



Reflab metode 2:2002

1. udgave

Godkendt: 27-02-2003

Biokemisk oxygenforbrug over 5 døgn (BOD₅) på lavt niveau med tilsætning af N-allylthiourea.

1. Omfang og anvendelsesområde

Denne metode beskriver måling af biokemisk oxygenforbrug med en inkubationstid på 5 dage (BOD₅) i spildevand fra udløb af rensningsanlæg. Metoden omfatter bestemmelse i ufortyndede og svagt fortyndede prøver, uden podning og med hæmning af nitrifikation.

Metoden er anvendelig for måling af BOD₅ fra 0,5-15 mg/L O₂.

Resultaterne fremkommer ved en kombination af biokemiske og kemiske reaktioner. De er derfor ikke så éntydige som resultater der baseres på f.eks. veldefinerede kemiske processer, men de giver en indikation af vandkvaliteten.

1.1 Interferenser

Målingen kan påvirkes af stoffer, som er toksiske overfor mikroorganismer, f.eks. baktericider, toksiske metaller eller frit chlor, som vil hæmme den biokemiske oxidation. Tilstedeværelse af sådanne stoffer kan afsløres ved måling i flere forskellige fortyndinger som beskrevet i DS/EN 1899-1:1998, Annex B.

Interferenser i forbindelse med oxygenmålingen er beskrevet i DS/EN 25814.

2. Princip

Prøven tempereres til 20°C og iltes til mætning. Prøven anbringes mørkt i fyldte, hermetisk lukkede glasflasker ved 20°C i en periode på 5 dage. Indholdet af opløst oxygen bestemmes før og efter inkubationen. Det biokemiske oxygenforbrug beregnes ud fra forskellen i koncentration af opløst oxygen. Prøven kan fortyndes indtil 3,5 gange inden inkubation. Der tilsættes N-allylthiourea (ATU) for at undertrykke nitrifikation.

3. Reagenser

Der skal benyttes kemikalier af analysekvalitet, med mindre andet er specificeret. Reagensvand til fremstilling af opløsninger og til fortynding skal have et BOD₅ mindre end 0,2 mg/L O₂ og skal være grade 3 kvalitet (DS/EN ISO 3696:1995). Vandet må dog ikke indeholde mere end 0,01 mg/L kobber og skal være fri for chlor og chloraminer.

3.1 Allylthiourea (ATU) opløsning, 1 g/L

Opløs 200 mg allylthiourea (C₄H₈N₂S) i vand, fyld op til 200 mL og bland grundigt. Opbevar opløsningen ved 4°C. Opløsningen er stabil i mindst 2 uger. Allylthiourea (ATU) er giftigt og skal derfor anvendes efter producentens anvisninger.

3.2 Iltet fortyndingsvand.

Vand iltes til mætning med udstyret beskrevet i 4.6. Vandet må ikke være overmættet med oxygen. Det skal derfor inden brug henstå 1 time i en beholder uden prop.

3.3 Kontrolstamopløsning

Certificeret referencemateriale QC WW5 (stamopløsning 2060 mg/L O₂ i batch VKI-21-2-0897) eller en blanding af glukose og glutaminsyre. En blanding bestående af 1500 ± 10 mg af hver opløst i vand til 1000 mL har et empirisk BOD₅ på 2100 ± 200 mg/L O₂. Ved denne metode forventes en genfinding på ca. 95%.

4. Udstyr

Der skal anvendes almindeligt laboratorieudstyr samt:

4.1 Inkubationsflasker, BOD flasker

Glasflasker med tætsluttende, indsleben glasprop på 250-300 mL, der er grundigt rengjorte inden brug for at undgå kontaminering eller inhibering. For eksempel kan anvendes vaskeprocedure beskrevet i DS/EN 1899-2:1998.

4.2 Beholder til fortyndingsvand, glas eller plast

Denne skal være ren og fri for mikroorganismer. Plastbeholdere skal kontrolleres for eventuelt bidrag til forhøjet blindværdi.

4.3 Inkubator

Klimarum eller termostateret skab med temperatur på 20±1°C.

4.4 Apparatur til at bestemmelse af opløst oxygen

Der benyttes udstyr til elektrodebestemmelse af opløst oxygen som beskrevet i DS/EN 25814.

4.5 Fortyndingsflaske

1,0 liter bægerglas eller tilsvarende.

4.6 Beluftningsudstyr

Gasflaske med trykluft, kompressor eller peristaltisk pumpe, hvor luftkvaliteten ikke må give anledning til kontaminering ved f.eks. at tilføre organisk materiale eller ved oxidation af reducerende forbindelser eller metaller.

5. Prøvetagning

Ved prøvetagning skal der drages omsorg for at delprøver under prøvetagning holdes ved en temperatur mellem 0 og 4°C. Det skal kontrolleres, at beholdere i prøvetager ikke giver anledning til forhøjet blindværdi.

6. Opbevaring af prøve

Prøven skal efter prøvetagningen opbevares mørkt ved 4°C i en fyldt, hermetisk lukket beholder af polyethylen eller glas. Analyserne skal påbegyndes umiddelbart efter prøvetagningen, eller højst 24 timer herefter. Prøven må ikke fryses.

Det skal kontrolleres, at prøvebeholdere ikke giver anledning til forhøjet blindværdi.

7. Fremgangsmetode

For ukendte prøver skal der altid udføres en bestemmelse uden fortynding (7.2) og to bestemmelser med forskellige fortyndinger (7.3). For prøver med kendt indhold udføres altid 2 bestemmelser, som begge forventes at falde indenfor det tilladte oxygenforbrug (8.1).

7.1 Forbehandling

Metoden er beregnet til prøver af spildevand fra udløb fra renseanlæg, hvor forbehandling (neutralisering, fjernelse af chlor, fjernelse af alger) ikke skønnes nødvendig. Er forbehandling nødvendig, benyttes i stedet fortyndingsmetoden DS/EN 1899-1.

7.1.1 Iltmætning af prøven inden analyse

Bring prøven til en temperatur på $20 \pm 1^\circ\text{C}$ og beluft med udstyret beskrevet i 4.6 indtil mætning. Ryst prøven og lad den stå i 15 minutter for at undgå overmætning med oxygen.

7.2 Fremstilling af testopløsning (uden fortynding)

Fyld fortyndingsflasken (4.5) halvt med prøve og tilsæt 2 mL allylthiourea opløsning (3.1).

Fyld op til 1,0 L med prøve.

7.3 Fremstilling af testopløsning (med fortynding)

Afmål prøve i fortyndingsflasken (4.5) svarende til den ønskede fortynding. Prøvevolumen skal mindst være 285 mL, svarende til 3,5 gange fortynding. Tilsæt 2 mL allylthiourea opløsning (3.1).

Fyld op til 1,0 L med iltet fortyndingsvand (3.2)

7.4 Blind test

Udfør en kontrol af blindværdien parallelt med analyserne af prøverne. Følg fremgangsmetoden beskrevet i 7.2, Fortyndingsvandet (3.2) anvendes i stedet for prøve. Tilsæt 2 mL allylthiourea opløsning (3.1) per liter.

7.5 Bestemmelse af opløst oxygen

For hver testopløsning (7.2; 7.3) og blind test (7.4) fyldes to inkubationsflasker (4.1) til overløb. Lad eventuelle luftbobler på glassiderne forsvinde ud af inkubationsflaskerne.

Mål indholdet af opløst oxygen i hver inkubationsflaske med udstyret beskrevet i 4.4. Denne måling giver oxygenindholdet til tiden 0.

Luk flaskerne omhyggeligt og sørg for, at der ikke indelukkes luftbobler på glasproppens underside.

Anbring alle inkubationsflaskerne mørkt i inkubator (4.3) i 5 dage \pm 4 timer.

Mål indholdet af opløst oxygen i hver inkubationsflaske efter de 5 dage med udstyret beskrevet i 4.4. Denne måling giver oxygenindholdet til tiden 5 dage.

7.6 Kontrolanalyse

7.6.1 Dobbelbestemmelse på naturlig prøve

I hver serie udføres for mindst én prøve dobbelt analyse, herunder det nødvendige antal fortyndinger for hver analyse. Derefter udregnes den relative variationsbredde r_i :

$$r_i = \frac{(BOD_{51} - BOD_{52}) \cdot 100}{\frac{1}{2} \cdot (BOD_{51} + BOD_{52})} \%$$

r_i indsættes i r-kort til kontrol af analysens statistiske stabilitet, og repeterbarheden estimeres som den relative standardafvigelse CV ud fra den gennemsnitlige, relative variationsbredde, \bar{r} :

$$CV = \frac{\bar{r}}{1,128} \%$$

7.6.2 Tilsætning til naturlig prøve

I hver analyseserie udføres tillige mindst en kontrolanalyse, hvor 2 mL af en kontrol opløsning med cirka 2000 mg/L O₂ som BOD₅ (3.3) fortyndes til 1 L testopløsning med prøve og analyseres som angivet i 7.2/7.3 og 7.5. Genfindingen af tilsætning D_i beregnes som forskellen imellem resultatet x_s for prøven tilsat kontrolopløsning og resultatet x for prøven selv:

$$D_i = x_s - x$$

D_i indsættes i D kort, og metodens relative genfinding P estimeres ud fra den gennemsnitlige genfinding \bar{D} og den beregnede værdi af tilsætningen, d :

$$P = \frac{\bar{D}}{d} \cdot 100 \%$$

8. Beregning af resultat

8.1 Krav til oxygenforbrug under testforløbet

Til udregning af BOD₅ benyttes de testopløsninger, der opfylder kravet:

$$0,05 \cdot C_1 < (C_1 - C_2) < 0,95 \cdot C_1 \quad , \text{ hvor}$$

C_1 er opløst oxygen ved tiden 0 i mg/L O₂, og
 C_2 er opløst oxygen ved tiden 5 dage i mg/L O₂.

8.2 Beregning af BOD₅ uden fortynding

Det biokemiske oxygenforbrug efter 5 dage beregnes i mg/L O₂ ved

$$BOD_5 = (C_1 - C_2)$$

C₁ og C₂ er beskrevet i 8.1.

8.3 Beregning af BOD₅ med fortynding

Det biokemiske oxygenforbrug efter 5 dage beregnes i mg/L O₂ ved

$$BOD_5 = [(C_1 - C_2) - (V_t - V_e) / V_t * (C_3 - C_4)] * V_t / V_e$$

C₁ og C₂ er beskrevet i 8.1.

C₃ er koncentrationen af opløst oxygen fundet i blind testen (7.4) ved tiden 0 i mg/L O₂.

C₄ er koncentrationen af opløst oxygen fundet i blind testen (7.4) ved tiden 5 dage i mg/L O₂.

V_e er volumen af prøve benyttet til fremstilling af testopløsningen (se 7.3) i mL.

V_t er det totale volumen til fremstilling af testopløsningen (se 7.3) i mL.

8.4 Beregning af endeligt resultat

Gennemsnittet af de udregnede BOD₅ resultater for alle fortyndinger (inkl. ufortyndet), der opfylder kravet i 8.1, benyttes som analyseresultat. Resultatet angives med 2 betydende cifre.

9. Korrekthed, præcision og detektionsgrænse

Ved en interlaboratorieundersøgelse i 2002 blev korrekthed, standardafvigelse for repeterbarhed og reproducerbarhed, samt opnåelig detektionsgrænse bestemt. Interlaboratorieundersøgelsen omfattede 7 prøver, som blev analyseret med dobbeltbestemmelse. I undersøgelsen deltog 8 danske laboratorier.

Ved bestemmelse af korrekthed er antaget, at den empiriske værdi i henhold til DS/EN 1899-1:1998 for BOD₅ i en blanding af lige dele glukose og glutaminsyre er gældende. Herved giver en blanding af 1 g af hvert stof en BOD₅ på 1,40 mg/L O₂.

Korrekthed:

Middelgenfinding 95% varierende fra 88 til 101% (4 prøver).

Repeaterbarhedsstandardafvigelse:

0,05 – 0,09 mg/L O₂ ved koncentration 1 mg/L O₂ (2 prøver).

1 – 9% i koncentrationsområdet fra 4 til 15 mg/L O₂ (4 prøver).

Reproducerbarhedsstandardafvigelse:

0,1 - 0,2 mg/L O₂ i koncentrationsområdet 0,2 - 1 mg/L O₂ (3 prøver).

6 – 9% i koncentrationsområdet fra 4 til 15 mg/L O₂ (4 prøver).

Detektionsgrænse:

Ud fra standardafvigelsen for repeterbarhed ved lav koncentration (0,05 – 0,09 mg/L O₂) findes, at en detektionsgrænse på 0,5 mg/L O₂ med sikkerhed kan overholdes.

Detektionsgrænsen er i denne metode defineret som

$$DL = t_{0,995}(df) \cdot s_r$$

hvor s_r er standardafvigelse for repeterbarhed for prøver med koncentration tæt på den forventede detektionsgrænse, $t_{0,995}$ er Student's t-værdi på 99,5% konfidensniveau og df er antallet af frihedsgrader for s_r .

10. Rapport

Rapporten skal indeholde:

1. Reference til denne metode
2. Angivelse af, at nitrifikation var undertrykt
3. Resultatet i mg/L O₂
4. Bemærkninger om eventuelle modifikationer i metoden eller andre supplerende oplysninger om analysens gennemførelse

Det skal endvidere anføres, om BOD₅ resultater er fundet med eller uden fortynding.