

**Rapport  
Juni 2000**

**Miljøstyrelsen**

**BOD<sub>5</sub> på lavt niveau**

**Udvikling og validering af metode til bestemmelse  
af BOD<sub>5</sub> på lavt niveau ud fra DS/EN1899-2**

Agern Allé 11  
2970 Hørsholm

Tel: 4516 9200  
Fax: 4516 9292  
E-mail: [anf@dhi.dk](mailto:anf@dhi.dk)  
Web: [www.dhi.dk](http://www.dhi.dk)

**Miljøstyrelsen**

## **BOD<sub>5</sub> på lavt niveau**

**Udvikling og validering af metode til bestemmelse  
af BOD<sub>5</sub> på lavt niveau ud fra DS/EN1899-2**

**Rapport  
Juni 2000**

**Projektleder: Christian Grøn  
Projektmedarbejdere: Anders Favrbø, Lisbeth Olsen, Jill Merry**

**DHI sag: 50621-14  
Dato: 30. juni 2000**

## INDHOLDSFORTEGNELSE

1.	INDLEDNING.....	1
2.	ANALYSEKVALITET.....	2
2.1	Danske krav til analysekvalitet for BOD.....	2
2.2	Opnået analysekvalitet for BOD ved nyere danske præstationsprøvninger.....	3
2.3	Samlet vurdering af krav til BOD analysemetoderne i forhold til opnåelig analysekvalitet.....	4
3.	METODER TIL BESTEMMELSE AF BOD.....	5
3.1	Metodevariationer, sammenligning af DS/EN 1899-1 og DS/EN 1899-2.....	6
3.2	Metodevariationer, inkubationstid.....	6
3.3	Metodevariationer, undertrykkelse af nitrifikation.....	6
3.4	Metodevariationer, fortyndingsmetode eller ufortyndet metode.....	7
3.5	Metodevariationer, iltbestemmelse.....	7
3.6	Metodevariationer, podemateriale.....	7
3.7	Alternative metoder.....	7
4.	BEHOV FOR METODEUDVIKLING.....	8
5.	FORSØGSBESKRIVELSE FOR METODEUDVIKLING.....	9
6.	RESULTATER OG DISKUSSION FOR METODEUDVIKLING.....	11
6.1	Undersøgelse af effekt af ATU på BOD på lavt niveau.....	11
6.2	Undersøgelse af effekt af næringsstoftilsætning.....	11
6.3	Fastlæggelse af maksimal fortynding uden nedsat mikrobiel omsætning.....	12
6.4	Sammenfatning af metodeudvikling.....	15
7.	UDARBEJDELSE AF METODEFORSKRIFT.....	16
8.	FORSØGSBESKRIVELSE FOR METODEVALIDERING OG METODESAMMENLIGNING.....	17
9.	RESULTATER OG DISKUSSION FOR METODEVALIDERING OG METODESAMMENLIGNING.....	18
10.	SAMMENFATNING OG ANBEFALINGER.....	20
11.	REFERENCER.....	21

## BILAGSFORTEGNELSE

Bilag 1	ATU undersøgelse	(1 side)
Bilag 2	Statistisk undersøgelse af ATU tilsætning	(1 side)
Bilag 3	Næringssalttilsætning	(3 sider)
Bilag 4	Fortynding af prøver	(1 side)
Bilag 5	Fortynding af spikede prøver	(1 side)
Bilag 6	Beregning af spike (6,18 mg O <sub>2</sub> /L)	(1 side)
Bilag 7	Fortynding af spikede prøver	(1 side)
Bilag 8	Beregning af spike (12,3 mg O <sub>2</sub> /L)	(1 side)
Bilag 9	Udkast til metodeforskrift for BOD <sub>5</sub> analyser på lavt niveau	(5 sider)
Bilag 10	Resultater fra metodevalidering	(1 side)
Bilag 11	Metodevalideringsrapport	(2 sider)
Bilag 12	Sammenligning af DS/EN 1899-1 og DS/EN 1899-2 (NY)	(3 sider)

## 1. INDLEDNING

Analyser for biokemisk iltforbrug, BOD, anvendes til en vurdering af vandmiljøets belastning med uorganiske og/eller organiske stoffer, som ved biologisk oxidation forbruger ilt. Analysemetoden er udviklet til analyse af spildevand, men med den stigende anvendelse af BOD bestemmelsen til analyse af behandlet spildevand har blandt andet Miljøankenævnet til Miljøstyrelsen gjort opmærksom på et behov for en metode, der kan bestemme iltforbruget på lavere niveau, end det er muligt med den traditionelle spildevandsmetode. Miljøstyrelsen Referencelaboratorium for Kemiske Miljøanalyser har derfor af Referencelaboratoriets styregruppe fået i opdrag at foretage en vurdering af de benyttede analysemetoder til bestemmelse af BOD, samt at gennemføre udvikling og validering af en egnet metode til bestemmelse af på i behandlet spildevand. Denne rapport indeholder dels en tidligere rapporteret vurdering af de 2 danske standardmetoder til bestemmelse af BOD, den forventelige analysekvalitet ud fra de seneste danske præstationsprøvninger og danske krav til analysekvaliteten, dels resultaterne af den gennemførte metodeudvikling og -validering.

## 2. ANALYSEKVALITET

### 2.1 Danske krav til analysekvalitet for BOD

I tabel 2.1.1 er vist de generelle krav til analysekvaliteten for BOD, når analyseresultaterne skal anvendes til kontrol af miljøkrav eller til overvågning /1/.

<b>Tabel 2.1.1 Generelle krav til analysekvalitet for BOD /1/</b>			
Medium	Maximal total standardafvigelse $s_{T_{max}}$ i måleområdet: $3-15 \times s_{T_{max}}$ (mg/L O <sub>2</sub> )	Højest relativ standardafvigelse i måleområdet: $>15 \times s_{T_{max}}$ (%)	Genfinding af nominal værdi (%)
Overfladevand til drikkevand	0,15	7(5) <sup>a</sup>	100±25 (100±20) <sup>a</sup>
Fersk overfladevand	0,15	7(5) <sup>a</sup>	100±25 (100±20) <sup>a</sup>
Salt overfladevand	0,5	7(5) <sup>a</sup>	100±25 (100±20) <sup>a</sup>
Spildevand	1	7(5) <sup>a</sup>	100±25 (100±20) <sup>a</sup>
Lossepladsperkolat	1	7(5) <sup>a</sup>	100±25 (100±20) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: værdi i parentes skal være opnået 1. september 2000

I det Nationale Program for Overvågning af Vandmiljøet 1998-2003 (NOVA 2003) /2/ indgår analyser for BOD for enkelte medier, og her er angivet krav til analysedetekteringsgrænser som anført i tabel 2.1.2.

Medium	Analysedetektningsgrænsekraft (mg/L O <sub>2</sub> )
Vandløb	0,5
Jordvand og drønvand	2
Punktkilder	2

Derudover er fastsat krav til vandkvalitet med hensyn til BOD for en række medier, hvilket medfører et operationelt betinget krav om en analysedetektningsgrænse ikke over 10% af kravværdien. Kravværdier og deraf afledte krav til analysedetektningsgrænser er vist i tabel 2.1.3.

Medium	Kravværdi (mg/L O <sub>2</sub> )	Afledet detektnings- grænsekraft (mg/L O <sub>2</sub> )	Reference
Overfladevand til drikkevand	3	0,3	/3/
Fersk overfladevand	3	0,3	/4/
Ferskvandsdambrug	1	0,1(0,5) <sup>a</sup>	/5/
Spildevand rensat	15/5 <sup>b</sup>	1,5/0,5	/6/

<sup>a</sup>: værdi i parentes er foreslået i forbindelse med interkalibrering i 1990 /10/

<sup>b</sup>: laveste kravværdi stillet lokalt til renselanlæg /8/

Der betales spildevandsafgift af udledt BOD ( i øjeblikket 11 kr./kg BOD) uden nedre grænse for målt værdi /7/, og der stilles lokalt krav til BOD i rensat spildevand på niveau 5-15 mg/L O<sub>2</sub> /8/.

Det er tidligere foreslået, at den nødvendige detektningsgrænse for kontrol af BOD i spildevand var 1 mg/L O<sub>2</sub> og i overfladevand 0,5 mg/L O<sub>2</sub> udfra det da (1985) gældende regelsæt /9/.

En samlet vurdering udfra de nu gældende krav viser, at BOD målinger skal kunne udføres i overfladevand med en detektningsgrænse ikke højere end cirka 0,5 mg/L O<sub>2</sub> og helst så lavt som 0,1 mg/L O<sub>2</sub>, med en præcision ikke dårligere end en maksimal total standardafvigelse  $s_{Tmax}$  på 0,15 mg/L O<sub>2</sub> i måleområdet 3-15 x  $s_{Tmax}$  og med en højeste relativ standardafvigelse på 5% i måleområdet >15 x  $s_{Tmax}$ , samt med en genfindning af nominel værdi i præstations-prøvninger ikke dårligere end 100±20%. For spildevand gælder, at BOD skal kunne bestemmes med en detektningsgrænse ikke højere end 1,5 mg/L O<sub>2</sub>, helst så lav som 0,5 mg/L O<sub>2</sub>, og med krav til præcision og nøjagtighed svarende til det anførte for overfladevand. Det skal bemærkes, at kravet om en detektningsgrænse så lav som 0,5 mg/L O<sub>2</sub> er baseret på lokale krav til udledninger og reglerne om spildevandsafgift.

## **2.2 Opnået analysekvalitet for BOD ved nyere danske præstationsprøvninger**

Den opnåelige analysekvalitet kan vurderes udfra de opnåede resultater ved de nyere danske præstationsprøvninger. I tabel 2.2.1 er samlet intervaller for den gennemsnitlige standardafvigelse,  $s_r$ , indenfor laboratorierne, variationskoefficienten indenfor laboratorierne, samt genfindning af tilsat BOD.

De opgivne værdier for  $s_r$  fundet ved præstationsprøvninger er svarende til, men ikke identiske med standardafvigelsen indenfor analyseserien,  $s_w$ , som sammen med standardafvigelsen imellem serierne,  $s_b$ , fastlægger den totale standard afvigelse,  $s_T$ , indenfor laboratorierne opnået

ved intern kvalitetskontrol /1/. Det må således vurderes, at såfremt den gennemsnitlige værdi af  $s_r$  i præstationsprøvninger er mindre end  $S_{Tmax}$ , vil en metode kunne benyttes med overholdt  $S_{Tmax}$ . Den almindeligt opnåelige detektionsgrænse for en metode kan anslås som  $5 \times s_r$ , idet den hidtil benyttede metode til beregning af analysedetektionsgrænse baseret på en accepteret, lav risiko for falsk negative resultater /11/ benyttes under antagelse af 2 blindprøver i hver analyseserie og en veldefineret standardafvigelse på blindresultaterne.

Det skal bemærkes, at der i tabellen ikke er skelnet imellem modificeret og umodificeret BOD, samt at resultaterne for salt overfladevand er opnået med en analysemetode uden fortynding rettet imod vandtyper med lavt BOD (DS/EN 1899-2 eller tidligere versioner heraf). Resultaterne for spildevand er opnået efter fortyndingsmetoden (DS/R 254, DS/EN 1899-1 eller modifikationer heraf). Resultaterne for fersk overfladevand er vurderet udfra resultater opnået med begge metodeprincipper.

Medium	Standardafvigelse indenfor laboratorierne i måleområdet: $3-15 \times s_{Tmax}$ (mg/L O <sub>2</sub> )	Variationskoefficienten indenfor laboratorierne i måleområdet: $>15 \times s_{Tmax}$ (%)	Genfinding af nominel tilsætning (%)
Fersk overfladevand /12/	0,09-0,13	4,7-5,2	75-80
Salt overfladevand <sup>b</sup> /13/	0,06-0,36	- <sup>a</sup>	99-111
Spildevand /14/	0,51-0,60	3,7-4,0	87-100

<sup>a</sup>: ingen prøver på dette niveau

<sup>b</sup>: kun resultater opnået med DS/EN 1899-2 er vist

Den opnåelige analysedetektionsgrænse for metoden uden fortynding kan anslås at ligge i intervallet 0,3-1,5 mg/L O<sub>2</sub>, hvilket ikke opfylder kravene afledt af vandkvalitetskrav (tabel 2.1.3) og ikke i alle tilfælde kravene i NOVA 2003 (tabel 2.1.2). For fortyndingsmetoden kan analysedetektionsgrænsen anslås til 2,5-3 mg/L O<sub>2</sub>, hvilket ikke opfylder kravene afledt af vandkvalitetskrav (tabel 2.1.3), samt ikke opfylder kravene i NOVA 2003 (tabel 2.1.2). Kravene til analysedetektionsgrænse for analyse af spildevand kan dermed ikke opfyldes.

For alle vandtyper vurderes kravet til  $s_{Tmax}$  i prøver med lavt BOD at kunne opfyldes. For fersk overfladevand og spildevand vurderes kravet til variationskoefficienten i prøver med højere BOD at kunne opfyldes (krav gældende indtil 1. september 2000) eller stort set opfyldes (krav gældende efter denne dato). Kravene til genfinding af tilsætning er ikke opfyldt i alle tilfælde, men det skal bemærkes, at den nominelle værdi for tilsat BOD er baseret på en empirisk genfinding og dermed ikke er en eksakt værdi.

### **2.3 Samlet vurdering af krav til BOD analysemetoderne i forhold til opnåelig analysekvalitet**

Det vurderes samlet, at der på længere sigt kan være behov for forbedring af metoden til BOD analyse uden fortynding med henblik på sænkning af analysedetektionsgrænsen og forbedret præcision for analyser af overfladevand.

Der er et umiddelbart behov for udarbejdelse af en analysemetode, der kan anvendes til analyse af spildevand med lavt BOD (detektionsgrænse ikke over 0,5 mg/L O<sub>2</sub>) under opnåelse af resultater, der er sammenlignelige med resultater opnået med den normalt anvendte spildevandsmetode.

### 3. METODER TIL BESTEMMELSE AF BOD

BOD bestemmes ved at inkubere en vandprøve i 5-7 dage, hvor prøvens indhold af ilt måles før og efter inkuberingen. Der anvendes enten fortyndingsmetoden, DS/EN 1899-1 /15/, til prøver med BOD over 3 mg/L O<sub>2</sub> eller en modifikation heraf uden fortynding, DS/EN 1899-2 /16/, til prøver med lavere BOD. Fortyndingsmetoden er en modifikation af den tidligere benyttede metode beskrevet i DS/R 254 /17/. De væsentligste variationer imellem de 3 metoder er vist i tabel 3.1.

<b>Tabel 3.1 Hovedtræk af BOD analysemetoder /15, 16, 17/</b>			
	DS/EN 1899-1	DS/EN 1899-2	DS/R 254
Hovedprincip	Fortynding af prøve med iltmættet, podet vand og måling af iltindhold før og efter inkubation	Måling af iltindhold i prøven før og efter inkubation	Fortynding af prøve med iltmættet vand, podning og måling af iltindhold før og efter inkubation
Metodens angivne anvendelsesområde	3-6000 mg/L O <sub>2</sub>	0,5-6 mg/L O <sub>2</sub>	2-1000 mg/L O <sub>2</sub>
Iltmåling	Titration eller elektrode	Titration eller elektrode	Titration
pH område	6-8	6-8	6,5-8,5
Iltmætning	Indgår	Tilladt	Indgår
Podning	Indgår	Modifikation	Indgår
Tilsætning af ATU	Indgår	Modifikation	Modifikation
Næringssalttilsætning	Indgår	Modifikation	Indgår
Inkubationsperiode -modifikation	5 eller 7 døgn 2+5 døgn	5 eller 7 døgn 2+5 døgn	5 døgn -
Angiven standardafvigelse indenfor laboratorierne	11 mg/L O <sub>2</sub>	0,10-0,22 mg/L O <sub>2</sub>	5-10%
Primær anvendelse	Spildevand og losseplads-perkolat	Overfladevand	Overfladevand

Mens DS/EN 1899-1 benytter tilsætning af biologisk aktivt podemateriale, modifikation med N-allylthiourinstof (ATU) til undertrykkelse af iltforbrug ved nitrifikation og iltmætning af prøverne inden inkubation, baserer DS/EN 1899-2 sig på prøvens egen mikrobielle aktivitet, bidraget til BOD fra nitrifikation undertrykkes ikke som standard, og iltmætning er ikke obligatorisk. DS/EN 1899-1 er anvendelig til prøver med høje BOD værdier på grund af den anvendte fortynding af prøven, mens DS/EN 1899-2 kan benyttes til prøver med lavt BOD, netop fordi prøven ikke fortyndes. Tilsætning af næringsalte sker i henhold til DS/R 254 til den færdigfortyndede prøve, mens næringsalte i henhold til DS/EN 1899-1 tilsættes til fortyndingsvandet. Dette vurderes ikke at påvirke analysekvaliteten.

Bestemmelse af BOD efter fortyndingsmetoden som angivet i DS/EN 1899-1 svarer i hovedtrækkene til metoderne angivet i Standard Methods /18/ og af AOAC /19/. Endvidere forventes EN 1899-1 og EN 1899-2 vedtaget som ISO standarder.

### 3.1 Metodevariationer, sammenligning af DS/EN 1899-1 og DS/EN 1899-2

Frederiksborg Amt har i 1998-1999 foranlediget udført parallelle analyser efter DS/EN 1899-1 og DS/EN 1899-2 af spildevand fra Slangstrup Renseanlæg. I tabel 3.1.1 er vist resultaterne som meddelt Miljøstyrelsen i brev fra Frederiksborg Amt dateret 12. november 1999 for de spildevandsprøver, som er analyseret efter begge metoder, med og uden tilsætning af ATU.

Dato	BOD efter DS/EN 1899-1		BOD efter DS/EN 1899-2		NH <sub>3</sub>
	ATU tilsat	Uden ATU	ATU tilsat	Uden ATU	
	mg/L O <sub>2</sub>	mg/L O <sub>2</sub>	mg/L O <sub>2</sub>	mg/L O <sub>2</sub>	mg/L NH <sub>3</sub>
30-10-98	3	10	2,9	3,7	0,08
12-11-98	3	10	6,5	6,6	0,08
20-01-99	2	8	2,7	3	0,09
10-03-99	3	14	3	7	0,90
22-04-99	2	10	1,9	3,7	0,47
19-05-99	3	8	3,3	7	1,2

Resultaterne viser, at analyse efter metoden uden fortynding, DS/EN 1899-2, giver sammenlignelige resultater med og uden tilsætning af ATU, når det forventelige bidrag til iltforbruget fra nitrifikation tages i betragtning, men også, at tilsætning af ATU er nødvendig, såfremt alene bidraget til iltforbruget fra organisk stof ønskes bestemt. Resultaterne opnået efter fortyndingsmetoden, DS/EN 1899-1, giver for 5 prøver resultater svarende til det opnåede med DS/EN 1899-2 med ATU tilsat, mens 1 resultat falder væsentligt udenfor. Analyse efter DS/EN 1899-1 uden tilsætning ATU bør ikke anvendes, idet metodens foreskrevne tilsætning af ammonium chlorid vil give et ekstra iltforbrug fra nitrifikation heraf, hvilket også ses af de afvigende resultater opnået her efter denne metode.

### 3.2 Metodevariationer, inkubationstid

Anvendelse af en inkubationstid på 7 døgn i stedet for 5 døgn (traditionelt benyttet i Danmark) er tilladt ifølge DS/EN 1899-1 og 1899-2, men den længere inkubationstid resulterer i højere resultater /20/. Derimod angives opbevaring af prøver klargjort til inkubation i 2 døgn i mørke og ved 0-4°C efterfulgt af inkubation i 5 døgn ved 20°C (BOD<sub>2+5</sub>) at give resultater svarende til BOD<sub>5</sub> /20/. Præcisionen er ikke væsentligt forskellig ved de 3 metoder /20/. Der er dog tidligere observeret forbedret præcision ved 7 døgn inkubation, sammenholdt med 5 døgn inkubation, både med og uden tilsætning af ATU /21/. I Danmark bruges som nævnt traditionelt BOD<sub>5</sub>.

Bestemmelse af det totale biokemiske iltforbrug (ultimate BOD) gennemføres ved måling af iltindhold i inkuberede prøver efter gentagen iltning, med eller uden fortynding, indtil det ugentlige iltforbrug når ned på 1-2% /18/. Metoden kan gennemføres med og uden podning, og der tillades korrektion for fortyndingsvandets BOD målt som dettes iboende iltforbrug. Inkubering kan typisk være op til 90 dage.

### 3.3 Metodevariationer, undertrykkelse af nitrifikation

Undertrykkelse af nitrifikation ved tilsætning af ATU kan forbedre præcisionen ved analyse af fersk overfladevand /22/, men dette er tydeligvis ikke entydigt tilfældet hverken for fersk overfladevand eller for spildevand /12, 14, 21/. Derimod giver ATU tilsætning et lavere BOD resultat som følge af undertrykkelsen af iltforbruget ved nitrifikationen /12, 21/, og en tilsætning på 2 mg/L er nødvendig for at opnå fuld hæmning af nitrifikationen /23/. Effekten af ATU

tilsætning kan også ses af sammenligningen imellem resultater opnået efter DS/EN 1899-2 med og uden tilsætning af ATU vist i tabel 3.1.1.

### **3.4 Metodevariationer, fortyndingsmetode eller ufortyndet metode**

Fortyndingsmetoden (1899-1 eller tilsvarende) giver en dårligere præcision end metoden uden fortynding (1899-2 eller tilsvarende) ved analyse af overfladevand med lavt BOD indhold, men igen uden at forskellen er éntydig /12, 13/.

### **3.5 Metodevariationer, iltbestemmelse**

I fortyndingsmetodens oprindelige udformning (DS/R 254) skulle bestemmelse af ilt foregå titrimetrisk, men i de nu gældende DS/EN metoder (1899-1 og 1899-2) er iltbestemmelse med elektrode også tilladt. En tidligere (1982) vurdering af titrimetrisk iltbestemmelse overfor bestemmelse med elektroder /24/ tyder ikke på, at anvendelse af elektrodebestemmelse i BOD metoden forbedrer analysekvaliteten, men det kan ikke udelukkes, at iltelektroder i moderne udformning i dag anvendes med et bedre resultat end titrimetrisk bestemmelse end tidligere set med den titrimetriske bestemmelse.

### **3.6 Metodevariationer, podemateriale**

Standardisering af podematerialet er tidligere (1980) afprøvet uden held /25/, og tilsvarende negative erfaringer er gengivet i forbindelse med Referencelaboratoriets kontakter indenfor standardisering af BOD metoden.

### **3.7 Alternative metoder**

Ved undersøgelser af drikkevand for bionedbrydeligt opløst kulstof (biodegradable, dissolved organic carbon, BDOC) benyttes måling af opløst organisk kulstof før og efter inkubation med en detektionsgrænse på 0,2-0,3 mg C/L /26/. BDOC kan i mange tilfælde oversættes til indhold af modificeret BOD (iltforbrug alene fra omsætning af organisk stof), men den opgivne detektionsgrænse for BDOC svarer til et BOD på 0,5-0,8 mg/L O<sub>2</sub>. Metoden vil dermed ikke give det ønskede fald i analysedetektionsgrænse.

I undersøgelser af nedbrydningen af organisk stof benyttes ofte opsætning i respirometer, hvor en vandprøves iltforbrug registres kontinuerligt manometrisk eller elektrokemisk, og hvor store mængder prøve kan tages i arbejde. En lavere analysedetektionsgrænse og en bedre præcision kan muligvis opnås ved respirometrisk bestemmelse for prøver af overfladevand.

Der er endvidere udviklet en kuvettemetode baseret på fotometri til måling af BOD på lavt niveau af firma Dr. Lange, hvis potentiale ikke er afklaret.

#### **4. BEHOV FOR METODEUDVIKLING**

På baggrund af metodevurderingen er igangsat udarbejdelse af en analysemetode, der kan anvendes til analyse af spildevand med lavt BOD, med udgangspunkt i:

1. DS/EN 1899-2 uden podning for at opnå en tilstrækkelig lav detektionsgrænse
2. Tilsætning af ATU for at eliminere iltforbrug ved nitrifikation og opnå resultater sammenlignelige med resultater efter 1899-1
3. Mulighed for fortynding op til faktor 2,5 for at opnå et anvendelsesområde fra 0,5 til 15 mg/L O<sub>2</sub>.

## 5. FORSØGSBESKRIVELSE FOR METODEUDVIKLING

Følgende aktiviteter har været en del af udviklingsarbejdet:

1. Undersøgelse af effekt af ATU på BOD på lavt niveau
2. Undersøgelse af effekt af næringssalttilsætning
3. Fastlæggelse af maksimal fortynding uden nedsat mikrobiel omsætning.
4. Udarbejdelse af metodeforskrift baseret på 1-3

Følgende fremgangsmåde er anvendt for alle forsøgene:

Spildevandet blev anbragt i en fortyndingsflaske, i forsøg uden fortynding ca. ½ L, i forsøg med fortynding det volumen, der ville give den ønskede fortynding. Hertil blev sat eventuelle næringssalte og N-allylthiourinstof, ATU, og fortyndingsflasken fyldtes med fortyndingsvand eller prøve op til 1,0 L, afhængig af om der ønskedes en fortynding. For hver fortyndingsflaske blev to inkubationsflasker fyldt til overløb. På hver inkubationsflaske blev indholdet af opløst ilt målt med elektrode (Oximeter OXI 538 fra WTT benyttet som beskrevet i DS 2206), hvorefter prøverne blev anbragt i klimarum ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 5 dage  $\pm$  4 timer. Derefter blev der igen målt opløst ilt med elektrode. For hver inkubationsflaske beregnedes BOD<sub>5</sub> som forskellen i iltindhold for de to målinger. Disse resultaterne betegnes BOD-1 og BOD-2 i bilagene. Resultaterne i denne rapport er af beregningsmæssige årsager angivet med 1-2 flere betydende cifre end de 2 betydende cifre, som metoderne normalt berettiger /15, 16/.

Specifikationer af udstyr og fremstilling af reagenser er nærmere beskrevet i de to standarder DS/EN 1899-1 og DS/EN 1899-2. Enkelte punkter er tydeliggjort nedenfor.

Blindprøver er sat op med fortyndingsvand behandlet og målt som prøverne.

Der er i tabeller angivet en omtrentlig fortyndingsfaktor (eksempelvis 3,5, 286 mL fortyndet til 1,0 L), men i alle beregninger er benyttet den eksakte fortyndingsfaktor (eksempelvis 3,448, 290 mL fortyndet til 1,0 L), som er resultatet af praktiske hensyn under tilrettelæggelse af fortyndingsarbejdet i laboratoriet.

Fortyndingsvand blev iltet til mætning med en peristaltisk pumpe og mætningsgraden kontrolleredes ved iltmåling med elektrode. Til fremstilling af podet fortyndingsvand benyttedes 2-5 ml spildevand fra indløbet til Usserød rensningsanlæg per liter iltet vand. Fortyndingsvand blev fremstillet i 25 og 50 L plastdunke rengjort efter laboratoriets normale procedurer for at fjerne mikroorganismer og organisk stof, der kunne medføre en forhøjelse af blindværdien, samt tungmetaller, der kunne hæmme mikroorganismene i prøverne.

Det certificerede referencemateriale QC WW5 (batch VKI-21-2-0897) benyttedes til at spike prøverne. WW5 er fremstillet af en blanding af glucose og glutaminsyre og er certificeret til et BOD<sub>5</sub> på 2060 mg/L O<sub>2</sub> i stamopløsningen.

Der blev i forsøgene anvendt spildevand fra udløb fra 3 forskellige rensningsanlæg betegnet spildevand 1 til 3 i resten af rapporten. En analyse af det anvendte spildevand gav resultaterne i tabel 5.1.1. Der indhentes spildevand i alt 4 gange, hvor sammensætningen vil have varieret over undersøgelsens forløb.

<b>Tabel 5.1.1 Anvendt spildevand</b>					
	Renseanlæg	Industri-belastning	Orthophosphat (mg/L P)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>3</sub> -N (mg/L N)	Ammonium (mg/L N)
Spildevand 1	Helsingør	Begrænset	0,53	9,2	2,1
Spildevand 2	Usserød	Nej	0,73	3,3	0,036
Spildevand 3	Rundforbi <sup>a</sup>	Nej	0,27	38	0,039

<sup>a</sup>: reenseanlæg uden denitrifikation

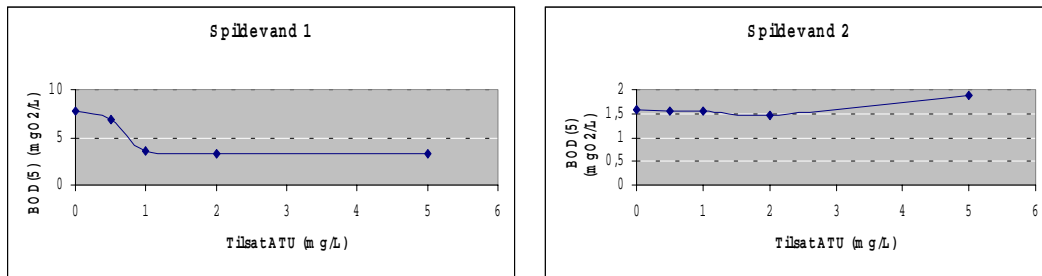
Spildevandet blev udtaget af DHI eftermiddagen før brug, vandet blev grovfiltreret og sat i klimarum. Fortyndingsvand og pudevand blev ligeledes tempereret i klimarummet natten over. På forsøgssdagen blev spildevandsprøverne gennemluftet for at opnå og vedligeholde iltmætning, samt for at opretholde opblanding.

Indledende forsøg viste, at stabilisering ved beluftning natten over ved stuetemperatur gav en så betydelig reduktion i prøvernes BOD<sub>5</sub>, at dette efterfølgende måtte udelades for at sikre tilstrækkeligt høje rest BOD<sub>5</sub> værdier til gennemførelse af de planlagte undersøgelser.

## 6. RESULTATER OG DISKUSSION FOR METODEUDVIKLING

### 6.1 Undersøgelse af effekt af ATU på BOD på lavt niveau

For at undersøge ATU's indflydelse på BOD<sub>5</sub>, blev BOD<sub>5</sub> målt på spildevand fra to af renselanlæggene med varierende ATU tilsætning. Prøverne var ikke tilsat næringssalte (jf. afsnit 5.3.2).



Figur 6.1.1 BOD<sub>5</sub> i to typer spildevand med varierende koncentrationer af ATU

I figur 6.1.1 (enkeltresultater kan ses i bilag 1) ses et fald i BOD<sub>5</sub>, indtil der var tilsat 1 mg/L ATU og antydning indtil en tilsætning på 2 mg/L ATU (ikke statistisk signifikant på 95% konfidensniveau ved en Duncen test /27/). Herefter vurderes BOD<sub>5</sub> at være konstant. Den markante effekt af ATU tilsætning er i overensstemmelse med indholdet af ammonium i spildevand 1 og svarer til de tidligere rapporterede resultater (afsnit 3.1). Der er ikke indikation af en ekstra effekt (hæmning af mikrobiel omsætning eller omsætning af ATU) ved den højeste ATU tilsætning.

For spildevand 2 kunne ikke konstateres en signifikant forskel på de opnåede resultater ved forskellig tilsætning af ATU på et 95%-niveau ved en Duncan test (bilag 2) /27/. For spildevand med lavt indhold af ammonium var der dermed ikke indikation af en effekt (nitrifikationshæmning, hæmning af mikrobiel omsætning eller omsætning af ATU) ved ATU tilsætning.

Det vurderes, i overensstemmelse med DS/EN 1899-2, altid at en tilsætning af 2 mg/L ATU bør anvendes, og det er benyttet i efterfølgende undersøgelser.

### 6.2 Undersøgelse af effekt af næringsstoffilsætning

Næringsstoffilsætningens betydning for BOD<sub>5</sub> blev undersøgt for spildevand fra 2 af renselanlæggene. Der blev tilsat næringssalte til koncentrationer svarende til det foreskrevne i Annex B i DS/EN 1899-2: 1 mL fosfatbuffer opløsning, 1 mL magnesiumsulfat opløsning, 1 mL calciumklorid opløsning og 1 mL jern(III)chlorid opløsning per liter prøvefortynding. Der blev for hvert renselanlæg udført tre dobbeltbestemmelser med og tre dobbeltbestemmelser uden næringsstoffilsætning. For spildevand 1 blev samme forsøg gentaget på to forskellige dage.

<b>Tabel 6.2.1 BOD<sub>5</sub> med og uden næringsstofftilsætning</b>				
<b>Se bilag 3 for enkeltresultater</b>				
Spildevand	Tilsat næringsssalte	BOD <sub>5</sub> (mg/L O <sub>2</sub> )	Standard afvigelse (mg/L O <sub>2</sub> )	Relativ standardafvigelse (%)
Spildevand 1 (10/5-00)	Nej	2,10	0,09	4
	Ja	2,05	0,09	4
Spildevand 1 (24/5-00)	Nej	1,38	0,07	5
	Ja	1,73	0,12	7
Spildevand 3 (10/5-00)	Nej	1,23	0,10	8
	Ja	1,08	0,08	7

For spildevand 1 udtaget d. 10/5 sås ikke statistisk signifikant forskel på 95%-niveau /28/ på resultater opnået med og uden næringsstofftilsætning. For spildevand 1 udtaget d. 24/5 gav næringsssalttilsætning et signifikant højere resultat, mens der for spildevand 3 sås et signifikant lavere resultat med næringsssalttilsætning.

Da der ikke er en éntydig effekt af næringsssalttilsætning, er dette yderligere vurderet i undersøgelserne af effekt af fortynding, afsnit 6.3.

### 6.3 Fastlæggelse af maksimal fortynding uden nedsat mikrobiel omsætning

Indledende undersøgelser af fortynding af prøver gennemførtes med spildevand 1 og 3 med tilsætning af næringsssaltopløsninger til en fast koncentration i de fortyndede prøver, svarende til resultatet af proceduren efter fortyndingsmetoden, DS/EN 1899-1. Der blev anvendt reagensvand til fortynding af prøverne, hvis intet andet er anført. Til beregning af BOD<sub>5</sub> i oprindelig prøve benyttedes (jf. DS/EN 1899-1):

$$(1) \quad BOD_5 = [(C_1 - C_2) - (V_t - V_e) / V_t * (C_3 - C_4)] * V_t / V_e$$

C<sub>1</sub> er opløst ilt ved tiden 0 i mg/L O<sub>2</sub>

C<sub>2</sub> er opløst ilt ved tiden 5 dage i mg/L O<sub>2</sub>

C<sub>3</sub> er koncentrationen af opløst ilt fundet i blindprøve ved tiden 0 i mg/L O<sub>2</sub>.

C<sub>4</sub> er koncentrationen af opløst ilt fundet i blindprøve ved tiden 5 dage i mg/L O<sub>2</sub>.

V<sub>e</sub> er volumen af prøve benyttet til fremstilling af testopløsningen i mL.

V<sub>t</sub> er det totale volumen til fremstilling af testopløsningen i mL.

Resultaterne (tabel 6.3.1) er korrigeret for en BOD<sub>5</sub> blindværdi på 0,23 mg/L O<sub>2</sub> af fortyndingsvandet (formel 1).

<b>Tabel 6.3.1 Genfinding af BOD<sub>5</sub> efter fortynding med næringsssalttilsætning til fast koncentration i de fortyndede prøver, se bilag 4 for enkeltresultater</b>				
Fortynding	Spildevand 1		Spildevand 3	
	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )
0	100	1,91	100	1,48
1,5	131	2,51	89	1,31
2,5	113	2,16	105	1,56
3,5	112	2,14	112	1,66

Spildevandsprøverne er tillige analyseret efter tilsætning af spike svarende til 6,18 mg/L O<sub>2</sub>. Resultaterne (tabel 6.3.2) er korrigeret for en BOD<sub>5</sub> blindværdi på 0,23 mg/L O<sub>2</sub> af fortyndingsvandet (formel 1), og genfindning er beregnet i forhold til analyseresultatet for den ufortyndede prøve tillagt spikeværdien på 6,18 mg/L O<sub>2</sub>.

<b>Tabel 6.3.2 Genfindning af BOD<sub>5</sub> efter fortynding af spikede prøver med næringssalttilsætning til fast koncentration i de fortyndede prøver, se bilag 5 for enkeltresultater</b>				
	Spildevand 1		Spildevand 3	
Fortynding	Genfindning (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )	Genfindning (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )
0 *	100	8,32	100	7,66
1,5	101	8,34	102	7,79
2,5	102	8,37	109	8,34
3,5	105	8,66	113	8,66

Der er ikke gennemført statistisk test af signifikansen af forskelle imellem resultaterne for de forskellige variationer, idet der kun foreligger 2 måleresultater for hver variation.

Resultaterne (tabel 6.3.1) for de uspikede prøver viste stigende genfindning med stigende fortynding, men de målte BOD<sub>5</sub> efter fortynding lå tæt på detektionsgrænsen, og disse prøver ville normalt ikke give anledning til fortynding. Resultaterne er derfor behæftet med en relativt høj analyseusikkerhed. Resultaterne (tabel 6.3.2) for de spikede prøver viser dog ligeledes en stigende tendens, omend ikke i samme grad som for de uspikede prøver. Disse resultater tyder på, at blindværdien estimeret ved inkubering af reagensvand tilsat næringsstoffer, men uden podning med mikroorganismer, kunne give en for lille blindkorrektion.

Genfindingen af den tilsatte spikning er beregnet (tabel 6.3.3) for hver fortynding ved at trække resultatet for den uspikede prøve fra resultatet for den spikede prøve. Hermed korrigeres for blindbidrag fra fortyndingsvand og næringsstofftilsætning i prøver, der indeholder samme mikroorganismer, og hvor omsætningen foregår under samme betingelser, som i de fortyndede prøver.

<b>Tabel 6.3.3 Genfindning af BOD<sub>5</sub> spike i prøver med næringssalttilsætning til fast koncentration i de fortyndede prøver, se bilag 6 for enkeltresultater</b>				
	Spildevand 1		Spildevand 3	
Fortynding	Genfindning (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )	Genfindning (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )
1,5	94	5,84	105	6,48
2,5	101	6,21	110	6,79
3,5	105	6,52	113	7,00

Resultaterne (6.3.3) viser samme stigende tendens for genfindning med stigende fortynding, som sås for vurderingen af uspikede prøver og spikede prøver. Det må dermed konkluderes, at den stigende tendens ikke skyldes, at den benyttede blindkorrektion er for lille. Den stigende tendens kan muligvis forklares ved en øget næringsstofftilsætning relativt til såvel organisk stof, som til mikroorganismernes biomasse med fortynding med den hidtil benyttede procedure for næringsstofftilsætning (tilsætning til fast koncentration i fortyndet prøve).

Resultaterne for uspiket og spiket spildevand (tabellerne 6.3.1, 6.3.2 og 6.3.3) tyder ikke på, at fortynding op til faktor 3,5 medfører en lavere mikrobiel aktivitet, som påvirker BOD resultatet. Det vurderes derudover, at den benyttede metode til blindkorrektion er et tilfredsstillende

estimat af fortyndingsvandets bidrag til BOD<sub>5</sub>, som kan benyttes i metoden. Den benyttede blindkorrektion svarer til det, der kan benyttes ved analyse for ultimate BOD /18/.

Spildevand 1 tilsat en spikning på 12,3 mg/L O<sub>2</sub> analyseredes derefter med tilsætning af næringssalte i fast koncentration relativt til oprindelig prøve, uden næringssalttilsætning, samt ved fortynding med podet fortyndingsvand (2 mL/L podevand) og næringsstofftilsætning. Analyser uden næringssalttilsætning gennemførtes ad 2 omgange først og sidst på en arbejdsdag. Resultaterne (tabel 6.3.4) er korrigeret for en BOD<sub>5</sub> blindværdi opnået for relevant fortyndingsvand og tilsætning (formel 1), og genfinding er beregnet i forhold til analyseresultatet for den ufortyndede prøve tillagt spikeværdien på 12,3 mg/L O<sub>2</sub>.

Genfindingen var for alle analyser af fortynding gange 1,5 lav, fordi al oxygen var forbrugt efter 5 dage. Disse resultater indgår derfor ikke i vurderingen.

Resultaterne (tabel 6.3.4) viste, at der ikke var forskel på analyseresultater opnået først og sidst på dagen, hvorfor spildenvandsprøven må anses at have været tilstrækkeligt stabil til at tillade gennemførelse af metodevalidering henover én arbejdsdag.

Det ses endvidere (tabel 6.3.4), at næringssalttilsætning antydningvist gav højere BOD<sub>5</sub>, mens næringssalttilsætning og podning gav endnu lidt højere værdier. Såvel med næringsstofftilsætning til fast koncentration i de oprindelige prøver, som uden næringsstofftilsætning var genfindingen under 100%, men igen antydningvist stigende med stigende fortynding (sammenlign tabel 6.3.1 og 6.3.2). Resultaterne tyder på, at en variabel næringssalttilsætning påvirker analyseresultatet for BOD<sub>5</sub>, men at påvirkningen ikke kan elimineres ved at benytte tilsætning til fast koncentration i den oprindelige prøve.

<b>Tabel 6.3.4 Genfinding af BOD<sub>5</sub> efter fortynding af spikede prøver med og uden næringssalttilsætning til fast koncentration i de oprindelige prøver, se bilag 7 for enkeltresultater</b>				
	Spildevand 1 (uden næringssalt)		Spildevand 1 (uden næringssalt)	
Fortynding	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )
0	100	13,69	100	13,75
1,5 <sup>a</sup>	88	12,11	90	12,43
2,5	93	12,79	94	12,86
3,5	95	12,97	97	13,30
	Spildevand 1 (med næringssalt)		Spildevand1(næringssalt + podning)	
Fortynding	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )
0	100	14,03	(100) <sup>c</sup>	13,62 <sup>b</sup>
1,5 <sup>a</sup>	90	12,58	(92) <sup>c</sup>	12,48
2,5	95	13,35	(108) <sup>c</sup>	14,66
3,5	96	13,53	(106) <sup>c</sup>	14,40

<sup>a</sup> : ingen opløst oxygen efter 5 dage

<sup>b</sup>: opnået uden podning

<sup>c</sup>: genfinding fejlbehæftet, se tekst

For spildevand podet og tilsat næringssalte kan genfinding ikke beregnes retvisende. Koncentrationen af BOD<sub>5</sub> i ufortyndet spildevand var opnået uden podning, og da podning tilfører iltforbrugende organisk stof, er ikke opnået en sammenlignelig værdi for den ufortyndede prøves BOD<sub>5</sub> inklusive podevandsbidrag.

Genfindingen af den tilsatte spikning er derfor beregnet (tabel 6.3.5) for hver fortynding ved at trække resultatet for den uspikede prøve fra resultatet for den spikede prøve. Hermed korrigeres for blindbidrag fra fortyndingsvand, podvand og næringsstofftilsætning i prøver.

<b>Tabel 6.3.5 Genfinding af BOD<sub>5</sub> spike i prøver med næringssalttilsætning til fast koncentration i de oprindelige prøver, se bilag 8 for enkeltresultater</b>				
	Spildevand 1 (uden nærings salt)		Spildevand 1 (uden nærings salt)	
Fortynding	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )
1,5 <sup>a</sup>	89	10,98	90	11,02
2,5	95	11,66	95	11,63
3,5	95	11,74	96	11,78
	Spildevand 1 (med nærings salt)		Spildevand 1 (nærings salt + podning)	
Fortynding	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )	Genfinding (%)	Beregnet (mg/L O <sub>2</sub> )
1,5 <sup>a</sup>	92	11,33	85	10,44
2,5	101	12,40	109	13,35
3,5	104	12,78	107	13,21

<sup>a</sup>: ingen opløst oxygen efter 5 dage

Resultaterne (tabel 6.3.5) viser, at tilsat spike blev genfundet 95-96% uden tilsætning af næringsalte, men 101-104% med tilsætning af næringsalte til fast koncentration i den oprindelige prøve. Det ses endvidere, at podning øgede genfindingen til 107-109%. Der er ingen klar indikation af, at genfindingen varierede med fortyndingsgraden.

Det vurderes derfor, at næringsstofftilsætning ikke giver en klar forbedring af genfindingen, hvorfor den ikke medtages i den endelige metode. Det vurderes endvidere, at fortynding op til faktor 3,5 kan benyttes uden at forringe genfindingen af prøvernes BOD<sub>5</sub>.

#### 6.4 Sammenfatning af metodeudvikling

Som et resultat af metodeudviklingen er fastlagt en tilsætning af 2 mg/L ATU per L fortyndet prøve, ingen tilsætning af næringsalte og en tilladelig fortynding op til faktor 3,5.

## **7. UDARBEJDELSE AF METODEFORSKRIFT**

På baggrund af de to standardmetoder DS/EN 1899-1 og DS/EN 1899-2, samt den gennemførte metodeudvikling er udarbejdet et metodeforslag, som i det efterfølgende vil blive benævnt DS/EN 1899-2 (NY). Metodeforslaget er revideret efter gennemførelsen af metodevalideringen og er gengivet i Bilag 9.

## 8. FORSØGSBESKRIVELSE FOR METODEVALIDERING OG METODESAMMENLIGNING

Den udviklede metode er valideret med hensyn til præcision, rigtighed og analysedetektionsgrænse og sammenlignet med fortyndingsmetoden 1899-1. Resultaterne er efterfølgende samlet og vurderet.

Metodevalideringen er gennemført efter ”Håndbog i metodevalidering for miljølaboratorier” /29/ og giver et mål for præcisionen, rigtigheden og analysedetektionsgrænsen. Der blev ikke udført analyser for kontrol af linearitet. En metodevalideringen blev gennemført for DS/EN 1899-1 og for metoden DS/EN 1899-2 (NY). Inkubationstiden var 5 dage for begge metoder. Spildevand 1 og 2 blev benyttet til valideringen (afsnit 5.3.6).

Et analyseprogram bestående af 6 analyseserier blev udført samtidigt for de to metoder (tabel 8.1). Fortyndingsvandet er podet med indløbsvand fra Usserød Renseanlæg (5 ml/L) med næringssalttilsætning efter DS/EN 1899-1 og er iltmættet reagensvand uden podning næringssalttilsætning efter DS/EN 1899-2 (NY).

Prøve-nummer	Prøvebeskrivelse	Forventet BOD <sub>5</sub>	DS/EN 1899-1 (antal/serie)	DS/EN 1899-2 (NY) (antal/serie)
1	Spildevand 1	ca. 1 mg/L O <sub>2</sub>	2	2
2	Spildevand 2	ca. 1 mg/L O <sub>2</sub>	2	2
3	Kvalitetskontrol	ca. 4 mg/L O <sub>2</sub>	2	2
4	Spildevand 1 + spike 1	ca. 6 mg/L O <sub>2</sub>	2	2
5	Spildevand 2 + spike 2	ca. 12 mg/L O <sub>2</sub>	2	2
6	Spildevand 1 + spike 3	ca. 15 mg/L O <sub>2</sub>	2	2
7	Fortyndingsvand	<1 mg/L O <sub>2</sub>	2	2

Hver analyseserie blev gentaget 6 gange (betegnes A, B, C, ... F i bilag). Mellem hver analyseserie blev oxygenmetret recalibreret for derved at simulere en ”dag til dag” variation. Det var ikke muligt at gennemføre analyseserierne over flere dage, da prøverne ikke var stabile, men resultater opnået under metodeudviklingen viste, at prøverne kan forventes at være stabile over én dag (afsnit 6.3). Alle analyserne blev udført i samme klimarum (20±1°C). Hver analyseserie (A, B, C, ... F) blev udført samtidigt for de to metoder.

Målingerne blev gennemført som beskrevet i afsnit 5, samt i standarden DS/EN 1899-1 og metodeforskriften for DS/EN 1899-2 (NY) (bilag 9).

Mens prøverne 1 og 2 var spildevand uden spike, blev prøve 3 fremstillet ved at sætte 1 mL af næringssaltopløsningerne pr. liter til reagensvand, spike med referencemateriale QC WW5 svarende til et spike på 4,12 mg/L O<sub>2</sub> og tilsætte podevand (5 mL per liter prøve). Prøverne 4, 5 og 6 var spildevand som angivet tilsat referencemateriale QC WW5 svarende til spikes på henholdsvis 5,15; 11,33 og 13,39 mg/L O<sub>2</sub>.

Genfindingen af tilsat spike som anført i bilagene er fundet som forskellen mellem den opnåede BOD<sub>5</sub> værdi for prøverne og BOD<sub>5</sub> fra henholdsvis podevandet (prøve 3) eller fra spildevandet uden spike (prøve 4, 5 og 6).

## 9. RESULTATER OG DISKUSSION FOR METODEVALIDERING OG METODESAMMENLIGNING

Bilag 10 viser i detaljer analyseresultaterne opnået ved de to metoder. Metodevalideringsrapporten som udregnet med programmet MetVal (VKI, Version 1.1, 16/7-99), er vist i bilag 11. Resultaterne af statistisk sammenligning (test for ens varianser, t-test på 95% konfidensinterval /28, 30/) er vist i bilag 12.

Tabel 9.1 viser en opsummering af resultaterne i bilag 10 til 12.

Tabel 9.1 Nøgletal fra metodevalideringen		
	DS/EN 1899-1	DS/EN 1899-2 (NY)
Detektionsgrænse (mg/L O <sub>2</sub> ) beregnet ud fra spildevand 1	0,4	0,5
Detektionsgrænse (mg/L O <sub>2</sub> ) beregnet ud fra spildevand 2	0,2 <sup>c</sup>	0,3 <sup>c</sup>
Repetérbarhed (%)	3,2-4,9	3,7-8,4
Reproducerbarhed (%) <sup>a</sup>	-18	-12
Genfindingsinterval (%)	95-118	94-125
Spildevand 1 (mg/L O <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>	1,72 ± 0,30	1,27±0,18
Spildevand 2 (mg/L O <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>	1,09 ± 0,10	0,88±0,07
Kvalitetskontrol (mg/L O <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>	5,1 ± 0,15 (112%) <sup>d</sup>	4,6±0,22 (100%) <sup>d</sup>
Spildevand 1 +spike 1 (mg/L O <sub>2</sub> )	7,2 ± 0,25 (105%) <sup>d</sup>	7,1±0,34 (113%) <sup>d</sup>
Spildevand 2 +spike 2 (mg/L O <sub>2</sub> )	12,8 ± 0,44 (103%) <sup>d</sup>	13,0±0,50 (107%) <sup>d</sup>
Spildevand 1 +spike 3 (mg/L O <sub>2</sub> )	15,3 ± 0,64 (102%) <sup>d</sup>	15,0±0,53 (102%) <sup>d</sup>

<sup>a</sup>: standardafvigelse inden for dagen (repetérbarhed) er for nogle prøver større end standardafvigelsen mellem dagene (reproducerbarhed). Derfor angives ingen laveste værdi.

<sup>b</sup>: angiver, at resultaterne fra de to metoder er fundet statistisk signifikant forskellige (95% niveau) se beregning i bilag 12.

<sup>c</sup>: udregnes ikke af MetVal, men er beregnet tilsvarende i regneark.

<sup>d</sup>: genfinding af tilsat spike.

Det fremgår af tabel 9.1, at detektionsgrænserne, repetérbarheden, reproducerbarheden og genfindingen af tilsat spike for de to metoder er sammenlignelige. Resultaterne opnået efter DS/EN 1899-1 er statistisk signifikant højere (95% konfidensniveau) end resultaterne opnået med DS/EN 1899-2 (NY) for analyse af de to spildevandsprøver og kontrolprøven. Det skal bemærkes, at genfindingen af tilsat spike er 102-107% også for analyse efter DS/EN 1899-2 (NY), hvor prøverne er fortyndet.

Antages en realistisk detektionsgrænse på 0,5 mg/L O<sub>2</sub>, vil ingen af de 2 metoder kunne tilfredsstille kravene til maximal total standardafvigelse  $s_{Tmax}$  i måleområdet 3-15 x  $s_{Tmax}$  på 0,15 mg/L O<sub>2</sub> for overfladevand til drikkevand og for fersk overfladevand (tabel 2.1.1), men tilfredsstiller begge kravene for salt overfladevand (0,5 mg/L O<sub>2</sub>), spildevand og perkolat (1 mg/L O<sub>2</sub>). Kravene til højest relativ standardafvigelse i måleområdet over 15 x  $s_{Tmax}$  på 5% for alle vandtyper (fra 1. september 2000) overholdes for begge metoder. Kravene til genfinding af nominal værdi på 100±20% (ligeledes fra 1. september 2000) overholdes for begge metoder. Kravene til analysedetektionsgrænse for BOD i NOVA 2003 (tabel 2.1.2) på 0,5-2 mg/L O<sub>2</sub> overholdes for begge metoder. Analysedetektionsgrænsekravene afledt af krav til BOD (tabel 2.1.3) i overfladevand til drikkevand, i fersk overfladevand og ved ferskvandsdambrug på 0,1-

0,3 mg/L O<sub>2</sub> vurderes ikke at være generelt opnåelig med de 2 metoder, mens begge metoder kan opfylde kravet til detektionsgrænser for spildevand.

I forhold til målsætningen for metodeudviklingen (afsnit 2.1) kan såvel fortyndingsmetoden efter DS/EN 1899-1, som den udviklede metode DS/EN 1899-2 (NY) opfylde detektionsgrænsekravet på 0,5 mg/L O<sub>2</sub>, kravet til relativ standardafvigelse på højst 5% over over 15 x s<sub>Tmax</sub>, samt kravet til genfinding af nominel værdi på 100±20%, men ingen af de to metoder tilfredsstillende kravet om maximal total standardafvigelse s<sub>Tmax</sub> i måleområdet 3-15 x s<sub>Tmax</sub> på 0,15 mg/L O<sub>2</sub>.

Det er tidligere i præstationsprøvninger fundet (afsnit 2.2), at fortyndingsmetoden, DS/EN 1899-1, ikke i praksis og generelt kan anvendes med en tilfredsstillende detektionsgrænse. Den udviklede metode uden fortynding, DS/EN 1899 (NY), benytter ikke pudevand og næringssalttilsætning, hvorfor den må anses for mere enkel og kan muliggøre en lavere detektionsgrænse i generel anvendelse. Det skal bemærkes, at DHI i DS/EN 1899-1 benytter en lav tilsætning af pudevand til fortyndingsvandet (2-5 mL/L), sammenlignet med forskriftens anvisning på 5-20 mg/L. Dette kan være en del af årsagen til den bedre præcision og den lavere detektionsgrænse opnået med DS/EN 1899-1 i denne undersøgelse, sammenlignet med resultaterne opnået tidligere i præstationsprøvninger.

## 10. SAMMENFATNING OG ANBEFALINGER

Der er udviklet en modifikation, DS 1899-2 (NY) af standardmetoden til bestemmelse af biokemisk iltforbrug, BOD, uden fortynding, DS/EN 1899-2, som normalt anvendes til recipientvand. Modifikationen anvender tilsætning af ATU til undertrykkelse af nitrifikation, samt tillader en fortynding op til faktor 3,5 med rent vand.

Den modificerede metode gav i en metodevalidering og -sammenligning samme præcision og genfinding af tilsat BOD som fortyndingsmetoden DS/EN 1899-1, der normalt anvendes til spildevand. Den modificerede metode gav dog lavere resultater end fortyndingsmetoden ved analyse af spildevand med lavt indhold af BOD, samt ved analyse af podet kontrolprøve. Den enklere opbygning af den modificerede metode kan muligvis medføre en lavere detektionsgrænse og bedre præcision i praktisk og generel anvendelse, end det der hidtil er set med fortyndingsmetoden.

Det anbefales derfor at gennemføre en interlaboratorie metodeundersøgelse, hvor de to metoder benyttes parallelt, således at den bedst egnede metode kan udvælges. Supplerende kan indledningsvis foreslås at gennemføre en begrænset, parallel anvendelse af de to analysemetoder for et eller nogle få renseanlæg på ét laboratorium.

## 11. REFERENCER

- /1/ Miljø- og Energiministeriets bekendtgørelse nr. 637 af 30. juni 1997: Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger udført af akkrediterede laboratorier, certificerede personer mv.
- /2/ Miljøstyrelsen (1999): Nationalt Program for Overvågning af Vandmiljøet 1998-2003 "NOVA 2003", Programbeskrivelse.
- /3/ Miljø- og Energiministeriets bekendtgørelse nr. 162 af 29. april 1980: Bekendtgørelse vedrørende kvalitetskrav m.v. til overfladevand, som anvendes til fremstilling af drikkevand.
- /4/ Vejledning fra Miljøstyrelsen nr. 1 af januar 1983: Vejledning i recipientkvalitetsplanlægning, Del 1, Vandløb og Søer.
- /5/ Miljø- og Energiministeriets bekendtgørelse nr. 224 af 5. april 1989: Bekendtgørelse om ferskvandsdambrug.
- /6/ Miljø- og Energiministeriets bekendtgørelse nr. 310 af d. 25. april 1994: Bekendtgørelse om spildevandstilladelse m.v. efter miljøbeskyttelseslovens kapitel 3 og 4.
- /7/ Skatteministeriets lov nr. 490 af 12. Juni 1996: Lov om afgift af spildevand.
- /8/ Miljø- og Energiministeriet (1998): Orientering fra Miljøstyrelsen, Punktkilder 1997.
- /9/ Miljø- og Energiministeriet (1985): Miljøprojekt nr. 63, Anvendelse af analyseresultater ved vandkontrol.
- /10/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1990): Dambrugsinterkalibrering.
- /11/ Vandkvalitetsinstituttet ATV (1984): Håndbog i intern kvalitetskontrol på vandlaboratorier.
- /12/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1994): Præstationsprøvning 1994/2, Fersk overfladevand.
- /13/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1999): Præstationsprøvning VKI-MAR-4, Næringsstoffer i marint vand.
- /14/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1995): Præstationsprøvning 1995/2, Organisk stof i spildevand.
- /15/ DS/EN 1899-1 (1999): Vandundersøgelse, Biokemisk oxygenforbrug over n døgn, (BOD<sub>n</sub>), Del 1: Fortyndingsmetode med podning og tilsætning af N-allylthiourinstof.
- /16/ DS/EN 1899-2 (1999): Vandundersøgelse, Biokemisk oxygenforbrug over n døgn, (BOD<sub>n</sub>), Del 1: Metode uden fortynding.
- /17/ DS/R 254 (1977): 5-døgns biokemisk oxygenforbrug (BOD).

- /18/ American Public Health Association (1999): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> Edition.
- /19/ Association of Official Analytical Chemists (1990): Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> Edition.
- /20/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1992): Interlaboratory comparison no. 46: 1992, BOD<sub>5</sub>, BOD<sub>7</sub>, BOD<sub>2+5</sub>, COD<sub>Cr</sub>, NVOC and DOC in fresh surface water.
- /21/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1992): Modifikationer af BOD-bestemmelser efter DS/R 254 til brug for analyse af afløbsvand fra spildevandsanlæg, en metodevurdering.
- /22/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1987): Interkalibrering 36:1987, Biokemisk iltforbrug over 5 døgn umodificeret og modificeret i ufordyndet recipientvand.
- /23/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1992): Interkalibrering 44:1991, Biokemisk oxygenforbrug over 5 døgn, modificeret, kemisk oxygenforbrug med kaliumdichromat og ikke flygtigt organisk kulstof i syntetiske prøver og spildevand.
- /24/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1982): Interkalibrering 23:1982, Opløst ilt.
- /25/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1980): Bestemmelse af modificeret biokemisk iltforbrug.
- /26/ DHI Institut for vand og miljø (2000): Rapport til Miljøstyrelsen (Vandfonden), 1. Udkast dateret 16. januar 2000, Undersøgelser af en række drikkevandstypers evne til mikrobiologisk vækst ved laboratorieforsøg.
- /27/ Montgomery, D.C. (1997): Design and analysis of experiments, 4<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons.
- /28/ Dansk Standardiseringsråd (1980): DS/ISO 2854 Estimationsmetoder og test for middelværdier og varianser.
- /29/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium (1994): Håndbog i metodevalidering for miljølaboratorier.
- /30/ Conradsen, K. (1984): En introduktion til statistik. IMSOR, DTU.

## Bilag 1 ATU undersøgelse

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

### Spildevand 1

Tilsat ATU mg/L	Middelv.	BOD-1	BOD-2
0	7,82	7,79	7,84
0,5	6,81	6,69	6,92
1	3,60	3,63	3,57
2	3,29	3,32	3,26
5	3,36	3,29	3,42

### Spildevand 2

Tilsat ATU mg/L	Middelv.	BOD-1	BOD-2
0	1,58	1,48	1,67
0,5	1,56	1,27	1,84
1	1,54	1,72	1,36
2	1,46	1,62	1,30
5	1,89	1,87	1,91

## Bilag 2 Statistisk undersøgelse af ATU tilsætning

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

Duncan's multiple range test til identifikation af tal, der er signifikant forskellige.

Spildevand 1

tilsat ATU	Gen.snit.	0 mod	TEST	0,5 mod	TEST	1 mod	TEST	5 mod	TEST
2	3,29	4,375	>0,69	3,515	>0,68	0,31	<0,66	0,045	<0,63
5	3,335	4,33	>0,68	3,47	>0,66	0,265	<0,63		
1	3,6	4,065	>0,66	3,205	>0,63				
0,5	6,805	0,86	>0,63						
0	7,665								

Til beregning af teststørrelser bruges:

SS T	35,9680
SS treat	35,8683
SS E	0,0997
f E	4
MSE	0,0249

Konklusion: Resultaterne fra tilsætning af 0 og 0,5 mg/L ATU blev ved Duncan's test fundet signifikant forskellige (95% niveau) fra hinanden og de resterende analyseresultater, da alle forskelle var større en teststørrelsen.

Resultaterne fra tilsætning af 1, 2 og 5 mg/L ATU blev ved Duncan's test fundet ikke signifikant forskellige (95% niveau) da alle alle forskelle var mindre en teststørrelsen.

Spildevand 2

tilsat ATU	Gen.snit.	5 mod	TEST	0 mod	TEST	0,5 mod	TEST	1 mod	TEST
2	1,46	0,43	<3,76	0,115	<3,72	0,095	<3,63	0,08	<3,47
1	1,54	0,35	<3,72	0,035	<3,63	0,015	<3,47		
0,5	1,555	0,335	<3,63	0,02	<3,47				
0	1,575	0,315	<3,47						
5	1,89								

Til beregning af teststørrelser bruges:

SS T	0,51704
SS treat	0,21974
SS E	0,2973
f E	4
MSE	0,074325

Konklusion: Ingen tal blev ved Duncan's test fundet signifikant forskellige (95% niveau) fra hinanden da alle forskelle var mindre en teststørrelsen.

### Bilag 3 Næringssalttilsætning

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

#### Spildevand 1 (10/5-00)

Næringssalt	Middelv.	BOD-1	BOD-2	Middelv.	Sd
nej	2,14	2,12	2,15		
nej	2,17	2,16	2,17	2,10	0,09
nej	1,99	1,96	2,02		
ja	2,09	2,12	2,05		
ja	2,10	2,20	1,99	2,05	0,09
ja	1,98	2,00	1,95		

Undersøgelse af standard afvigelse

$$S_{ak1} = 0,05485$$

$$S_{ak2} = 0,04348333$$

$$s_1^2 = 0,01097$$

$$s_2^2 = 0,00869667$$

$$s_1^2 / s_2^2 = 1,2614028$$

$$F(1-\alpha/2, v_1, v_2) = F(0,975; 5; 5) = 7,15$$

Da  $s_1^2 / s_2^2$  ikke er  $< 1/F$  og  $s_1^2 / s_2^2$  ikke er  $> F$  er standard afvigelseerne statistisk set ens (95% niveau)

Undersøgelse af værdier

$$S_d = 0,02560382$$

$$\text{gennemsnit1-gennemsnit2} = 0,045$$

$$t(1-\alpha/2, v) = t(0,975, 10) = 2,288$$

$$t(1-\alpha/2, v) * S_d = 0,058582$$

Da  $\text{gennemsnit1-gennemsnit2} < t(1-\alpha/2, v) * S_d$  er de to gennemsnit statistisk set ens

### Bilag 3 Næringssalttilsætning

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

#### Spildevand 3 (10/5-00)

Næringssalt	Middelv.	BOD-1	BOD-2	Middelv.	Sd
nej	1,11	1,12	1,10		
nej	1,26	1,27	1,24	1,23	0,10
nej	1,34	1,34	1,33		
ja	1,02	0,96	1,07		
ja	1,09	1,16	1,01	1,08	0,08
ja	1,13	1,14	1,11		

Undersøgelse af standard afvigelse

$$S_{k1} = 0,05273$$

$$S_{k2} = 0,03015$$

$$s_1^2 = 0,01055$$

$$s_2^2 = 0,00603$$

$$s_1^2 / s_2^2 = 1,7490$$

$$F(1-\alpha/2, v_1, v_2) = F(0,975; 5; 5) = 7,15$$

Da  $s_1^2 / s_2^2$  ikke er  $< 1/F$  og  $s_1^2 / s_2^2$  ikke er  $> F$  er standard afvigelseerne statistisk set ens (95% niveau)

Undersøgelse af værdier

$$S_d = 0,02351$$

$$\text{gennemsnit1-gennemsnit2} = 0,1583$$

$$t(1-\alpha/2, v) = t(0,975, 10) = 2,288$$

$$t(1-\alpha/2, v) * S_d = 0,05378$$

Da  $\text{gennemsnit1-gennemsnit2} > t(1-\alpha/2, v) * S_d$  er de to gennemsnit statistisk set forskellige

### Bilag 3 Næringssalttilsætning

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O2/L

#### Spildevand 1 (24/5-00)

Næringssalt	Middelv.	BOD-1	BOD-2	Middelv.	Sd
nej	1,38	1,39	1,37		
nej	1,32	1,37	1,27	1,38	0,07
nej	1,44	1,39	1,49		
ja	1,61	1,68	1,53		
ja	1,84	1,86	1,81	1,73	0,12
ja	1,75	1,73	1,77		

Undersøgelse af standard afvigelse

$$S_{k1} = 0,0246$$

$$S_{k2} = 0,0674$$

$$s_1^2 = 0,00492$$

$$s_2^2 = 0,01348$$

$$s_1^2 / s_2^2 = 0,3650$$

$$F(1-\alpha/2, v_1, v_2) = F(0,975; 5; 5) = 7,15$$

Da  $s_1^2 / s_2^2$  ikke er  $< 1/F$  og  $s_1^2 / s_2^2$  ikke er  $> F$  er standard afvigelseerne ikke statistisk signifikant forskellige (95% niveau)

Undersøgelse af værdier

$$S_d = 0,02477$$

$$\text{gennemsnit1-gennemsnit2} = -0,35$$

$$t(1-\alpha/2, v) = t(0,975, 10) = 2,288$$

$$t(1-\alpha/2, v) * S_d = 0,0567$$

Da  $\text{gennemsnit1-gennemsnit2}$  numerisk  $> t(1-\alpha/2, v) * S_d$  er de to gennemsnit statistisk signifikant forskellige

## Bilag 4 Fortynding af prøver

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

### Spildevand 1

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
0	1,91	100	1,93	1,89
1,5	2,51	131	1,74	1,77
2,5	2,16	113	0,94	1,06
3,5	2,14	112	0,77	0,80

### Spildevand 3

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
0	1,48	100	1,48	1,48
1,5	1,31	89	0,91	1,00
2,5	1,56	105	0,76	0,76
3,5	1,66	112	0,60	0,69

## Bilag 5 Fortynding af spikede prøver

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

### Spildevand 1

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
1,5	8,34	101	5,73	5,60
2,5	8,37	102	3,41	3,56
3,5	8,66	105	2,67	2,68

### Spildevand 3

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
1,5	7,79	102	5,08	5,51
2,5	8,34	109	3,45	3,50
3,5	8,66	113	2,67	2,68

## Bilag 6 Beregning af spike (6,18 mg O<sub>2</sub>/L)

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

### Spildevand 1

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1 med spike	BOD-2 med spike	BOD-1	BOD-2
1,5	5,84	94	5,73	5,60	1,74	1,77
2,5	6,21	101	3,41	3,56	0,94	1,06
3,5	6,52	105	2,67	2,68	0,77	0,80

### Spildevand 3

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1 med spike	BOD-2 med spike	BOD-1	BOD-2
1,5	6,48	105	5,08	5,51	0,91	1,00
2,5	6,79	110	3,45	3,50	0,76	0,76
3,5	7,00	113	2,67	2,68	0,60	0,69

## Bilag 7 Fortynding af spikede prøver

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

### Spildevand 1 (uden nærings salt)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
1,5	12,11	88	8,36	8,32
2,5	12,79	93	5,60	5,46
3,5	12,97	95	4,25	4,25

### Spildevand 1 (uden nærings salt)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
1,5	12,43	90	8,52	8,44
2,5	12,86	94	5,46	5,38
3,5	13,30	97	4,17	4,20

### Spildevand 1 (med nærings salt)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
1,5	12,58	90	8,64	8,67
2,5	13,35	95	5,80	5,71
3,5	13,53	96	4,48	4,35

### Spildevand 1 (med nærings salt+ podning)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1	BOD-2
1,5	12,48	92	8,60	8,57
2,5	14,66	108	6,28	6,26
3,5	14,40	106	4,65	4,67

## Bilag 8 Beregning af spike (12,3 mg O<sub>2</sub>/L)

Hvis intet andet er anført er resultaterne i mg O<sub>2</sub>/L

### Spildevand 1 (uden nærings salt)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1 med spike	BOD-2 med spike	BOD-1	BOD-2
1,5	10,98	89	8,36	8,32	1,05	0,92
2,5	11,66	95	5,60	5,46	0,78	0,95
3,5	11,74	95	4,25	4,25	0,91	0,78

### Spildevand 1 (uden nærings salt)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1 med spike	BOD-2 med spike	BOD-1	BOD-2
1,5	11,02	90	8,52	8,44	1,03	1,16
2,5	11,63	95	5,46	5,38	0,75	0,79
3,5	11,78	96	4,17	4,20	0,79	0,75

### Spildevand 1 (med nærings salt)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1 med spike	BOD-2 med spike	BOD-1	BOD-2
1,5	11,33	92	8,64	8,67	1,16	0,97
2,5	12,40	101	5,80	5,71	0,82	0,77
3,5	12,78	104	4,48	4,35	0,80	0,62

### Spildevand 1 (med nærings salt+ podning)

Fortyndingsfaktor	Beregnet BOD	Genfinding (%)	BOD-1 med spike	BOD-2 med spike	BOD-1	BOD-2
1,5	10,44	85	8,6	8,57	1,63	1,55
2,5	13,35	109	6,28	6,26	0,94	0,92
3,5	13,21	107	4,65	4,67	0,89	0,77

Miljøstyrelsens Referencelaboratorium	Metode: Side 1 af 5
<b>BOD<sub>5</sub> på lavt niveau</b>	Første udkast, maj 2000, revideret 30. juni Udfærdiget af: Anders Favrbø og Christian Grøn

## **Bilag 9 metodeudkast**

### **Udkast til metodeforskrift for BOD<sub>5</sub> analyser på lavt niveau.**

#### **1. Omfang og anvendelsesområde**

Denne metode beskriver måling af biokemisk oxygenforbrug med en inkubationstid på 5 dage (BOD<sub>5</sub>) i spildevand fra udløb af rensningsanlæg.

Metoden er anvendelig for måling af BOD<sub>5</sub> fra 0,5-15 mg/L O<sub>2</sub>.

##### **1.1 Detektionsgrænse**

Detektionsgrænsen er 0,5 mg/L O<sub>2</sub>

##### **1.2 Interferenser**

Interferenser i forbindelse med iltmålingen er beskrevet i DS/EN 25814, mens interferenser for BOD bestemmelsen er beskrevet i DS/EN 1899-1.

#### **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 ilt bestemmes før og efter inkubationen. Det biokemiske iltforbrug beregnes ud fra forskellen i koncentrationen af opløst ilt. Prøven kan fortyndes 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 BOD<sub>5</sub> mindre end 0,2 mg/L O<sub>2</sub> og kan være fra et Milli-Q anlæg fra Millipore eller tilsvarende kvalitet.

##### **3.1 Allylthiourea (ATU) opløsning, 1 g/L**

Opløs 200 mg allylthiourea (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>S) i 200 ml vand 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.

##### **3.3 Kontrolstamopløsning**

Certificeret referencemateriale QC WW5 (batch VKI-21-2-0897) fremstillet af en blanding af glucose og glutaminsyre og certificeret til et BOD<sub>5</sub> på 2060 mg/L O<sub>2</sub> i stamopløsningen eller tilsvarende.

#### **4. Udstyr**

Der skal anvendes almindeligt laboratorieudstyr samt:

Miljøstyrelsens Referencelaboratorium	Metode: Side 2 af 5
<b>BOD<sub>5</sub> på lavt niveau</b>	Første udkast, maj 2000, revideret 30. juni Udfærdiget af: Anders Favrbø og Christian Grøn

## **Bilag 9 metodeudkast**

### **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.

### **4.2 Beholder til fortyndingsvand, glas eller plast**

Denne skal være ren og fri for mikroorganismer, der kan medføre en forhøjning af blindværdien.

### **4.3 Inkubator**

Klimarum eller thermostatet skab med temperatur på  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **4.4 Apparatur til at bestemmelse af opløst ilt**

Der benyttes udstyr til elektrodebestemmelse af opløst ilt 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 må ikke give anledning til kontaminering ved f.eks. at tilføre organisk materiale eller ved oxidation af reducerende forbindelser eller metaller.

## **5. Opbevaring af prøve**

Prøver skal opbevares mørkt ved  $4^\circ\text{C}$  i en fyldt, hermetisk lukket beholder efter prøvetagningen. Analyserne skal påbegyndes umiddelbart efter prøvetagningen, eller højst 24 timer herefter.

## **6. Fremgangsmetode**

For ukendte prøver skal der altid udføres en analyse uden fortynding (6.2) og to analyser med forskellige fortyndinger (6.3). For prøver med kendt indhold udføres altid analyse af 2 fortyndinger, som begge falder indenfor det tilladte iltforbrug (7.1).

### **6.1 Forbehandling**

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

#### **6.1.1 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 ilt.

Miljøstyrelsens Referencelaboratorium	Metode: Side 3 af 5
<b>BOD<sub>5</sub> på lavt niveau</b>	Første udkast, maj 2000, revideret 30. juni Udfærdiget af: Anders Favrbø og Christian Grøn

## Bilag 9 metodeudkast

### 6.2 Fremstilling af testopløsning (uden fortynding)

Fyld fortyndingsflasken (4.6) halvt med prøve og tilsæt 2 mL allylthiourea (3.1).

Fyld op til 1,0 L med prøve.

### 6.3 Fremstilling af testopløsning (med fortynding)

Afmål prøve i fortyndingsflasken (4.6) svarende til den ønskede fortynding. (X ml prøve). Tilsæt  $2 \cdot X / 1000$  mL allylthiourea (3.1).

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

### 6.4 Blank test

Udfør en kontrol af blankværdien parallelt med analyserne af prøverne. Følg fremgangsmetoden beskrevet i 6.2, Fortyndingsvandet (3.2) anvendes i stedet for prøve. Tilsæt 2 mL allylthiourea (3.1) per liter.

### 6.5 Bestemmelse af opløst oxygen

For hver testopløsning (6.2; 6.3) og blank test (6.4) fyldes to inkubationsflasker (4.1) til overløb. Lad eventuelle luftbobler på glassiderne forsvinde ud af inkubationsflaskerne.

Mål indholdet af opløst ilt i hver inkubationsflaske (4.4). Denne måling giver iltindholdet til tiden 0.

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

Mål indholdet af opløst ilt i hver inkubationsflaske efter de 5 dage (4.4). Denne måling giver iltindholdet til tiden 5 dage.

### 6.6 Kontrolanalyse

I hver serie udføres for mindst én prøve dobbeltbestemmelse, hvorefter udregnes den relative variationsbredde  $r_i$ , jf. beskrivelse i 7.2.3 i DS/EN 1899-2:

$$r_i = (BOD_{51} - BOD_{52}) * 100 / (1/2 * (BOD_{51} + BOD_{52}))$$

I hver analyseserie udføres tillige mindst en kontrolanalyse, hvor 2 mL af en kontrol opløsning med cirka 2000 mg/L O<sub>2</sub> som BOD<sub>5</sub> (3.3) fortyndes til 1 L testopløsning med prøve og analyseres som angivet i 6.3 og 6.5. Genfindingen af tilsætning  $D_i$  beregnes som forskellen imellem resultatet  $x_s$  for prøven tilsat kontrolopløsning og resultatet  $x$  for prøven selv.:

$$D_i = x_s - x$$

$r_i$  indsættes i r-kort til kontrol af analysens statistiske stabilitet, og repeterbarheden estimeres som den relative standardafvigelse CV udfra den gennemsnitlige, relative variationsbredde r:

$$CV = r / 1,128 \%$$

Miljøstyrelsens Referencelaboratorium	Metode: Side 4 af 5
<b>BOD<sub>5</sub> på lavt niveau</b>	Første udkast, maj 2000, revideret 30. juni Udfærdiget af: Anders Favrbø og Christian Grøn

## Bilag 9 metodeudkast

D<sub>i</sub> indsættes i D kort, og metodens relative genfinding P estimeres ud fra den gennemsnitlige genfinding D og den beregnede værdi af tilsætningen, d:

$$P = D/d * 100\%$$

### 7. Beregning af resultat

#### 7.1 Bestemmelse af fortynding

Til udregning af BOD<sub>5</sub> benyttes de testopløsninger, der opfylder kravet:

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

C<sub>1</sub> er opløst ilt ved tiden 0 i mg O<sub>2</sub>/L, og

C<sub>2</sub> er opløst ilt ved tiden 5 dage i mg O<sub>2</sub>/L

Der kan uden at påvirke analysen benyttes fortynding op til 3,5 gange.

#### 7.2 Beregning af BOD<sub>5</sub> uden fortynding

Det biokemiske oxygenforbrug efter 5 dage beregnes i mg O<sub>2</sub>/L ved

$$BOD_5 = (C_1 - C_2) - (C_3 - C_4)$$

C<sub>1</sub> og C<sub>2</sub> er beskrevet i 7.1

C<sub>3</sub> er koncentrationen af opløst ilt fundet i blank testen (6.4) ved tiden 0 i mg O<sub>2</sub>/L.

C<sub>4</sub> er koncentrationen af opløst ilt fundet i blank testen (6.4) ved tiden 5 dage i mg O<sub>2</sub>/L

Gennemsnittet af de udregnede BOD<sub>5</sub> resultater for 2 fortyndinger, der opfylder kravet i 7.1, benyttes som analyseresultat. Resultatet angives med 2 betydende cifre.

#### 7.3 Beregning af BOD<sub>5</sub> med fortynding

Det biokemiske oxygenforbrug efter 5 dage beregnes i mg O<sub>2</sub>/L ved

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

C<sub>1</sub> og C<sub>2</sub> er beskrevet i 7.1.

C<sub>3</sub> og C<sub>4</sub> er beskrevet i 7.2.

V<sub>e</sub> er volumen af prøve benyttet til fremstilling af testopløsningen (se 6.3) i mL.

V<sub>t</sub> er det totale volumen til fremstilling af testopløsningen (se 6.3) i mL.

Gennemsnittet af de udregnede BOD<sub>5</sub> resultater for 2 fortyndinger, der opfylder kravet i 7.1, benyttes som analyseresultat. Resultatet angives med 2 betydende cifre.

Miljøstyrelsens Referencelaboratorium	Metode: Side 5 af 5
<b>BOD<sub>5</sub> på lavt niveau</b>	Første udkast, maj 2000, revideret 30. juni Udfærdiget af: Anders Favrbø og Christian Grøn

## **Bilag 9 metodeudkast**

### **8. Rigtighed og præcision**

Ved valideringen af analysemetoden er det fundet, at den kan benyttes med en total standardafvigelse på 0,15-0,30 mg/L O<sub>2</sub> under 7,5 mg/L O<sub>2</sub> BOD og med en relativ standardafvigelse på 3-5% over denne værdi. Genfindingen af tilsat BOD var i gennemsnit 100-113%.

### **9. Rapport**

Rapporten skal indeholde:

1. Reference til denne metode
2. Angivelse af, at nitrifikation var undertrykt
3. Resultatet i mg/L O<sub>2</sub>
4. Bemærkninger om eventuelle modifikation i metoden eller andre supplerende oplysning om analysens gennemførelse

Det skal endvidere anføres, om BOD<sub>5</sub> resultater er fundet med eller uden fortynding.

## Bilag 10 Resultater fra metodevalidering

### DS/EN 1899-2 (ny)

Hvis intet andet er anført er enheden mg O<sub>2</sub>/L

#### Resultater ved analyse:

Prøve	Analyseserie					
	A	B	C	D	E	F
Spildevand 1	1,26	1,06	1,16	1,65	1,18	1,25
	1,21	1,40	1,21	1,56	1,13	1,17
Spildevand 2	0,83	0,84	0,81	0,85	0,91	0,9
	0,8	0,84	0,97	1,03	0,94	0,88
Kvalitetskontrol	4,77	4,4	4,65	4,36	4,43	4,33
	4,59	4,84	4,35	4,99	4,45	4,69
Spildevand 1 + spike 1	3,5	3,81	3,75	3,78	3,74	3,61
	3,34	3,92	3,7	3,55	3,41	3,62
Spildevand 2 + spike 2	5,11	5,22	5,2	4,93	5,51	5,65
	5,12	5,39	5,37	5,32	5,54	5,24
Spildevand 1 + spike 3	4,39	4,29	4,57	4,45	4,58	4,39
	4,47	4,72	4,75	4,28	4,38	4,47
Iltet milliq vand	0,11	0,13	0,26	0,2	0,23	0,18
	0,1	0,18	0,16	0,28	0,23	0,22

#### Beregnete resultater:

Prøve	Analyseserie						Gennemsnit	Sd	CV (%)
	A	B	C	D	E	F			
Spildevand 1	1,26	1,06	1,16	1,65	1,18	1,25	1,27	0,18	14
	1,21	1,40	1,21	1,56	1,13	1,17			
Spildevand 2	0,83	0,84	0,81	0,85	0,91	0,90	0,88	0,07	8
	0,80	0,84	0,97	1,03	0,94	0,88			
Kvalitetskontrol	4,77	4,40	4,65	4,36	4,43	4,33	4,57	0,22	5
	4,59	4,84	4,35	4,99	4,45	4,69			
Spildevand 1 + spike 1	6,90	7,47	7,29	7,32	7,25	7,02	7,10	0,34	5
	6,58	7,69	7,19	6,86	6,59	7,04			
Spildevand 2 + spike 2	12,62	12,82	12,69	11,97	13,43	13,83	12,97	0,50	4
	12,64	13,24	13,11	12,94	13,51	12,80			
Spildevand 1 + spike 3	14,88	14,41	15,24	14,76	15,23	14,65	14,98	0,53	4
	15,16	15,90	15,87	14,17	14,54	14,92			
Iltet milliq vand	0,11	0,13	0,26	0,20	0,23	0,18	0,19	0,06	30
	0,10	0,18	0,16	0,28	0,23	0,22			

#### Beregning af spike:

Prøve	Analyseserie						Gennemsnit	Sd	CV (%)	Sand værdi	Genfinding (%)
	A	B	C	D	E	F					
Kvalitetskontrol	4,33	3,96	4,21	3,92	3,99	3,89	4,13	0,22	5	4,12	100
	4,15	4,40	3,91	4,55	4,01	4,25					
Spike 1	5,63	6,20	6,02	6,05	5,98	5,75	5,83	0,34	6	5,15	113
	5,31	6,42	5,92	5,59	5,32	5,77					
Spike 2	11,73	11,93	11,80	11,08	12,55	12,94	12,08	0,50	4	11,33	107
	11,76	12,36	12,23	12,06	12,62	11,92					
Spike 3	13,61	13,14	13,97	13,49	13,96	13,38	13,71	0,53	4	13,39	102
	13,89	14,63	14,60	12,90	13,27	13,65					

**DS/EN 1899-1**

Hvis intet andet er anført er enheden mg O2/L

**Resultater ved analyse:**

Prøve	Analyseserie					
	A	B	C	D	E	F
Spildevand 1	1,48	1,97	1,66	1,17	1,73	1,48
	1,38	1,97	1,89	1,16	1,66	1,55
Spildevand 2	0,95	1,17	0,94	0,96	1,02	0,97
	0,94	1,21	1,03	1,03	1,08	1,00
Kvalitetskontrol	4,59	4,6	4,73	4,81	4,48	4,49
	4,47	4,84	4,52	4,55	4,54	4,72
Spildevand 1 + spike 1	3,84	3,76	3,79	3,79	3,73	3,64
	4,08	3,93	3,84	3,76	3,75	3,62
Spildevand 2 + spike 2	5,19	5,43	5,58	5,61	5,14	5,33
	5,55	5,37	5,29	5,29	5,24	5,47
Spildevand 1 + spike 3	3,7	3,48	3,29	3,38	3,56	3,48
	3,4	3,54	3,28	3,19	3,54	3,23
Fortyndingsvand + podning	0,44	0,5	0,5	0,29	0,53	0,49
	0,49	0,43	0,37	0,36	0,54	0,38

**Beregnete resultater:**

Prøve	Analyseserie						Gennemsnit	Sd	CV (%)
	A	B	C	D	E	F			
Spildevand 1	1,59	2,14	1,80	1,26	1,86	1,60	1,72	0,30	18
	1,48	2,14	2,05	1,25	1,79	1,67			
Spildevand 2	1,00	1,25	1,00	1,03	1,07	1,03	1,09	0,10	9
	0,99	1,29	1,10	1,11	1,14	1,06			
Kvalitetskontrol	5,05	5,06	5,21	5,31	4,92	4,94	5,07	0,15	3
	4,92	5,33	4,97	5,02	4,99	5,20			
Spildevand 1 + spike 1	7,22	7,06	7,15	7,26	6,93	6,85	7,15	0,25	4
	7,70	7,40	7,25	7,20	6,97	6,81			
Spildevand 2 + spike 2	12,28	12,88	13,30	13,54	12,05	12,67	12,77	0,44	3
	13,18	12,73	12,57	12,74	12,30	13,02			
Spildevand 1 + spike 3	16,64	15,54	14,71	15,60	15,66	15,66	15,34	0,64	4
	15,14	15,84	14,66	14,65	15,56	14,41			
Fortyndingsvand + podning	0,44	0,50	0,50	0,29	0,53	0,49	0,44	0,08	18
	0,49	0,43	0,37	0,36	0,54	0,38			

**Beregning af spike:**

Prøve	Analyseserie						Gennemsnit	Sd	CV (%)	Sand værdi	Genfindning (%)
	A	B	C	D	E	F					
Kvalitetskontrol	4,61	4,62	4,76	4,87	4,48	4,50	4,63	0,15	3	4,12	112
	4,47	4,88	4,53	4,58	4,54	4,75					
Spike 1	5,50	5,34	5,43	5,54	5,21	5,13	5,43	0,25	5	5,15	105
	5,98	5,68	5,53	5,48	5,25	5,09					
Spike 2	11,19	11,79	12,21	12,45	10,96	11,58	11,68	0,44	4	11,33	103
	12,09	11,64	11,48	11,65	11,21	11,93					
Spike 3	14,92	13,82	12,99	13,88	13,94	13,94	13,62	0,64	5	13,39	102
	13,42	14,12	12,94	12,93	13,84	12,69					

## Bilag 11 Metodevalideringsrapport

### DS/EN 1899-1

#### Detektionsgrænse (mg O<sub>2</sub>/l)

Prøve	Gennemsnit	Std.afv.	Antal prøver	Detektionsgrænse
Prøve 1	1,719	0,075	12	0,372

#### Nøjagtighed og præcision

Prøvetype	Niveau		Genfindning %	Antal prøver	Præcision			
	Tilsat	Fundet			Repeterbarhed		Std.afv. mellem dage	
	mg O <sub>2</sub> /l	mg O <sub>2</sub> /l			s(r) mg O <sub>2</sub> /l	CV(r) %	s(b) mg O <sub>2</sub> /l	CV(b) %
Prøve 1	-	1,25 - 2,14	-	12	0,084	4,9	0,306	17,8
Prøve 2	-	0,99 - 1,29	-	12	0,045	4,1	0,090	8,3
Kvalitetskon.	4,12	4,47 - 4,88	108 - 118	12	0,156	3,4	0,000	0,0
Spike 1	5,15	5,09 - 5,98	99 - 116	12	0,174	3,2	0,189	3,5
Spike 2	11,33	10,96 - 12,45	97 - 110	12	0,427	3,7	0,119	1,0
Spike 3	13,39	12,69 - 14,92	95 - 111	12	0,634	4,7	0,112	0,8

#### Selektivitet

	Prøve 1	Prøve 2	Kvalitetskon.	Spike 1	Spike 2	Spike 3
Gennemsnit	1,72	1,09	4,63	5,43	11,68	13,62
Sand koncentration	-	-	4,12	5,15	11,33	13,39
Test størrelse Z	-	-	0,1545	0,0871	0,1164	0,0812
Sandsynlighed for Z	-	-	0,8800	0,9321	0,9095	0,9367

## Bilag 11 Metodevalideringsrapport

### DS/EN 1899-2 (NY)

#### Detektionsgrænse (mg O<sub>2</sub>/l)

Prøve	Gennemsnit	Std.afv.	Antal prøver	Detektionsgrænse
Prøve 1	1,270	0,098	12	0,481

#### Nøjagtighed og præcision

Prøvetype	Niveau		Genfinding %	Antal prøver	Præcision			
	Tilsat	Fundet			Repeterbarhed		Std.afv. mellem dage	
	mg O <sub>2</sub> /l	mg O <sub>2</sub> /l			s(r) mg O <sub>2</sub> /l	CV(r) %	s(b) mg O <sub>2</sub> /l	CV(b) %
Prøve 1	-	1,06 - 1,65	-	12	0,107	8,4	0,149	11,7
Prøve 2	-	0,80 - 1,03	-	12	0,071	8,0	0,000	0,0
Kvalitetskon.	4,12	3,89 - 4,55	94 - 110	12	0,265	6,4	0,000	0,0
Spike 1	5,12	5,31 - 6,42	104 - 125	12	0,260	4,5	0,223	3,8
Spike 2	11,33	11,08 - 12,94	98 - 114	12	0,445	3,7	0,229	1,9
Spike 3	13,39	12,90 - 14,63	96 - 109	12	0,547	4,0	0,000	0,0

#### Selektivitet

	Prøve 1	Prøve 2	Kvalitetskon.	Spike 1	Spike 2	Spike 3
Gennemsnit	1,27	0,88	4,13	5,83	12,08	13,71
Sand koncentration	-	-	4,12	5,12	11,33	13,39
Test størrelse Z	-	-	0,0033	0,2269	0,2532	0,1084
Sandsynlighed for Z	-	-	0,9974	0,8246	0,8048	0,9156