se puede notar que se cumple con el 99% de confianza mientras que en la validación no fue posible, esto se debió a los valores tan altos de las primeras pruebas. El límite disminuye casi en un 55%. En sólidos

totales la disminución es de un 30% en el límite y como en los sólidos disueltos en la validación no se cumple con el 99% de confianza.

En cuanto a los rangos como se observa en la prueba de DQO el intervalo de aplicación del método es superior para la técnica volumétrica, lo que indica que esta es mas precisa que la colorimétrica.

3.6 INCERTIDUMBRE

La incertidumbre corresponde a la dada en la prueba de las diez (10) partes del Blanco.

- Para la DBO_5 se tuvo en cuenta que se contaba con un análisis estadístico (incertidumbre tipo A) y los datos previstos de la desviación estándar de la bureta utilizada para la titulación $\pm 0,05$ ml (incertidumbre tipo B), es así como se halló la Incertidumbre combinada, muestra un intervalo ($\pm 0,05$ mg/L O_2) alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero. E indica que los resultados se dan con dos (2) decimales.
- En la DQO para la incertidumbre por colorimetría se tuvo en cuenta que se contaba con un análisis estadístico (incertidumbre tipo A) solamente. Para este caso muestra un intervalo ($\pm 0,5$ mg/L O_2) alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero. Además indica que el resultado se da con un (1) decimal. Para los cálculos de la Incertidumbre por yodometría se tomo en cuenta que la bureta varía en $\pm 0,02$ ml (desviación estándar de la bureta dada por el fabricante) o incertidumbre tipo B, es así como se halló la Incertidumbre combinada, muestra un intervalo ($\pm 0,05$ mg/L O_2) alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero. Además indica que los resultados se dan con dos (2) decimales. Para las técnicas gravimétricas se tiene en cuenta la desviación de la balanza de ± 3 mg sólidos es por esta razón que todas las incertidumbres son combinadas.

- Para sólidos suspendidos se da un intervalo de $\pm 0,2$ mg/L sólidos suspendidos y los datos se dan con un (1) decimal.
- En sólidos disueltos el intervalo es de $\pm 0,3$ mg/L sólidos disueltos y al igual que los sólidos suspendidos se utiliza un (1) decimal para los resultados.
- Los sólidos totales se dan con un intervalo de $\pm 0,3$ mg/L sólidos totales alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero. Y también se utiliza un (1) decimal para los resultados.

3.7 IDENTIFICACION MICROBIOLÓGICA

El procedimiento de identificación de microorganismos se desarrollo en dos medios de cultivo:

- Chromocult para Coliformes
- Plate Count para Mesofilos

Tomando como referencia tres matrices extraídas del sistema de tratamiento primario de aguas residuales de la Universidad libre Seccional Socorro, implementado para aguas de tipo domestico siguiendo con los parámetros estipulados por el IDEAM para la toma de muestra y manipulación:

- Muestra 1: Tomada del recolector del sistema de tratamiento
- Muestra 2: Tomada del tanque 1 del sistema de tratamiento
- Muestra en dilución 1:100 de materia fecal

Tabla 3. Resumen de Prevalidación pruebas Microbiológicas

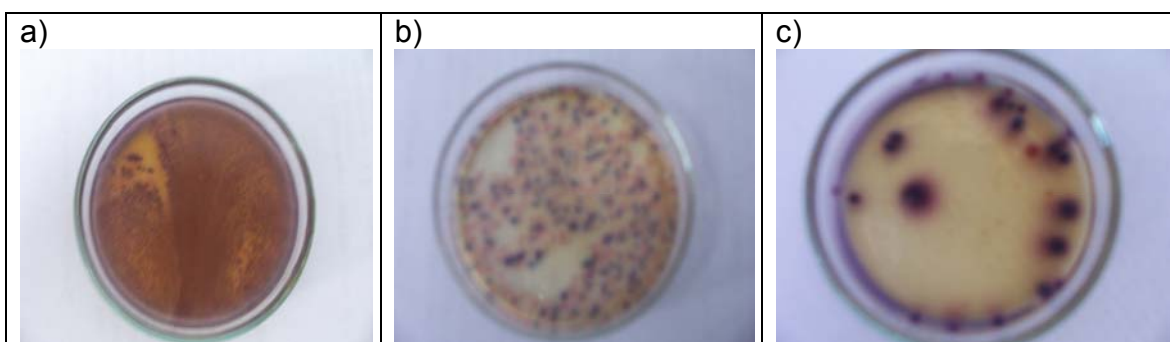
NOMBRE DE LA PREVALIDACIÓN: COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES Y MESOFILOS
CÓDIGO DEL PROCEDIMIENTO: SO-GS-05-P-26
FECHA DEL INFORME DE PREVALIDACIÓN: 5 DE ABRIL DE 2010

CONDICIONES DE TRABAJO	VALOR	OBSERVACIÓN
PRUEBAS REALIZADAS	40	De Siembra con las tres muestras
	38	Tinción de Gram
MATRIZ A UTILIZAR	2	Muestra tomada del tanque 1 del sistema de tratamiento primario de la Universidad
VOLUMEN DE MUESTRA (ml)	0,1	Se toma con la transferpipeta y se esparce en forma circular
TIEMPO DE INCUBACIÓN (horas)	24	Se toma igual para todas las incubaciones prevalidación y validación
TEMPERATURA DE INCUBACIÓN (°C)	37	Se toma igual para todas las incubaciones prevalidación y validación
NÚMERO DE COLONIAS A IDENTIFICAR	2	Se usan tanto para coliformes y mesofilos
SIEMBRA	1	Se realiza por cada colonia en cajas de petri grandes

Fuente: El Autor

3.7.1 Siembra. El procedimiento de siembra se desarrollo colocando 0,1ml de la muestra residual con pipeta estéril en el centro de la placa, y se distribuye homogenizando en forma circular, se coloca a incubar por 24 horas a $\pm 37^{\circ}\text{C}$.

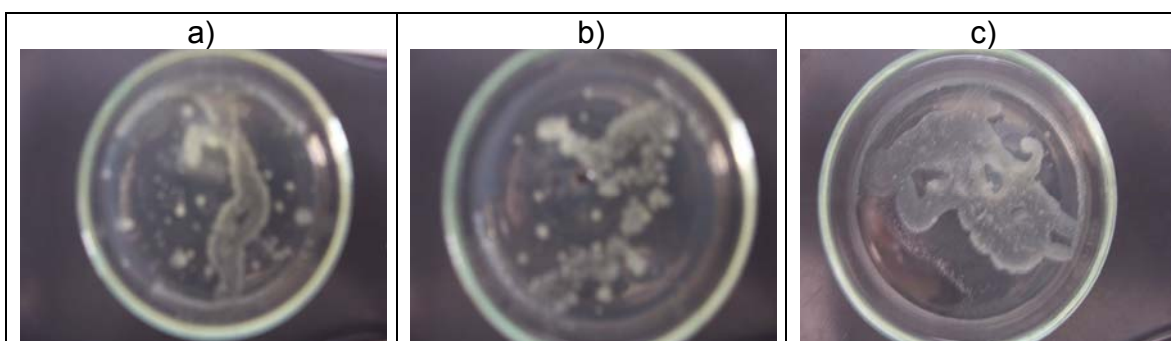
Figura 6. Matrices coliformes utilizadas. a) Muestra 1 tomada del pozo de agua residual de la casona Majavita. b) Muestra 2 tomada del sistema de tratamiento tanque 1 y c) Muestra de materia fecal dilución en agua destilada, desionizada y esteril.



FUENTE: El Autor

En coliformes (Figura 6) las colonias tomadas en la Muestra 1 se presenta crecimiento masivo, en la Muestra 2 se observa una mejor distribución de las colonias, al mirar la muestra fecal es posible diferenciar los dos tipos de coliformes haciendo a esta muestra la mejor para realizar la siembra.

Figura 7. Matrices mesofilos utilizadas. a) Muestra 1 tomada del pozo de agua residual de la casona Majavita. b) Muestra 2 tomada del sistema de tratamiento tanque 1 y c) Muestra de materia fecal dilución en agua destilada, desionizada y estéril.



FUENTE: El Autor

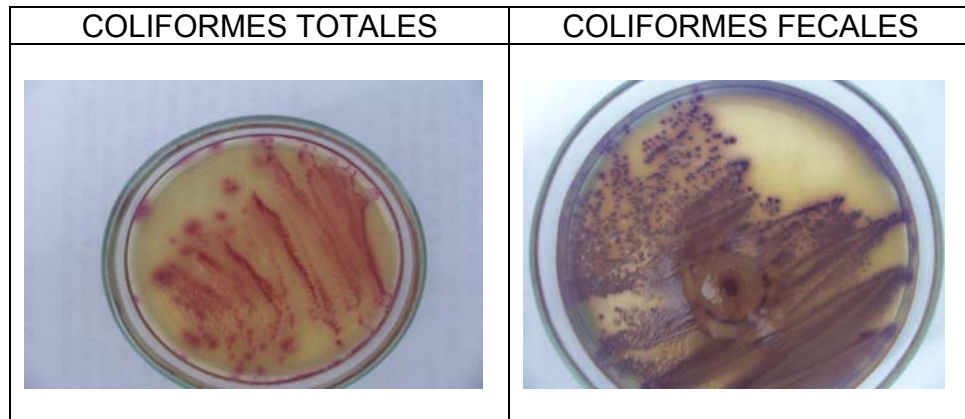
En mesofilos (Figura 7) se observa que la distribución de la muestra no fue homogénea, las colonias que se ven en la Muestra 1 quedaron en su mayoría abultadas pues hubo crecimiento macivo, en la Muestra 2 se observan dos tipos de colonias (blancas y amarillas) se encuentran bien distribuidas y son diferenciables. En la muestra fecal no se logran diferenciar colonias y su color es blanco pues su crecimiento fue masivo.

Se toman en cuenta las colonias de la Muestra 2 ya que para la prueba tanto de coliformes realizando una dilución y mesofilos es la que permite la diferenciación de los dos tipos de colonias a trabajar ya que es donde se encuentran mas separadas en la placa.

3.7.2 Identificación. El procedimiento de identificación contempla la distinción de dos tipos de colonias presentes en el medio de Cultivo. Se toma la siembra inicial

(anteriormente incubada), se toma una colonia representativa (color y forma) y siembra con un asa (estéril con mechero y etanol) para aislar. La siembra se realiza por el método de estría en placa o por agotamiento (Anexo M, Figura 17).

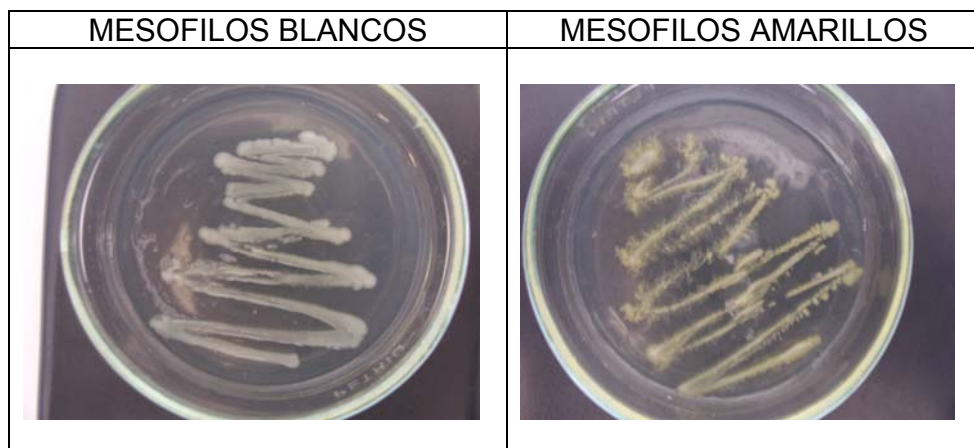
Figura 8. Aislamiento de colonias coliformes de la Muestra 2



Fuente: El Autor

Se logra observar que el aislamiento de las colonias (Figura 8) fue efectivo ya que en cada colonia solo se observa un color.

Figura 9. Aislamiento de colonias mesofilos de la Muestra 2

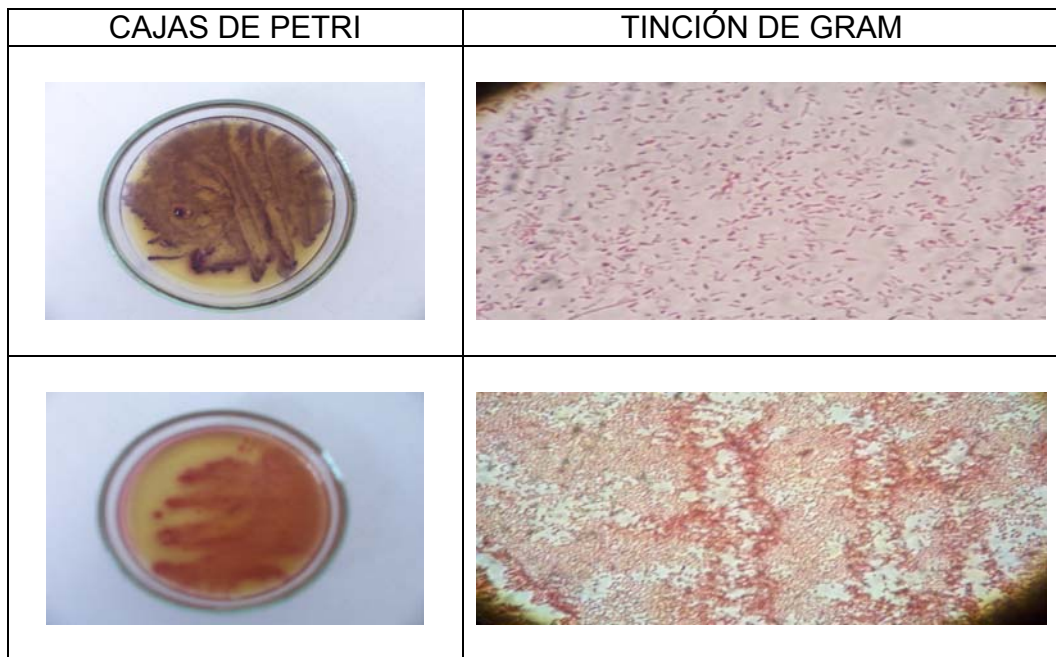


Fuente: El Autor

Se observa el crecimiento de mesófilos en los medios de cultivo (Figura 9).

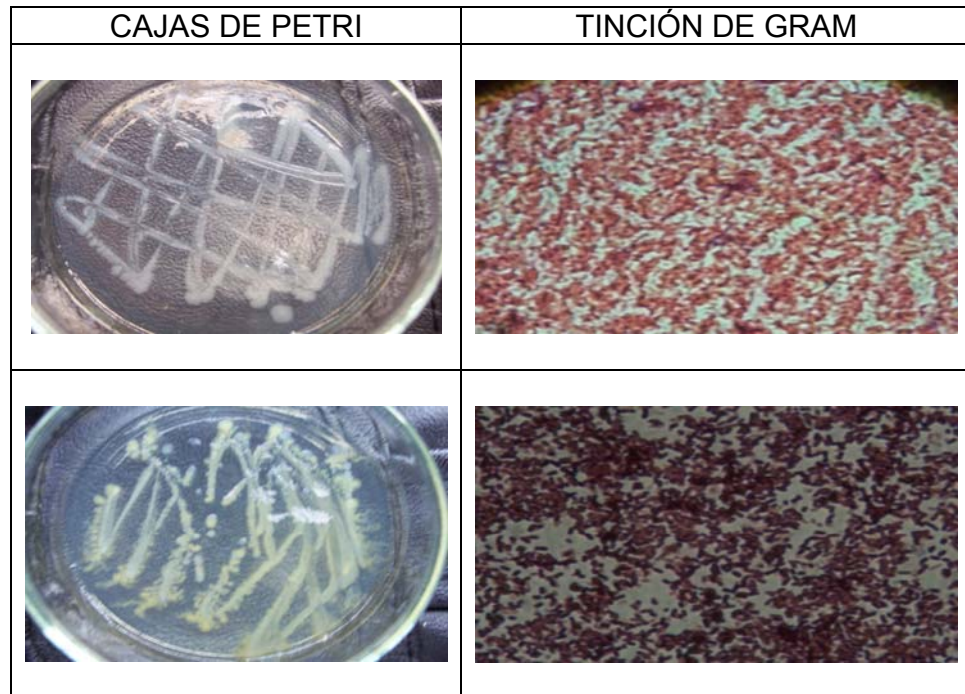
3.7.3 Tinción Gram (Técnica de contraste). Este procedimiento de diferenciación de es empleado en microbiología para la visualización de bacterias, se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

Figura 10. Tinción Gram de coliformes del repique 1 y 2 realizado al aislamiento de la Muestra 2



Fuente: El Autor

Figura 11. Tinción Gram de mesofilos del repique 1 y 2 realizado al aislamiento de la Muestra 2



Fuente: El Autor

Se observa que en las dos tinciones (Figura 10) se presenta un color rojizo característico de las bacterias Gram negativas. Esta prueba de diferenciación permite observar que el medio de cultivo Chromocult para coliformes es selectivo ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. Se presentan bacilos característicos de coliformes.

En las tinciones hechas en la prueba de mesofilos se observa notoriamente la diferencia de color de las colonias evidenciando que para las colonias de mesofilos amarillo la tinción corresponde a bacterias Gram positivas (coloración violeta) mientras que para colonias de mesofilos blanco la tinción es para bacterias Gram negativas (coloración rosa). Se presentan bacilos.

3.7.4 Resultados. Luego de realizar las tinciones se desarrollo la siembra de bacterias Gram positivas (colonias de mesófilos amarillos) en el medio de cultivo de coliformes Chromocult durante 48 horas a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ y no se presento crecimiento de microorganismos, lo que indica que el medio de cultivo es selectivo para las bacterias Gram negativas.

Para mesófilos se realizo la siembra en el medio de cultivo Plate Count de bacterias a temperaturas tanto inferiores (10°C) y superiores (55°C) durante 48 horas y no se observo crecimiento de microorganismos lo que indica que el medio de cultivo es selectivo para bacterias con un rango de crecimiento de $20-45^{\circ}\text{C}$.

4. CONCLUSIONES

Tomando como referencia la incertidumbre se puede notar que el método volumétrico es mas preciso que el colorimétrico y el gravimétrico ya que tanto para la DBO₅ y la DQO el número de decimales que se toman en cuenta para los resultados es de dos (2) mientras que la técnica gravimétrica y la colorimétrica tienen un (1) solo decimal.

Los intervalos alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero son pequeños para todas las validaciones en especial para las técnicas volumétricas lo que hace que el resultado dado por el laboratorio sea más preciso y menos inequívoco al real. Los porcentajes de error dados en todos los estándares y patrones son el mejor indicador de que el Laboratorio de Aguas y Microbiología tiene un rango aceptable para las soluciones.

Los límites de detección instrumental son los más acertados en cuanto a las técnicas utilizadas, ayudan a verificar la eficiencia de los equipos utilizados para concentraciones bajas, indican que el método volumétrico es el mejor y que el gravimétrico y colorimétrico tienen el rango mas reducido.

Chromocult permite solo el crecimiento de bacterias Gram negativas mientras que el medio Plate Count el crecimiento de bacterias de crecimiento en temperaturas entre los 20 a 45°C tanto Gram positivas como Gram negativas

5. RECOMENDACIONES

Para la DBO_5 se debe agitar vigorosamente las botellas una vez se haya fijado el oxígeno (sulfato manganeso + yoduro alcalino) y dejar la decantación doble antes de agregar el ácido sulfúrico. Tomar como referencia el color de la titulación del blanco para el resto de muestras (debe tener la misma coloración)

Para la DQO en el caso en que el termoreactor no se pueda utilizar, es conveniente el aceite en frascos con altura de $\pm 8\text{cm}$ y con celdas que se encuentren bien cerradas por dos (2) horas a $\pm 148^\circ\text{C}$. Titular primero el blanco para tenerlo como referencia para las demás muestras.

En las pruebas gravimétricas se deben utilizar probetas de plástico de 100 ml para cada muestra, revisar la calibración de la balanza diariamente. Las cápsulas y filtros deben secarse en el horno por un periodo no inferior a 1 hora. La toma de muestra se debe realizar en forma de intervalos (mínimo 3) invirtiendo la muestra mínimo 10 veces en 180° y garantizando la homogenización de la muestra, si es necesario utilizar el agitador magnético. Al pasar los 100 ml al embudo se deben realizar los mismos intervalos (mínimo 3) agitando la probeta en forma circular para homogenizar. Realizar el pesaje teniendo en cuenta valor arrojado por la balanza al aparecer en el display la letra "g" (gramos).

BIBLIOGRAFIA

APHA-AWWA-WPCF. (1992). *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid: Diaz de Santos.

CABALLÉ MARTIN, I. (2007). *Gestión de Laboratorio Clínico*. Barcelona: Masson.

CLAVIJO DIAZ, A. (2002). *Fundamentos de la química analítica. Equilibrio iónico y análisis químico*. Santafé de Bogotá: Universidad Nacional.

COLLAZOS PEÑALOZA, H., & DUQUE MUÑOZ, R. (1998). *Residuos Sólidos*. Santafé de Bogotá: ACODAL.

CORTÉS, A., JANETH, A., & SANDINO, C. (2002). *Validación de la prueba de Esterilidad para vacunas viriales preparadas en vehículo oleoso y aucoso*. Bogotá, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana.

DE LA HORRA NAVARRO, J. (2003). *Estadística Aplicada*. Madrid: Diaz de Santos.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN. (1994). *MANUAL METODOLOGICO PARA LA IDENTIFICACION, PREPARACION Y EVALUACION DE PROYECTOS DE AGUA POTABLE Y SANEAMIENTO BASICO*. Santafé de Bogotá.

DHARAN, M. (2002). *Control de Calidad en los laboratorios clínicos*. Barcelona: Reverté.

ENAC. (2002). Guía para la acreditación de laboratorios que realizan Análisis. G-ENAC-04 Rev. 3, 17.

ESTRADA, C. (1999). *Los procesos de validación como herramienta para el control de los riesgos laborales*. Recuperado el 16 de Noviembre de 2009, de <http://www.ibermutuamur.es/El-proceso-de-validación-como.html>

IDEAM (1999) Protocolos de Estandarización de Métodos. Comité de Calidad Analítica. Santafé de Bogotá.

INCONTEC. (2005). *Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones. GTC 51*. Santafé de bogotá : Ministerio de Desarrollo Económico.

ISO 17025. (2005) Requisitos generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración.

- JIMENEZ BELTRAN, D., DE LORA, F., & SETTE RAMALHO, R. (2003). *Tratamiento de aguas residuales*. Barcelona: Reverté.
- LABORATORIO, L. D. M. (2010). *Procedimiento de Validación*. Socorro, Colombia: Universidad Libre Seccional Socorro.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (1998). *Guías para la calidad del agua potable*. Ginebra .
- PASTUAL ANDERSON, M. D., & CALDERÓN Y PASCUAL, V. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas* . Madrid: Diaz de Santos.
- PINEDA M., I. S. (1998). *Manejo y disposición de residuos sólidos urbanos*. Bogotá: ACODAL.
- RODRIGUEZ MELLADO, J. M., & MARIN GALVÍN, R. (1999). *Fisicoquímica de Aguas*. Madrid : Diaz de Santos.
- RODRIGUEZ, R. (2004). *Validación de procesos, Taller de validación OMS*. Recuperado el 21 de Noviembre de 2009, de <http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/bpm-validacion-procesos-fda.ppt>
- SANS FONFRIA, R., & RIBAS, J. D. (1989). *Ingeniería ambiental: Contaminación y tratamientos*. Barcelona: Marcombo.
- STANDARD METHODS (2005) For the Examination of water and Wasterwater. Amercian Public Heath Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. 19th Ed., New York, 1995. American Public Heath Association 1015 Fifteenth Street, NW. Washington, DC
- UNILIBRE, L. (2009). *Manual de Procedimientos de Análisis de Aguas PO-AM-01-MD01*. Socorro, Colombia: Universidad Libre Seccional Socorro.
- VALCARCEL, M., & RIOS, A. (2002). *La calidad en los laboratorios analíticos*. Barcelona: Reverte

ANEXOS

ANEXO A. Estructura de los Planes de Validación.

PLAN DE VALIDACIÓN TÉCNICA _____

1. OBJETIVO: Colocar el objetivo de lo que se busca con la validación, debe ser generalizado y debe llevar incluidas las matrices a utilizarse.

2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

2.1 TÉCNICA: Es un procedimiento que tiene como objetivo obtener un resultado determinado. Las técnicas utilizadas en el laboratorio son las volumetría, colorimetría, argentométrica, potenciométrica, nefelométrica, filtración por membrana, gravimétrica, electrodo, organoléptica y extracción.

2.2 MÉTODO: Debe incluirse el método para la determinación de la prueba, e incluir la referencia bibliográfica del procedimiento entre otros el Estándar Methods.

2.3 MATRIZ: Deben incluirse las matrices de agua a utilizar para la prueba (residual, natural, potable) y el procedimiento existente de toma de muestras del Laboratorio.

2.4 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA: Descripción detallada sobre la técnica a validar, un resumen sobre el proceso y la prueba.

2.5 PROCEDIMIENTO: Contempla las calibraciones, manejo global y cuidados para los equipos a utilizar dentro de la validación. Lleva referenciado el procedimiento de la técnica y su codificación

2.6 EQUIPOS: Datos básicos de cada equipo a utilizarse (nombre, rango de trabajo, temperatura máxima y mínima, capacidad, potencia, voltaje, etc.)

Nota: Referenciar en los anexos los diagramas de flujo del uso de los equipos

2.7 FUNCIONAMIENTO DE EQUIPO: Debe llevar si se debe realizar una calibración previa y cómo se realiza; actividades que deben realizarse siempre para su utilización.

Diagrama del proceso: Diagrama de flujo con el procedimiento resumido de la técnica a validar.

2.8 REACTIVOS: Cuadro donde se incluye: Reactivo con grado de pureza, cantidad, calidad, conservación y precaución. Plan de gestión de Residuos

2.9 MATERIALES: Cuadro con: Material, tolerancia y cantidad por día.

2.10 PROCEDIMIENTO PARA LA DISPOSICIÓN DE RESIDUOS: Debe incluir un resumen de que se hacen los residuos (sólidos y líquidos)

2.11 LIMPIEZA DEL MATERIAL: Debe incluir tanto la limpieza para realizar la validación como la posterior. Protocolos de desinfección

2.12 RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS: Resumen sobre la técnica a validar y referencia del procedimiento interno del Laboratorio

2.13 CURVA DE CALIBRACIÓN (opcional): Se utiliza si algún equipo la necesita, debe explicarse para que equipo es necesario y el rango en el cual se trabaja, así como el patrón primario.

2.14 INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO: Incluye el extremo superior e inferior de detección proveniente de la literatura y la realización de diluciones.

2.15 CAPTURA DE DATOS: Debe referenciarse el o los formatos para la recolección de datos

3. PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN: Una vez revisado que se cuenta con los materiales y reactivos necesarios; y que se han realizado ensayos para determinar el intervalo de trabajo se preparan los patrones.

3.1 PREPARACIÓN DE PATRONES: Se incluye solo el patrón primario para sacar los estándares, debe llevar el nombre, la concentración y una explicación de su preparación

3.2 PREPARACIÓN DE ESTANDARES: Se deben incluir siempre los tres estándares: Alto, medio y bajo. Debe llevar el nombre, la concentración y una explicación de su preparación a partir del patrón primario.

3.3 MATRICES: Incluye las matrices que fueron expuestas en el principio del procedimiento, así como el blanco para la muestra (en muchos casos agua destilada y desionizada)

3.4 ADICIONES Y DILUCIONES: Debe llevar el nombre, la concentración y el porcentaje de referencia y una explicación de su preparación a partir del patrón primario y la adición de muestras.

4. PROCEDIMIENTO DE ESTANDARIZACIÓN (VALIDACIÓN)

4.1 PARTE EXPERIMENTAL: Organigrama por días de la validación, incluye las pruebas y duplicados por día.

4.2 PLAN BASICO: Se referencia el rango de trabajo

1. BK (Blanco de reactivos y procedimiento)
2. E.b (Estándar de concentración baja; 20 % del intervalo)
3. E.m (Estándar de concentración media; aprox. El 50% del intervalo)
4. E.a (Estándar de concentración alta; aprox. El 90% del intervalo)
5. M1 (Muestra natural para ver efectos de la matriz real, concentración <50% del rango)
6. M2 (Muestra natural para ver efectos de la matriz real, concentración >>M1)
7. M1A.b (M1 adicionada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M1)
8. M1A.a (M1 adicionada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1)
9. Mc (Muestra o estándar certificado). Se sugiere utilizarlo en el último o los dos últimos ensayos.
10. Dilución (La concentración se escoge según el intervalo de trabajo)

4.3 CÁLCULO DE ADICIÓN Y DILUCIÓN: Se deben incluir los cálculos, hallando los factores de dilución o adición y luego la alícuota a tomarse de cada muestra y patrón.

5. CÁLCULOS DE RESULTADOS: Se deben numerar las técnicas y escribir las fórmulas para hallar cada parámetro.

6. RESPONSABLES: Jefe del Laboratorio, Elaboración del protocolo (nombre de la persona) y Estandarización de la técnica (nombre del laboratorista).

7. FECHAS PROGRAMADAS: Fecha dentro de la cual se va a realizar la validación

8. BIBLIOGRAFIA: Incluir todas las referencias para el proceso de validación

9. ANEXOS: Anexos de los diagramas de flujo de los equipos, entre otros necesarios para cada proceso de validación.

Fuente: Laboratorio de Aguas y Microbiología

ANEXO B. Prueba t de Student.

Prueba t de Student para rechazo Valores Críticos t para rechazo de datos

n	95%	n	95%	n	95%
3	1,15	14	2,37	25	2,66
4	1,46	15	2,41	26	2,67
5	1,67	16	2,44	27	2,69
6	1,82	17	2,47	28	2,71
7	1,94	18	2,50	29	2,72
8	2,03	19	2,53	30	2,74
9	2,11	20	2,56	40	2,87
10	2,18	21	2,58	50	2,96
11	2,24	22	2,60	60	3,03
12	2,29	23	2,62	100	3,21
13	2,33	24	2,64		

FUENTE: Protocolo de Estandarización de Métodos Analíticos. IDEAM

Distribución t de Student para LDM
Valores para calcular LDM al 99%

GL	99%	GL	99%	GL	99%	GL	99%
1	31,82	11	2,72	21	2,52	40	2,42
2	6,96	12	2,68	22	2,51	50	2,40
3	4,54	13	2,65	23	2,5	60	2,39
4	3,75	14	2,62	24	2,49	70	2,38
5	3,36	15	2,60	25	2,48	80	2,37
6	3,14	16	2,58	26	2,48	90	2,37
7	3,00	17	2,57	27	2,47	100	2,36
8	2,90	18	2,55	28	2,47	∞	2,33
9	2,82	19	2,54	29	2,46		
10	2,76	20	2,53	30	2,46		

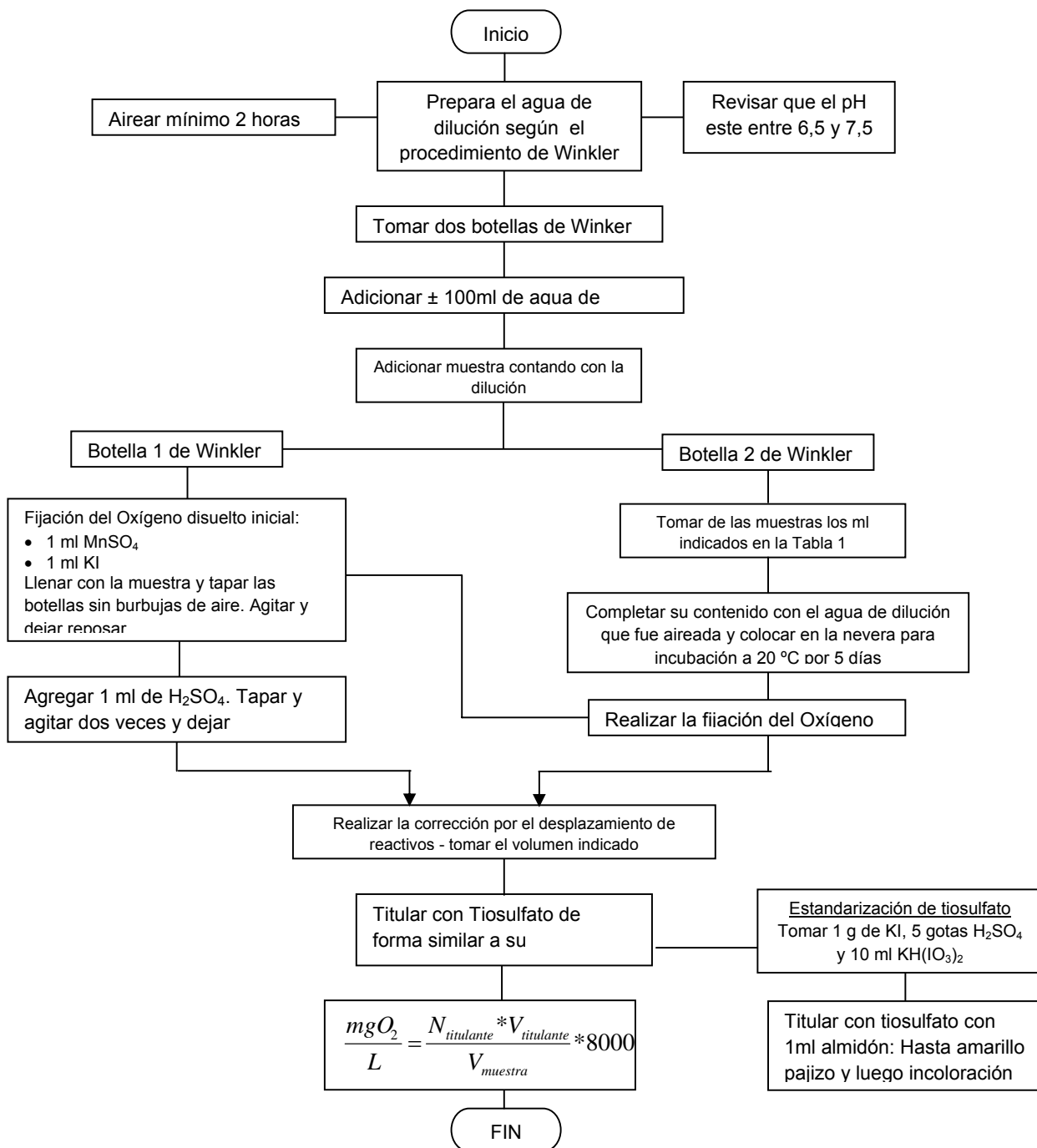
FUENTE: Protocolo de Estandarización de
Métodos Analíticos. IDEAM

Prueba t de Student para precisión Valores de la distribución t para precisión 95%

GL	95%	GL	95%	GL	95%	GL	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	∞	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2,12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2,31	18	2,1	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

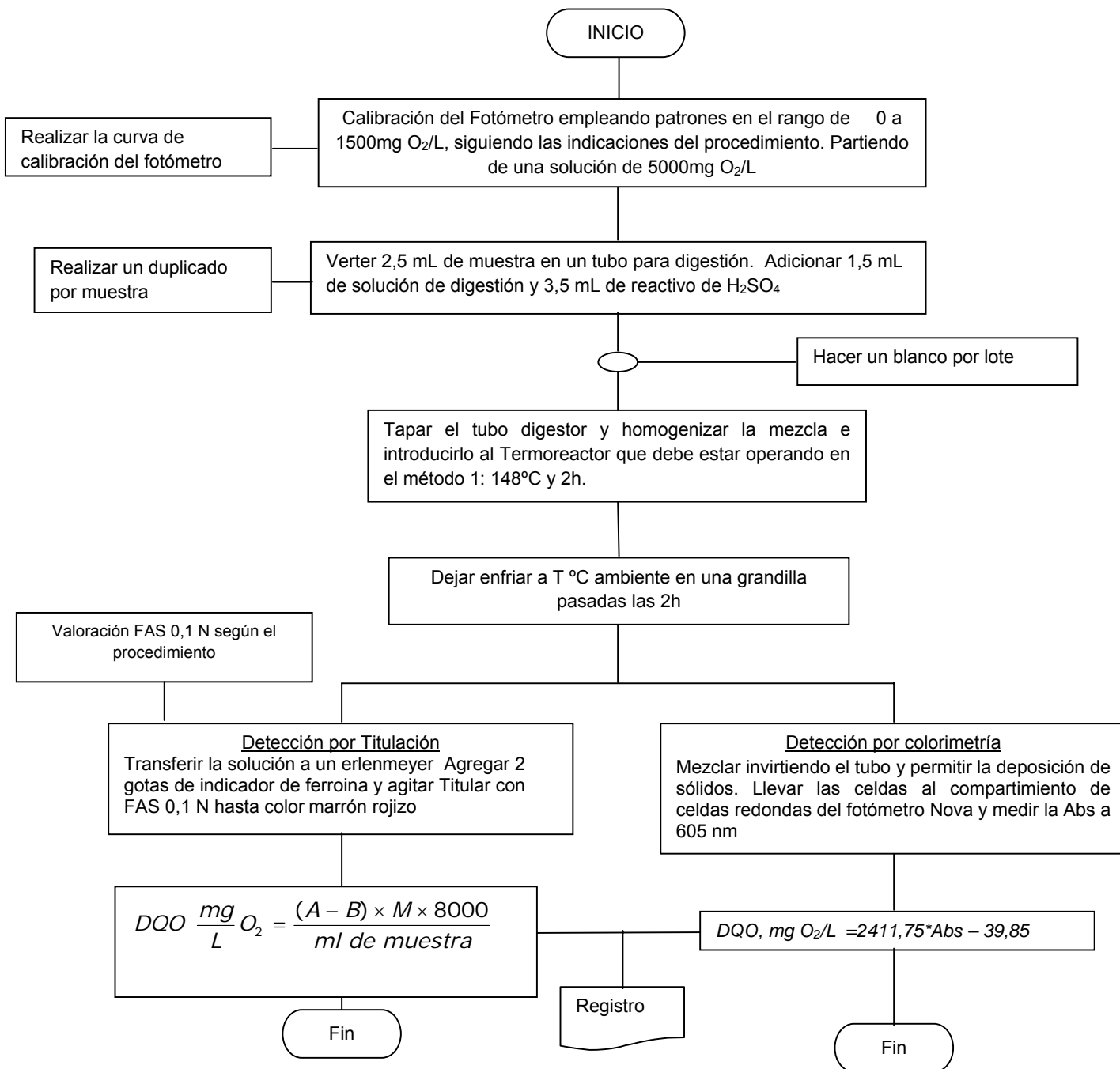
FUENTE: Protocolo de Estandarización de
Métodos Analíticos. IDEAM

ANEXO C. Diagrama de Flujo del Procedimiento de DBO₅ Winkler



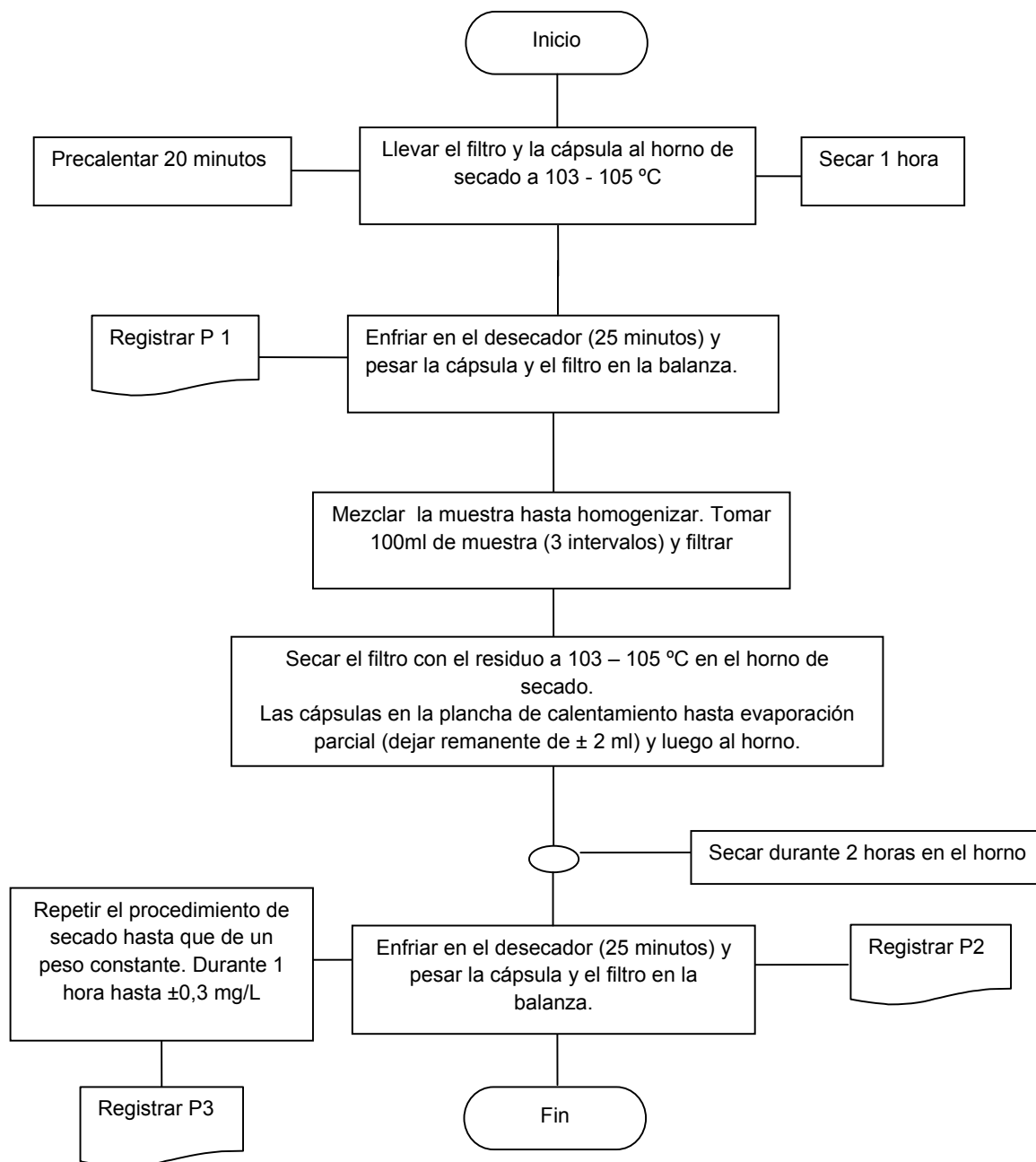
FUENTE: El Autor, Standard Methods

ANEXO D. Diagrama de Flujo del Procedimiento de DQO



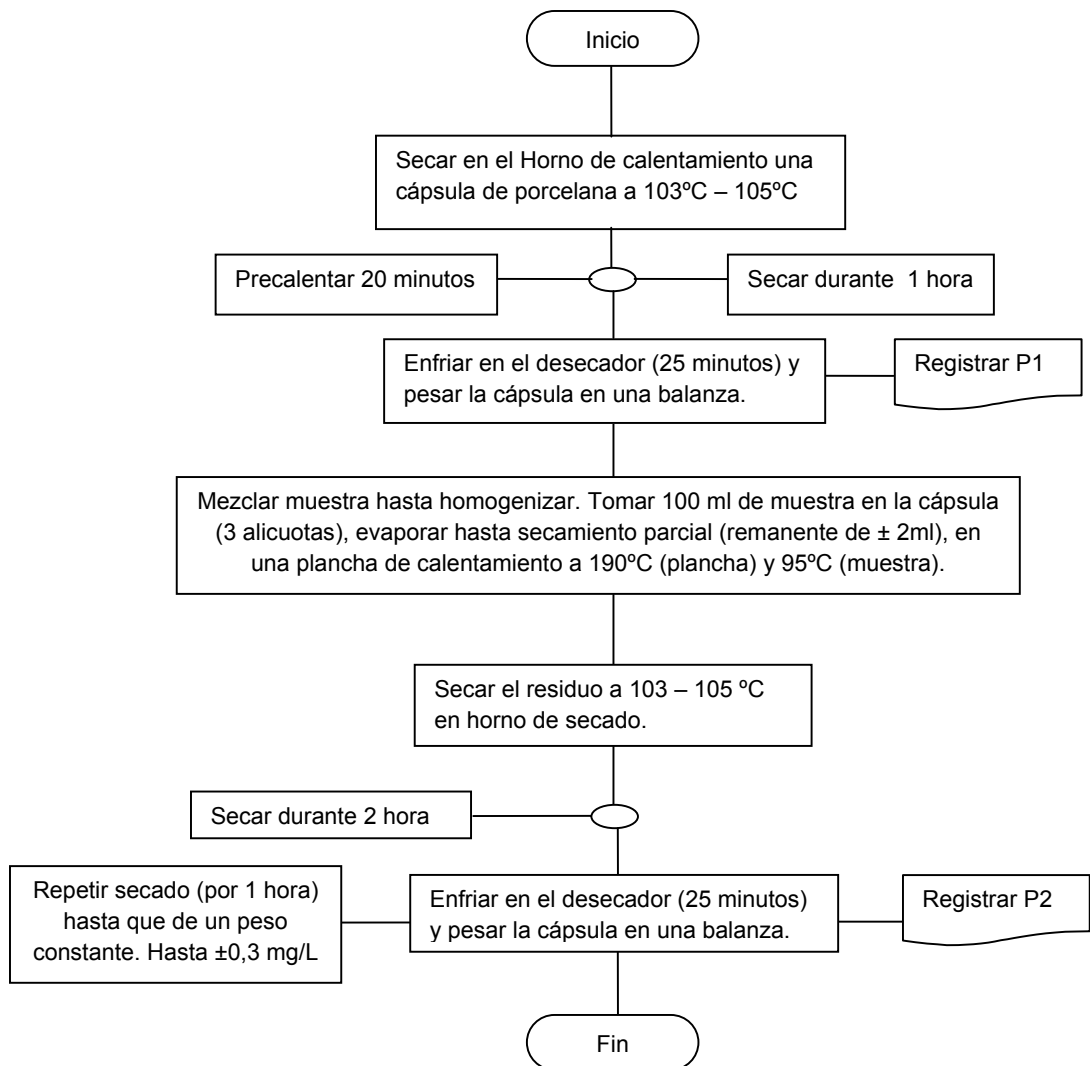
FUENTE: Laboratorio de Aguas y Microbiología UNILIBRE, Standard Methods

ANEXO E. Diagrama de Flujo del Procedimiento para Sólidos Suspendidos y Sólidos Disueltos




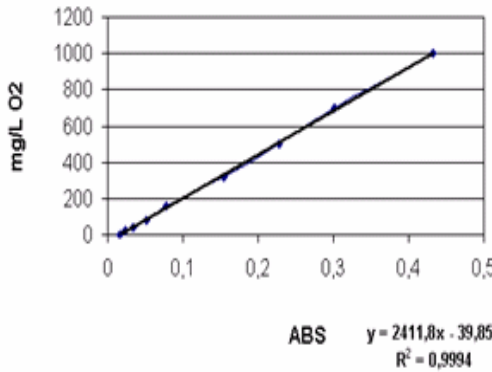
FUENTE: El Autor, Standard Methods

ANEXO F. Diagrama de Flujo del Procedimiento de Sólidos Totales



FUENTE: Laboratorio de Aguas y Microbiología UNILIBRE, Standard Methods

ANEXO G. Curva de Calibración de colorimetría para DQO tomada como referencia en la validación

		LABORATORIO DE AGUAS Y MICROBIOLOGÍA			CURVAS DE CALIBRACIÓN	PO-AM-01-P01-F23
DQO						
			Fecha	19/02/2010	CURVA DE CALIBRACIÓN (Colorimétrica) DQO 0-1100	
Patrón	Conc. Teórica	Conc. Experi	Abs	% Recuperación		
Blanco	0		0,016			
1	20	18	0,024	90		
2	40	42,1	0,034	105		
3	80	83,1	0,051	104		
4	160	148,3	0,078	93		
5	320	331,6	0,154	104		
6	500	510	0,228	102		
7	700	686,1	0,301	98		
8	1000	1002	0,432	100		
9	3000	1221,5	0,523	41		
					ABS $y = 2411,8x - 39,854$ $R^2 = 0,9994$	
			Pendiente	2411,751	(mg/L O ₂)/Abs	
			Intersección	-39,8542	mg/L O ₂	
			R2	0,999406	Correlación	
OBSERVACIONES						
Se realizó utilizando aceite a 148°C para lograr la digestión por dos horas ya que el <u>Termoreactor</u> no esta en funcionamiento.						
REALIZO					APROBO	

Fuente: El Autor

ANEXO H. Tablas de dilución para DBO₅ tomadas en cuenta para la Validación

Tabla 7. Dilución para DBO₅ según el volumen de las Botellas para Winkler

TÉCNICA DE DILUCIÓN

TIPO DE MUESTRA	% DE DILUCIÓN	* ml A TOMAR
Desechos Industriales Concentrados	0 - 1	0 - 3
Aguas residuales crudas y sedimentadas	1 - 5	3 - 15
Efluentes tratados biológicamente	5 - 25	15 - 75
Aguas fluviales contaminadas	25 - 100	75 - 300

* Tomando como referencia que las botellas sean de 300 ml

FUENTE: El Autor, IDEAM

Tabla 8. Dilución de DBO₅ según la DBO esperada para Winkler

DILUCIÓN POR DBO₅ ESPERADA

DBO₅ ESPERADA (mg/L)	Volumen de muestra (ml)
0 - 40	40 - 25
0 - 80	25 - 10
0 - 160	10 - 5
0 - 300	5 - 2
0 - 1000	2 - 1
0 - 2000	1 - 0,4

FUENTE: El Autor

ANEXO I. Descripción del Procedimiento de DBO₅ durante la Validación

La descripción siguiente corresponde al procedimiento de Validación desarrollado para un total de 123 pruebas con dos matrices (agua natural y agua residual), dos añadidos, una dilución y 8 pruebas para la Muestra Certificada; además se pasaron 3 pruebas de dilución, el número bajo de las diluciones se debió a que esta muestra fue incorporada al finalizar la validación.

- Se coloca desde el día anterior a la prueba a oxigenar (motores de pecera) el agua para la dilución (agua destilada).
- Se tomaron las botellas de Winkler (± 300 ml) de manera tal que el duplicado (para hallar el oxígeno disuelto inicial) sean de volumen igual o semejante.
- Se añaden los nutrientes (1 ml de nutriente por 1 L de agua) y la siembra (3 ml de siembra por 1L de agua o de manera tal que se aseguren 1 o 2 mg/L O₂ de consumo) al agua de dilución antes de la prueba, se le revisó que el pH se encuentre entre 6,5 – 7,5.
- Se agrega a cada botella por tanda ± 100 ml de agua de dilución y posteriormente las alícuotas de las muestras siguiendo el cuadro en el ANEXO H. Se completa el volumen de cada botella con agua de dilución y se tapan.
- Se rotulan (con marcador permanente) las botellas (nombre de muestra y ml utilizados) por duplicado y se toma una de cada muestra y se lleva a la nevera por 5 días a $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (a la botella del blanco se le escribe la hora para asegurar que se cumplan los 5 días), no se les saca el exceso de agua.
- A las botellas restantes (una de cada muestra pasados los 5 días de incubación) se les saca el excedente de agua y se les fija el oxígeno. Se toma con un gotero 1 ml de sulfato manganeso y se le añade a la botella por el cuello, posteriormente se le agrega 1 ml de yoduro alcalino de forma similar. Las muestras toman un color naranja. Procurar que en ningún momento los goteros tengan contacto con la muestra ni entre si.

- Se tapan las botellas y se les saca el exceso y se homogeniza, se deja sedimentar por ± 5 minutos o hasta la decantación total de las muestras, transcurrido el tiempo se vuelve a homogenizar y se deja sedimentar por el mismo tiempo. Se les agrega 1 ml de ácido sulfúrico concentrado con un gotero por el cuello. Se homogeniza.
- Se toma el volumen indicado según el desplazamiento por los reactivos (siguiente fórmula) en una probeta y se transfieren a vasos de ± 250 ml.

$$ml_{muestra} = \frac{100 \times V_{botella}}{V_{botella} - 2}$$

- Se realiza la valoración del titulante por duplicado tomando 1g de KI en un balón de 100 ml, se agregan ± 20 ml de agua destilada y desionizada y unas gotas de ácido sulfúrico concentrado, medir 10 ml de biyodato de potasio 0,025N y se completa el volumen con agua destilada y desionizada. Se titula con el tiosulfato en presencia de 1 ml de almidón (medido con gotero) desde azul hasta la desaparición total de color. Se registra en el formato de Valoración de Soluciones PO-AM-P01-F17

- Para determinar el OD (Oxígeno Disuelto) se titulan las muestras en presencia de almidón, si se pasa el punto final se toma un volumen medido de muestra y se vuelve a titular. El OD se calcula:

$$\frac{mgO_2}{L} = \frac{N_{titulante} \times V_{titulante}}{V_{muestra}} * 8000$$

- Al finalizar los 5 días se sacan de la nevera las muestras, se fija su oxígeno y se titulan de forma similar a la descrita anteriormente. Se realizan los cálculos pertinentes y se diligencian los formatos.

FUENTE: El Autor

ANEXO J. Descripción del Procedimiento de DQO durante la Validación

El procedimiento descrito a continuación corresponde a 134 pruebas con dos matrices (agua natural y agua residual), dos añadidos, una dilución y se pasaron 8 pruebas para la Muestra Certificada utilizando la curva de calibración Anexo G.

- Colocar a calentar el aceite a $\pm 148^{\circ}\text{C}$ en la plancha de calentamiento en frascos de vidrio de altura $\pm 8\text{cm}$ para evitar derrames
- Tomar 2,5 ml de muestra y 1,5 ml de Dicromato de Potasio con la transferpipeta
- Dosificar 3,5 ml de ácido sulfúrico con el dispensador orgánico (tener cuidado ya que la reacción es exotérmica y las celdas se calientan rápidamente).
- Tapar bien las celdas (las tapas de plástico deben estar marcadas), homogenizar la mezcla y colocarlas en los frascos de vidrio con aceite y realizar la digestión a $\pm 148^{\circ}\text{C}$ por 2 horas.
- Sacar las celdas del aceite y esperar a que alcancen la temperatura ambiente, lavarlas y sacarles el aceite que se haya adherido a las paredes de las celdas (genera interferencias en el fotómetro).
- Agitar la muestra y esperar la precipitación, proceder a leer en el fotómetro a una absorbancia de 605nm, no se tuvo en cuenta que el fotómetro cuenta con la curva de calibración (método 032) ya que la curva que tiene corresponde a una desarrollada anteriormente con el termoreactor. Siempre se debe hacer una curva nueva en las validaciones
- Transferir la muestra completamente después de realizar la lectura a vasos de vidrio pequeño con ayuda de agua destilada y desionizada

- Realizar la estandarización del FAS como se indica en el procedimiento, se espera que la muestra alcance la temperatura ambiente y se titula en presencia de 2-3 gotas de Ferroina con FAS por duplicado.
- Titular las muestras tomando como referencia el Blanco (color de cambio) las muestras pasan de un color verdoso a un rojo paja.

FUENTE: El Autor

ANEXO K. Descripción del Procedimiento de Sólidos Suspendidos y Sólidos Disueltos tomado para la Validación

Se realizaron 116 pruebas con dos matrices (agua natural y agua residual), dos añadidos y una muestra certificada suministrada por el IDEAM, cumpliendo con el Plan de validación, en la validación sólo se pasaron 4 pruebas para la Muestra Certificada. La descripción del procedimiento es la siguiente:

- Se llevan las cápsulas y los papeles filtro en el horno de calentamiento por alrededor de 1 hora para luego de pasar por el desecador obtenerlos con peso constante. Las muestras son sacadas de la nevera para esperar que alcancen la temperatura ambiente.
- Se revisa que el equipo de filtración este completo y que la bomba tenga el nivel de aceite indicado.
- Se toman las alícuotas de las muestras siguiendo el procedimiento suministrado por el IDEAM para la valoración de sólidos haciendo una mezcla homogénea invirtiendo la muestra unas 10 veces en 180° y se tomó una alícuota de ± 30 ml y se realizó el mismo procedimiento hasta completar la muestra en la probeta (plástica) de 100 ml.
- Se coloca a calentar la plancha de calentamiento a $\pm 190^{\circ}\text{C}$ (diez minutos antes) y el horno de secado a 103°C o 105°C (con 20 minutos de anticipación) para que al depositar la muestra tuviera una temperatura cercana a la valida en el procedimiento.
- Se pesan las cápsulas y los filtros cuando estaban a temperatura ambiente. Se tomaron en cuenta los pesos inmediatos suministrados por la balanza al arrojar en el display la letra "g". Las cápsulas utilizadas para Sólidos Suspendidos también son pesadas (a veces el filtro se pega a las cápsulas).
- Se depositan los filtros en la zona de filtrado con ayuda de la pinza y los 100 ml de muestra en el embudo de forma similar a la toma de la alícuota, se filtro hasta que no caen gotas al Erlenmeyer, se realizan enjuagues de las paredes del

embudo con agua destilada y desionizada para evitar la pérdida de la muestra y se continua con la filtración por 1 o 2 minutos.

- Se destapa el embudo quitando de la parte superior los cauchos para liberar la presión existente y se tiene cuidado al girar el embudo (girar siempre ejerciendo presión hacia arriba) para evitar que se pierda muestra o que se pegue el filtro. El líquido filtrante se deposita en las cápsulas de porcelana y se enjuaga el Erlenmeyer para no desperdiciar muestra.
- Se pasan los filtros al horno de secado (deben moverse a los 5 minutos de puestos en el Horno para evitar que se peguen a las cápsulas), las cápsulas se pasan a la Plancha de Calentamiento hasta alcanzar unos 2 ml de muestra inicial a una temperatura de $\pm 190^{\circ}\text{C}$ por alrededor de 2 horas, se pasan las cápsulas al horno de secado.
- Se dejan en el horno por dos horas (tanto los filtros como las cápsulas), se pasan al desecador y se pesan teniendo en cuenta las recomendaciones del pesaje inicial.
- Se repite el procedimiento del horno de secado una o dos veces de manera tal que el peso obtenido sea constante o fluctúe por no mas de 0,0003 g que para la validación y tomando como referencia que se utilizan 100 ml de muestra serían 3 mg/L de Sólidos.
- Se lavan las cápsulas y se colocan a secar para continuar con la validación. El sistema de filtración (embudo y erlenmeyer) se enjuagan con agua destilada y desionizada entre muestras de la misma tanda y siguiendo el procedimiento de limpieza entre tanda y tanda.

FUENTE: El Autor

ANEXO L. Descripción del Procedimiento de Sólidos Totales tomado en la Validación

Para sólidos totales se realizaron 131 pruebas con dos matrices (agua natural y agua residual), dos añadidos y una muestra certificada suministrada por el IDEAM, el Plan de validación tenía 126 pruebas (7 tandas para 9 muestras), en la validación solo se pasaron tres (3) pruebas para la Muestra Certificada dando un total de 115 pruebas. Y el procedimiento es el siguiente:

- Se llevan las cápsulas en el horno de calentamiento (precalentado 20 minutos) por alrededor de 1 hora para luego de pasar por el desecador obtenerlas con peso constante (a partir de la segunda tanda de pruebas). Las muestras son sacadas del horno y llevadas al desecador (por ± 25 minutos) para esperar que alcancen la temperatura ambiente.
- Se toman las alícuotas de las muestras siguiendo el procedimiento suministrado por el IDEAM para la valoración de sólidos haciendo una mezcla homogénea invirtiendo la muestra unas 10 veces en 180° y se tomó una alícuota de ± 30 ml ($\pm 1/3$ de la necesaria), se invirtió nuevamente 10 veces (en 180°) y se depositó en intervalos semejantes el resto de la muestra a la probeta (plástica) de 100 ml.
- Se coloca a calentar la plancha de calentamiento a $\pm 190^\circ\text{C}$ (para que al depositar la muestra tuviera una temperatura cercana a la válida en el procedimiento) 10 minutos antes de su utilización
- Se pesan las cápsulas cuando estaban a temperatura ambiente. (Se tomaron en cuenta tanto los pesos inmediatos suministrados por la balanza como los obtenidos hasta esperar que se estabilizara su valor), el pesaje óptimo es el que se tiene apenas la balanza arroja en el display la letra "g".
- Se depositan los 100 ml de muestra en cada cápsula de forma similar a la toma de la alícuota y se dejó evaporar la muestra hasta alcanzar unos 2 ml de muestra inicial a una temperatura de $\pm 190^\circ\text{C}$ por alrededor de 2 horas.
- Se pasan las cápsulas al horno de secado previamente puesto a calentar (20 minutos) a $103^\circ\text{C} - 105^\circ\text{C}$ y se dejaron allí por las dos horas, se pasaron al

deseCADOR y se pesaron teniendo en cuenta las recomendaciones del pesaje inicial.

- Se repite el procedimiento del horno de secado (durante 1 hora) una o dos veces de manera tal que el peso obtenido sea constante o fluctúe por no más de 0,0003 g que para la validación y tomando como referencia que se utilizan 100 ml de muestra serían 3 mg de Sólidos.
- Se lavan las cápsulas y se colocan a secar para continuar con la validación.

FUENTE: El Autor

ANEXO M. Descripción del Procedimiento de Identificación Microbiológica

- **SIEMBRA POR AGOTAMIENTO**

Es el método más fácil y el más usado para obtener cultivos axénicos (Figura 17). Para ello, con un asa de siembra se toma una muestra de la población mixta y a continuación se hacen estrías sobre la superficie de un medio sólido preparado en una placa Petri. Conforme se van haciendo estrías en zigzag con el asa, cada vez se van depositando en la superficie del medio menos microorganismos. A continuación, se flamea el asa (en el mechero), se toca en la región donde se han realizado las últimas estrías y se continúa la siembra con la misma técnica, en la superficie de medio sin sembrar aún. Repitiendo este proceso varias veces se logra separar células individuales.

A continuación, las placas se incuban por un día a 37°C, permitiendo que las células aisladas experimenten un número suficiente de divisiones para formar colonias visibles. Para asegurar que se ha obtenido un cultivo puro o axénico, es conveniente repetir el procedimiento a partir de una colonia bien aislada en la primera placa. Las colonias que se desarrollen la segunda y tercera vez, serán, casi con toda seguridad, cultivos axénicos.

Para el medio de Chromocult se toman en cuenta tres tipos de colonias todas Gram negativas:

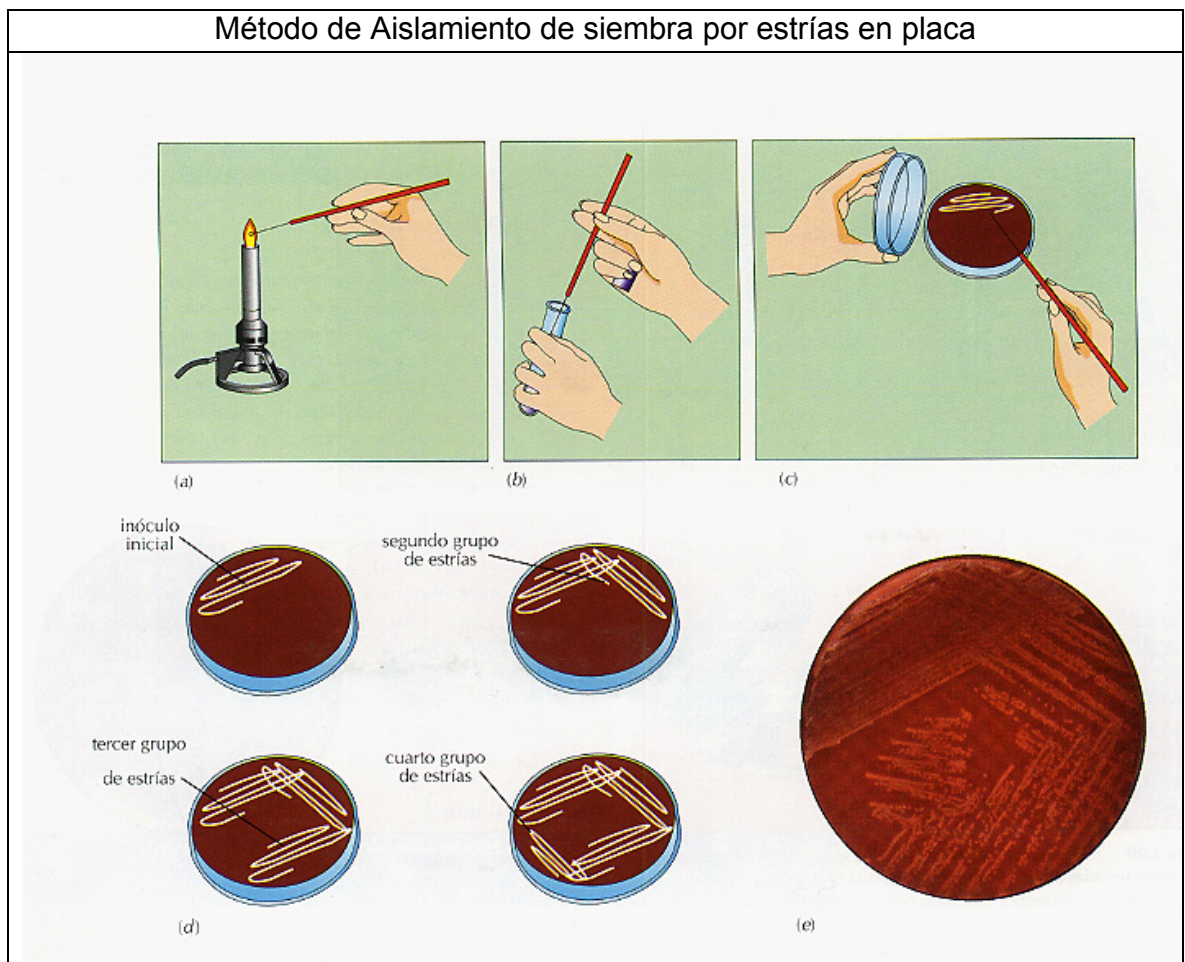
1. Coliformes Fecales de color azul o violeta (*Escherichia coli* ATCC de color azul oscuro o violeta, *Escherichia coli* DSMZ de color azul o violeta)
2. Coliformes Totales de color rojo o salmon (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*)
3. Coliformes Totales incoloras o amarillas (*Salmonella enteritidis*)

Para el medio de Plate Count se toman en cuenta dos tipos de colonias:

1. Mesofilos de color blanco (*Escherichia coli* ATCC Gram negativo)

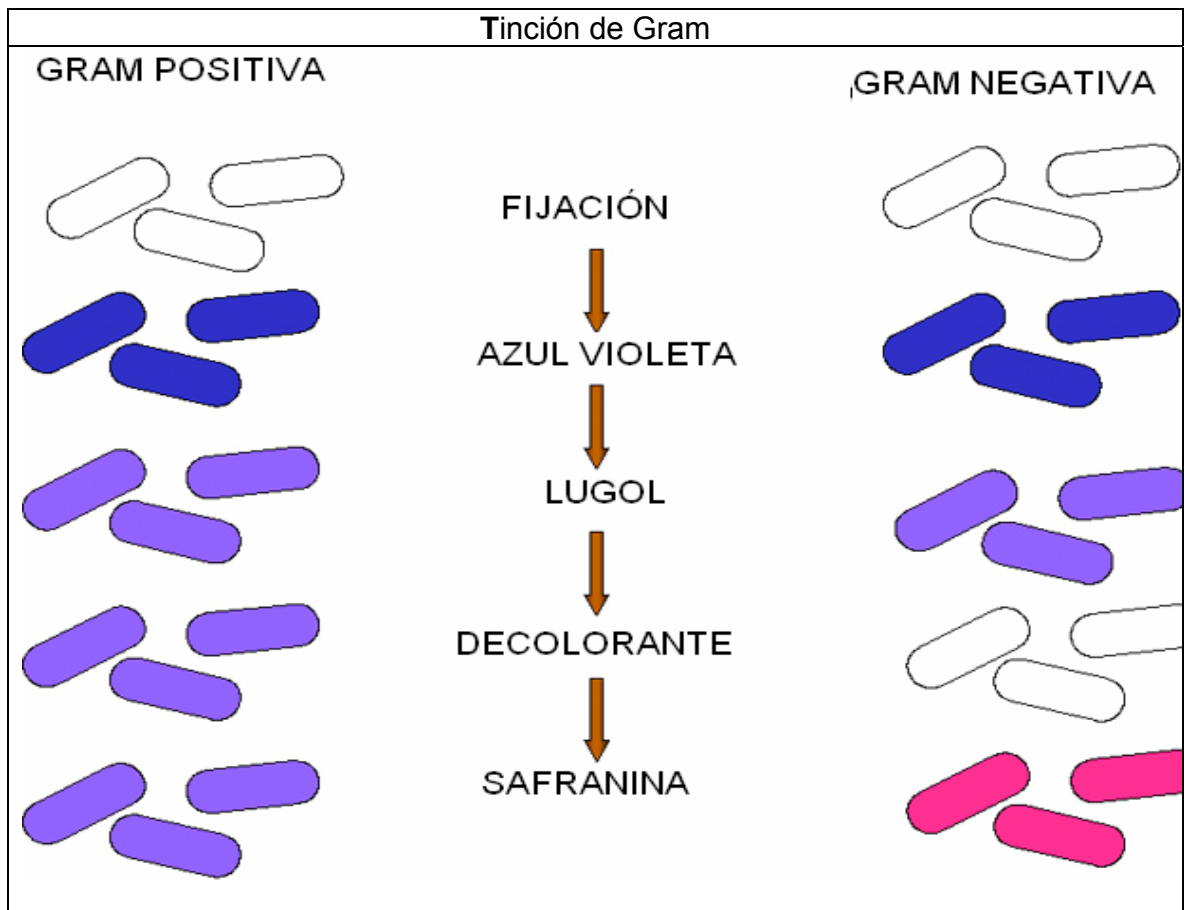
2. Mesofilos de color amarillo (*Staphylococcus aureus* Gram positivo)

Los datos anteriores de los microorganismos son tomados de las fichas técnicas suministradas por Merck de los medios de cultivo.



Fuente: IDEAM

- REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN GRAM



Fuente: Bernier

El procedimiento de Tinción se debe realizar:

- Se debe encender el mechero y esterilizar la aza bacteriológica
- En una lámina portaobjeto, colocar una gota de agua estéril o solución salina
- Con una aza bacteriológica una gota de la muestra asignada (si la muestra es líquida, se debe utilizar aza de argolla y si proviene de cultivo sólido, aza de punta). El extendido debe hacerse en forma ovoide, de las muestras provenientes de medios sólidos, debe hacerse delgado y si es del líquido mezclar muy bien y colocar una pequeña gota.
- Marcar la lámina y dejar secar. Fijar al calor

- Añadir una gota de azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 minuto. Todas las células Gram positivas y Gram negativas se tiñen de color azul-purpura.
- Enjuagar con agua.
- Agregar Lugol y esperar 1 minuto
- Enjuagar con agua.
- Agregar decolorante y esperar 30 segundos
- Enjuagar con agua.
- Agregar una gota de safranina o fucsina básica y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.

Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión. Al terminar las bacterias Gram positivas se verán azul-violáceas y las Gram negativas, se verán rosas o rojas.

- INTERVALO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO:

Se trabajó solo con dos tipos de células (Gram positivas y Gram negativas) para las prueba de diferenciación e identificación. En coliformes solo se puede tener en cuenta las coliformes totales y fecales. En mesófilos se realiza la distinción de mesófilos Gram positivos y mesófilos Gram negativos.

- PARTE EXPERIMENTAL O DE MEDICIONES

Se realizaron 40 pruebas con dos matrices (agua residual y dilución de muestra fecal) y se realizaron 38 tinciones de Gram. La prevalidación por el método gravimétrico se realizó en 6 días.

- PLAN BÁSICO

- a) M1 (Muestra de agua residual de la casona Majavita)

- b) M2 (Muestra de agua residual del sistema de tratamiento tanque 1)
- c) Mf (Muestra de materia fecal diluida en agua destilada, desionizada y esterilizada)
- d) Cf M2 (Colifórmes fecales de la Muestra 2)
- e) Ct M2 (Colifórmes Totales de la Muestra 2)
- f) Cf Mf (Colifórmes fecales de la Muestra fecal)
- g) Ct Mf (Colifórmes totales de la Muestra fecal)
- h) Ms M1 (Mesófilos de la Muestra 1)
- i) Ms M2 (Mesófilos de la Muestra 2)
- j) Ms M2 B (Mesófilos de la Muestra 2 blanco)
- k) Ms M2 A (mesófilos de la Muestra 2 amarillo)

FUENTE: El Autor

ANEXO N. Resultados de las Validaciones y de la Prevalidación

Resumen de Validación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno
CUADRO PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO
NOMBRE DEL MÉTODO: Determinación de DBO ₅ por el método yodométrico
CÓDIGO DEL PROCEDIMIENTO: SO-GS-05-P-08
FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN: 10 de marzo de 2010

PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACIÓN
DECIMALES	2	NA	Dado por la incertidumbre
INCERTIDUMBRE	0,06	mg/L O ₂	Corresponde a una incertidumbre combinada
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,17	mg/L O ₂	Corresponde al límite de detección del método
	0,86	mg/L O ₂	Corresponde al límite de cuantificación de la práctica
PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE %CV	6,93	%	Estándar Bajo 20 mg/L O ₂
	4,04	%	Estándar Medio 200 mg/L O ₂
	3,71	%	Estándar Alto 2.000 mg/L O ₂
	1,45	%	Dilución de 20.000 mg/L O ₂
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	0,98	%	Estándar Bajo 20 mg/L O ₂
	1,27	%	Estándar Medio 200 mg/L O ₂
	2,24	%	Estándar Alto 2.000 mg/L O ₂
	1,01	%	Dilución de 20.000 mg/L O ₂
RANGO DE TRABAJO	0,17 – 20.129,00	mg/L O ₂	Tiene en cuenta la dilución aceptable 1:10
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	0,86 - 20.000,00	mg/L O ₂	Tiene en cuenta la dilución aceptable 1:10
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	96,38	%	M1 Añadido de 12 mg/L O ₂
	96,80	%	M2 Añadido de 7 mg/L O ₂

FUENTE: El Autor

Resumen de Validación de la Demanda Química de Oxígeno

CUADRO PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

NOMBRE DEL MÉTODO: Determinación de la Demanda Química de Oxígeno DQO

CÓDIGO DEL PROCEDIMIENTO: SO-GS-05-P-09

FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN: 12 de marzo de 2010

PARÁMETRO	Colorimetría	Volumetría	Unidad	OBSERVACIÓN
DECIMALES	1	2	-	Dado por la incertidumbre
INCERTIDUMBRE	0,5	0,05	mg/L	De una incertidumbre tipo A del método y combinada para la validación
LÍMITE DE DETECCIÓN	5,0	0,54	mg/L	Corresponde al límite de detección del método y el de la validación
	25,2	2,71	mg/L	Corresponde al límite de cuantificación de la práctica
PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE %CV	4,9	7,03	%	Estándar Bajo 65 mg/L O ₂
	0,7	0,61	%	Estándar Medio 560 mg/L O ₂
	0,9	1,17	%	Estándar Alto 980 mg/L O ₂
	1,7	0,66	%	Dilución 1:10 (5.000 mg/L O ₂)
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	2,3	0,73	%	Estándar Bajo 65 mg/L O ₂
	0,2	0,25	%	Estándar Medio 560 mg/L O ₂
	0,1	0,30	%	Estándar Alto 980 mg/L O ₂
	1,1	0,11	%	Dilución 1:10 (5.000 mg/L O ₂)
RANGO DE TRABAJO	5,0 – 5.172,6	0,54 – 5.038,08	mg/L	Tiene en cuenta la máxima dilución aceptable 1:10
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	25,2 – 5.000,0	2,71 – 5.000,00	mg/L	Tiene en cuenta la máxima dilución aceptable 1:10
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	99,9	100,36	%	M1 Añadido de 10 mg/L O ₂
	102,0	99,64	%	M2 Añadido de 90 mg/L O ₂

FUENTE: El Autor

Resumen de Validación de Sólidos Suspendidos

CUADRO PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

NOMBRE DEL MÉTODO: Determinación de Sólidos Suspendidos por el método de Gravimetría

CÓDIGO DEL PROCEDIMIENTO: SO-GS-05-P-21

FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN: 12 de marzo de 2010

PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACIÓN
DECIMALES	1	-	Dado por la incertidumbre
INCERTIDUMBRE	0,3	mg/L	Corresponde a una incertidumbre combinada
LÍMITE DE DETECCIÓN	2,0	mg/L	Corresponde al límite de detección del método
	9,9	mg/L	Corresponde al límite de cuantificación de la práctica
PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE %CV	3,4	%	Estándar Bajo 150 mg/L
	2,3	%	Estándar Medio 750 mg/L
	2,0	%	Estándar Alto 1.350 mg/L
	9,3	%	Muestra Certificada 57,7 mg/L
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	0,9	%	Estándar Bajo 150 mg/L
	1,4	%	Estándar Medio 750 mg/L
	0,9	%	Estándar Alto 1.350 mg/L
	2,1	%	Muestra Certificada 57,7 mg/L
RANGO DE TRABAJO	2,0 - 1.370,0	mg/L	No se aplica con dilución
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	9,9 - 1.500,0	mg/L	No tiene en cuenta la máxima dilución aceptable 1:10
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	99,3	%	M1 Añadido de 10 mg/L de NaCl
	97,9	%	M2 Añadido de 40 mg/L de NaCl
	97,9	%	Muestra Certificada (Mc)

FUENTE: El Autor

Resumen de Validación de Sólidos Disueltos

CUADRO PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

NOMBRE DEL MÉTODO: Determinación de Sólidos Disueltos por el método de Gravimetría

CÓDIGO DEL PROCEDIMIENTO: SO-GS-05-P-20

FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN: 12 de marzo de 2010

PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACIÓN
DECIMALES	1	-	Dado por la incertidumbre
INCERTIDUMBRE	0,6	mg/L	Corresponde a una incertidumbre combinada
LÍMITE DE DETECCIÓN	3,1	mg/L	Corresponde al límite de detección del método
	15,6	mg/L	Corresponde al límite de cuantificación de la práctica
PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE %CV	4,5	%	Estándar Bajo 300 mg/L
	1,0	%	Estándar Medio 1.500 mg/L
	0,9	%	Estándar Alto 2.700 mg/L
	4,5	%	Muestra Certificada 39,8 mg/L
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	3,6	%	Estándar Bajo 300 mg/L
	0,1	%	Estándar Medio 1.500 mg/L
	0,3	%	Estándar Alto 2.700 mg/L
	6,8	%	Muestra Certificada
RANGO DE TRABAJO	3,1 - 2.671,0	mg/L	No se aplica con dilución
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	15,6 - 3.000,0	mg/L	No tiene en cuenta la máxima dilución aceptable 1:10
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	97,5	%	M1 Añadido de 160 mg/L de NaCl
	98,5	%	M2 Añadido de 264 mg/L de NaCl
	106,8	%	Muestra Certificada (Mc)

FUENTE: El Autor

Resumen de Validación Sólidos Totales

CUADRO PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

NOMBRE DEL MÉTODO: Determinación de Sólidos Totales por el método de Gravimetría

CÓDIGO DEL PROCEDIMIENTO: SO-GS-05-P-22

FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN: 3 de diciembre de 2009

PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACIÓN
DECIMALES	1	-	Dado por la incertidumbre
INCERTIDUMBRE	0,3	mg/L	Corresponde a una incertidumbre combinada
LÍMITE DE DETECCIÓN	2,7	mg/L	Corresponde al límite de detección del método
	13,3	mg/L	Corresponde al límite de cuantificación de la práctica
PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE %CV	18,6	%	Estándar Bajo 30 mg/L
	0,3	%	Estándar Medio 3.000 mg/L
	0,6	%	Estándar Alto 6.000 mg/L
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	1,4	%	Estándar Bajo 30 mg/L
	0,2	%	Estándar Medio 3.000 mg/L
	0,1	%	Estándar Alto 6.000 mg/L
	4,6	%	Muestra Certificada
RANGO DE TRABAJO	2,7 - 6.084,0	mg/L	No se aplica con dilución
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	13,3 – 7.000,0	mg/L	No tiene en cuenta la máxima dilución aceptable 1:10
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	99,8	%	M1 Añadido de 60 mg/L de NaCl
	96,9	%	M2 Añadido de 150 mg/L de NaCl
	104,6	%	Muestra Certificada (Mc)

FUENTE: El Autor