

**Miljøstyrelsens Referencelaboratorium
Metodeafprøvning BOD₅ i afløbsvand
fra renseanlæg**

Interlaboratorieundersøgelse 2002

INDHOLDSFORTEGNELSE

1	INDLEDNING	1-1
2	BAGGRUND	2-1
2.1	Datakvalitet ved måling af BOD på lavt niveau	2-1
2.2	Metoder til bestemmelse af BOD	2-2
2.2.1	Eksisterende metoder og undersøgelser	2-2
2.2.2	Referencelaboratoriets metodeudvikling	2-3
2.3	Metodeforskrift for BOD i afløbsvand	2-3
2.4	Validering af DS/EN 1899-2 (NY)	2-4
3	TILRETTELÆGGELSE AF METODEAFPRØVNINGEN	3-1
3.1	Forundersøgelse	3-1
3.2	Prøvefremstilling	3-2
3.3	Prøvernes homogenitet og stabilitet	3-2
4	DATABEHANDLING	4-1
4.1	Statistisk bearbejdning	4-1
4.2	Fastlæggelse af nominel værdi	4-1
5	RESULTATER	5-1
5.1	Korrekthed	5-2
5.2	Præcision	5-4
5.3	Detektionsgrænse	5-5
6	KONKLUSIONER OG ANBEFALINGER	6-1
7	REFERENCER	7-1

BILAG

A	Metodeforskrift DS/EN 1899-2 (NY)	A-1
B	Deltagerliste	B-1
C	Information til deltagerne	C-1
D	Resultater fra test af potentielle referencestoffer	D-1
E	Prøvefremstilling	E-1
F	Homogenitet og stabilitet	F-1
G	Symboler og forkortelser	G-1
H	Kontrol af genfindning	H-1
I	Resultater fra deltagerne	I-1
J	Metoder	J-1
K	Grafisk afbildning af deltagernes resultater	K-1
L	Resultater af supplerende forsøg	L-1
M	Endelig metodeforskrift (REFLAB Metode 2:2002)	M-1

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. Miljøstyrelsens Referencelaboratorium for Kemiske Miljøanalyser har derfor af Referencelaboratoriets styringsgruppe fået i opdrag at foretage en vurdering af de benyttede analysemetoder til bestemmelse af BOD og har efterfølgende udviklet en modifikation af en eksisterende metode: DS/EN 1899-2. Denne rapport beskriver afprøvningen af den udviklede modifikation ved en interlaboratorieundersøgelse blandt danske laboratorier.

2 BAGGRUND

Afløbsvand fra danske renseanlæg skal i henhold til Spildevandsbekendtgørelsen /1/ renses til et indhold på højst 15 mg/L O₂, og mange renseanlæg opnår bedre rensning. En metode til BOD i afløbsvand kan ligeledes anvendes i forbindelse med kontrol af ferskvandsdambrug /2/, hvor kravet er en maksimal tilvækst i BOD fra indløb til udløb på 1 mg/L O₂. Dette betyder, at der er behov for en metode med et måleområde fra mindre end 1 mg/L O₂ til 15 mg/L O₂ eller mere.

Eksisterende metoder til bestemmelse af BOD (/3/, /4/) har måleområder på henholdsvis 0,5 - 6 mg/L O₂ og 3 - 6000 mg/L O₂. Ingen af disse kan derfor honorere ønsket om måleområde, hvilket er baggrunden for det udførte udviklingsarbejde.

Udvikling af en metode egnet til bestemmelse af BOD i spildevand med lavt indhold af BOD er gennemført i flere trin, som løbende er rapporteret. Nedenfor er givet et resumé af de udførte undersøgelser og vurderinger.

2.1 Datakvalitet ved måling af BOD på lavt niveau

I rapport til Miljøstyrelsen /5/ er udarbejdet en oversigt over de gældende krav til analysekvalitet baseret på Miljøstyrelsens bekendtgørelse nr. 637 /7/ og udledt af krav til vandkvalitet.

Tabel 1 Samlet vurdering af krav til analysekvalitet for BOD /5/.

Medium	Maksimal total standardafvigelse $s_{T \max}$ i måleområdet (3 - 15) * $s_{T \max}$ /7/ mg/L O ₂	Maksimal relativ standardafvigelse i måleområdet >15 * $s_{T \max}$ /7/ %	Genfindning af nominal værdi ved præstationsprøvning % /7/	Krav til detektionsgrænse mg/L O ₂
Ferskvand	0,15	5	100 ± 20	0,5 helst 0,1
Spildevand	1	5	100 ± 20	1,5 helst 0,5

Muligheden for overholdelse af kravene til analysekvalitet er vurderet i /5/ og /6/ på basis af den generelle analysekvalitet i præstationsprøvninger afholdt mellem 1992 og 2000. Resultaterne i præstationsprøvningerne viste forholdsvis stor spredning mellem laboratorierne, samt at der ofte var vanskelighed med overholdelse af kravet til detektionsgrænse. Desuden antydede materialet vanskelighed med overholdelse af kravet til $s_{T \max}$ i ferskvand. Sammenligneligheden øges hvis metoder med fortynding /3/ og uden fortynding /4/ separeres, men ikke i alle tilfælde tilstrækkeligt. Materialet viser en tendens til højere gennemsnit ved anvendelse af metode med fortynding i forhold til metode uden fortynding. Alene af den grund vil ensartethed i metodevalget forventes at forbedre sammenligneligheden.

Referencelaboratoriet har desuden undersøgt kilderne til usikkerhed på BOD-metoden ved opstilling af et usikkerhedsbudget /9/. Undersøgelsen viser, at oxygenmålingen er den overvejende kilde til repeterbarhedsvariation ved måling af BOD uden fortynding og dermed styrende for den opnåelige detektionsgrænse. Den beregnede andel af repe-

terbarhedsvariationen, som stammer fra oxygenmåling, er en standardafvigelse af størrelsesorden 0,1 mg/L O₂.

Repetierbarheden indeholder alene variationer indenfor en dag. Kravet til standardafvigelse ved lave koncentrationer, $s_{T \max}$, er den totale standardafvigelse og indeholder derfor også bidrag fra variation fra dag til dag. $s_{T \max}$ må derfor forventes at være større end repeterbarheds-standardafvigelsen. Den beregnede repeterbarhedsvariation forårsaget af oxygenmåling (ca. 0,1 mg/L O₂) antyder at kravet til $s_{T \max}$ i ferskvand (0,15 mg/L O₂) vanskeligt kan honoreres med de til rådighed værende metoder til måling af oxygen.

2.2 Metoder til bestemmelse af BOD

2.2.1 Eksisterende metoder og undersøgelser

Referencelaboratoriet sammenlignede forskellige metoder og metodevariationer under forarbejdet til udvikling af BOD-metode til afløbsvand /5/. Sammenligningerne er summeret nedenfor.

Tabel 2 Hovedtræk af BOD analysemetoder /5/.

	DS/EN 1899-1 /3/	DS/EN 1899-2 /4/	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 ₂	0,5-6 mg/L O ₂	2-1000 mg/L O ₂
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 (s _r)	11 mg/L O ₂	0,10-0,22 mg/L O ₂	5-10%
Primær anvendelse	Spildevand og losseplads-perkolat	Overfladevand	Overfladevand

Tabellen indeholder dels de to DS/EN-metoder og dels den nu udgåede DS/R 254. DS/R 254 svarer med mindre forskelle, som ikke blev vurderet som betydende /5/, til DS/EN 1899-1 med undtagelse af, at hæmning af nitrifikation i DS/R 254 var en modifikation, mens det i DS/EN 1899-1 er foreskrevet.

I det følgende koncentrerer opsummeringen om DS/EN 1899.

Inkubationstid: DS/EN 1899-1 og 1899-2 giver begge mulighed for inkubation i 5 eller 7 døgn, hvor 5 døgn traditionelt benyttes i Danmark. Inkubation i 7 døgn giver højere resultater og det vil derfor være nødvendigt at specificere inkubationstiden ved anvendelse.

delse i Danmark. Data om præcision ved de to inkubationstider giver ikke mulighed for klart at konkludere om der er forskel.

Undertrykkelse af nitrifikation: Tilsætning af ATU til hæmning af nitrifikation giver lavere BOD, særlig i prøver med højt indhold af ammonium, som f.eks. afløbsvand fra renseanlæg. DS/EN 1899-1 foreskriver tilsætning af ATU, mens DS/EN 1899-2 angiver det som en mulighed. Det er således nødvendigt at specificere anvendelse af ATU ved analyse af afløbsvand. Tilsætning af ATU giver ikke en entydig effekt på præcisionen.

Fortyndingsmetode eller metode uden fortynding: Bestemmelse af BOD med fortynding (DS/EN 1899-1) forventes at give dårligere præcision end bestemmelse uden fortynding (DS/EN 1899-2), men undersøgelser viser ikke entydig forskel.

Oxygenmåling: Oxygenmåling kan efter DS/EN 1899 foregå enten titrimetrisk eller med elektrode. Ældre undersøgelser (1982) tyder ikke på forbedret analysekvalitet ved elektrodemåling, men de opstillede usikkerhedsbudgetter /9/ tyder på, at kvaliteten af elektroder er forbedret, således at elektrodemåling giver lavere spredning end titrering. Forskellen er dog ikke stor.

Podemateriale: DS/EN 1899-2 foreskriver ikke podning med mindre prøverne som følge af store geografiske afstande er frosset. Frysning er ikke relevant under danske forhold, hvorfor podning ikke vil finde sted. DS/EN 1899-1 foreskriver podning. Forsøg på standardisering af podemateriale er ikke faldet heldigt ud.

2.2.2 Referencelaboratoriets metodeudvikling

Referencelaboratoriet foretog forsøg med henblik på at udvikle / modificere en metode med et måleområde og en analysekvalitet, som er hensigtsmæssig til bestemmelse af BOD i afløbsvand fra renseanlæg.

Effekten af tilsætning af ATU til hæmning af nitrifikation i prøver med et lavt indhold af BOD blev undersøgt. Undersøgelsen omfattede prøver med højt og lavt indhold af ammonium. For prøver med højt indhold af ammonium sås det forventede fald i BOD ved tilsætning af ATU op til 1 mg/L, og antydningssvis yderligere til 2 mg ATU/L, mens der for prøver med lavt indhold af ammonium ikke sås effekt. Den modificerede metode indeholder derfor bestemmelse om tilsætning af ATU til 2 mg/L.

Tilsætning af næringssalte gav ingen effekt på hverken niveau af BOD eller præcision, hvorfor den modificerede metode ikke indeholder tilsætning af næringssalte.

Referencelaboratoriet udførte en række forsøg med fortynding af prøven med iltmættet vand men uden podning. Forsøgene blev udført med op til 3,5 gange fortynding. Den undersøgte fortynding påvirkede ikke genfinding for BOD.

2.3 Metodeforskrift for BOD i afløbsvand

Baseret på de foretagne undersøgelser af eksisterende materiale og i Referencelaboratoriets laboratorium blev en metodeforskrift udarbejdet (bilag A). Den benævnes herefter DS/EN 1899-2 (NY).

Forskriften tager udgangspunkt i DS/EN 1899-2, hvorfra den afviger på følgende punkter:

	DS/EN 1899-2 (NY)	DS/EN 1899-2
1. Omfang og anvendelsesområde	0,5 - 15 mg/L O ₂	0,5 - 6 mg/L O ₂
2. Princip	Der tilsættes ATU for at undertrykke nitrifikation	Tilsætning af ATU er en modifikation
6. Fremgangsmåde	Analyse uden fortynding og med en eller flere fortyndinger, op til 3,5 gange fortynding. Til fortynding anvendes iltet, rensset (destilleret eller demineraliseret) vand.	Ingen fortynding
6.5 Bestemmelse af opløst oxygen	Oxygen bestemmes med elektrode	Bestemmelse af oxygen er valgfri mellem iodometrisk titrering og elektrodemåling
6.6 Kontrolanalyse	Kontrol ved dobbeltbestemmelse på naturlig prøve og ved spiking af naturlig prøve.	Kontrol ved dobbeltbestemmelse på naturlig prøve.

Desuden er foretaget de nødvendige justering for Reagenser, Udstyr, Fremgangsmåde og Beregning af resultat for at beskrive tilsætning af ATU og fortynding af prøven.

2.4 Validering af DS/EN 1899-2 (NY)

Referencelaboratoriet gennemførte en validering af den udviklede metode, DS/EN 1899-2 (NY). Metoden blev sammenlignet med DS/EN 1899-1. DS/EN 1899-1 gav på enkelte prøver signifikant højere resultat end DS/EN 1899-2 (NY), mens der for andre prøver ikke var forskel. Detektionsgrænse og præcision for de to metoder var sammenlignelige.

Kvalitetsparametre fra metodevalideringen er vist i tabel 3.

Tabel 3 Nøgletal fra validering af DS/EN 1899-2 (NY) /5/.

Kvalitetsparameter	DS/EN 1899-2 (NY)
Detektionsgrænse	0,3 - 0,5 mg/L O ₂
Repeterbarhed (s_r) ved koncentration $\leq 2,25$ mg/L O ₂	0,07 - 0,11 mg/L O ₂
Repeterbarhed (CV_r) ved koncentration $> 2,25$ mg/L O ₂	3,7 - 6,4 %
Reproducerbarhed (s_T) ved koncentration $\leq 2,25$ mg/L O ₂	0,07 - 0,18 mg/L O ₂
Reproducerbarhed (CV_T) ved koncentration $> 2,25$ mg/L O ₂	4,1 - 6,4 %
Genfinding på enkeltværdier	94 - 125 %
Genfinding, gennemsnit for hver prøve	100 - 113 %

Valideringen viser, at metoden kan tilfredsstille et krav til detektionsgrænse på 0,5 mg/L O₂. Krav til $s_{T \max}$ i spildevand overholdes let, mens kravet i ferskvand på 0,15 mg/L O₂ ikke kan overholdes generelt. Metoden kan for en enkelt måling ikke overholde kravet til genfinding ved præstationsprøvnings (100 ± 20 %). Kravet til gennemsnitlig genfinding ved intern kvalitetskontrol (100 ± 2 %) overholdes ikke, men datamaterialet er begrænset.

3 **TILRETTELÆGGELSE AF METODEAFPRØVNINGEN**

Totalt blev 20 danske laboratorier tilbudt at deltage i metodeafprøvningen, i en indbydelse som blev sendt ud den 19. juni 2002, med svarfrist den 9. august. Sammen med indbydelsen blev en oversigt over forsøgsdesign og en kopi af den ny BOD metode sendt ud (DS/EN 1899-2 (NY), version rev. 18. juni 2002). Af de indbudte laboratorier gav 8 en positiv tilbagemelding, men ét meldte efterfølgende afbud. Sammen med Eurofins A/S, Hørsholm, var der altså 8 deltagende laboratorier, alle fra Danmark. En liste over de deltagende laboratorier findes i Bilag B.

Prøverne blev sendt ud til laboratorierne den 3. september, helt ifølge plan. Sammen med prøverne blev udsendt et brev med instruks for prøvefremstilling og analyse, et rapporteringsskema og en liste over metodekoder (se Bilag C). Desuden blev der udsendt en revideret udgave af metodeforskriften, da et af de tilmeldte laboratorierne opdagede en fejl i en blindkorrektion i den oprindelige metode. Den udgave, som blev sendt ud sammen med prøverne, er den som findes i Bilag A (rev. 2. september 2002).

Deltagerne indsendte resultater til KPMG, et uafhængigt revisionsfirma, som foretog kodning af resultaterne inden aflevering til Referencelaboratoriet. Afleveringsfrist for resultater til KPMG var den 27. september.

3.1 **Forundersøgelse**

Tidligere erfaring viser, at en glukose-glutaminsyre blanding giver stabile og homogene opløsninger med kendt indhold af BOD. Den slags opløsninger bruges normalt til spike-opløsninger for BOD og af mange laboratorier til referencemateriale i intern kvalitetskontrol. Et problem er dog, at indholdet af organisk materiale bliver omsat meget hurtigere end hvad det normalt bliver i en naturlig afløbsprøve. Før spike-opløsningerne til metodeafprøvningen blev fremstillet, blev derfor testet nogle alternative stoffer i et forsøg. De udvalgte stoffer var lactose, phenylalanin og natriumbenzoat. Lactose og phenylalanin blev udvalgt, fordi de er større varianter af molekylerne glukose og glutaminsyre. Forhåbningen var derfor, at omsætningshastigheden ville være lidt lavere. Natriumbenzoat er blevet brugt som referencestof i forbindelse med økotoksikologiske tests af bionedbrydelighed, og der var derfor en mulighed for at det kunne bruges også i dette sammenhæng.

Prøverne blev fremstillet fra iltmættet podevand (fremstillet ifølge DS/EN 1899-1), hvor en spike af de tre kandidatsstoffer blev tilsat, se tabel.

Stof	Koncentration, mg/L	Forventet BOD, ca., mg/L O ₂
Lactose	5	8,2
Phenylalanin	14	10
Natriumbenzoat	14	10

Iltindholdet i prøverne var planlagt til at blive målt efter henholdsvis 4, 5, 6, 7 og 8 dage. Resultaterne viste desværre, at også disse stoffer blev meget hurtigt omsat, og at al

ilt var forbrugt allerede efter 4 dage, uanset hvilket stof der blev undersøgt. BOD blev derfor kun målt efter 4 og 5 dage. Resultater fra forforsøget findes i Bilag D.

Konklusionen var derfor, at referencestof til metodeafprøvningen var en blanding af lige dele glukose og glutaminsyre.

3.2 *Prøvefremstilling*

Til fremstilling af prøver blev brugt rensed spildevand fra Nivå renseanlæg (hovedsageligt husholdningsspildevand, spildevand 1) og fra Lundtofte renseanlæg (bidrag fra industrispildevand, spildevand 2).

Til kontrolprøve blev brugt ampuller med 25 mL af en koncentreret glukose-glutaminsyre opløsning, der var blevet fremstillet og tjekket i forbindelse med en tidligere præstationsprøvning.

Desuden blev fremstillet ampuller med koncentreret spike-opløsning til brug ved spiking af spildevandet. Disse opløsninger blev fremstillet ved brug af en glukose-glutaminsyre blanding.

Beskrivelse af prøvefremstilling findes i Bilag E.

Følgende prøver blev sendt ud til laboratorierne:

Prøve	Beholdere	Volumen
Spildevand 1	Plastikdunk	>10 L
Spildevand 2	Plastikdunk	5 L
Kontrol	Ampul	ca. 25 mL
Spike 1	Ampul	ca. 20 mL
Spike 2	Ampul	ca. 20 mL
Spike 3	Ampul	ca. 20 mL

3.3 *Prøvernes homogenitet og stabilitet*

Tidligere erfaring viser, at spildevandsprøver som stabiliseres ved beluftning og henstand, vil være stabile nok til at bruges som BOD-prøver, inklusive som basisvand for fremstilling af spikede BOD-prøver. De to spildevandsprøver, Spildevand 1 og Spildevand 2, blev derfor ikke testet for homogenitet.

Spikeopløsning 3 blev testet for homogenitet ved måling af NVOC. Resultaterne viser, at spike 3 var homogen (se Bilag F). Da spike 1 og 2 blev fremstillet på samme måde, og på samme tidspunkt, kan de med meget stor sikkerhed også antages at være homogene. Kontrolampullerne er blevet testet i forbindelse med en tidligere præstationsprøvning.

4 *DATABASEHANDLING*

4.1 *Statistisk bearbejdning*

Metodeafprøvningen er gennemført med uniform-level design, hvilket vil sige at de deltagende laboratorier er anmodet om at analysere de udsendte prøver flere gange. I dette tilfælde er laboratorierne anmodet om at foretage dobbeltbestemmelse for hver prøve. Databehandlingen er foretaget i henhold til ISO 5725: "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results" /10/. De anvendte symboler og forkortelser er beskrevet i bilag G.

Datamaterialet er for lille til at foretage test af normalfordeling. En visuel inspektion af normalfordelingsplot af residualer giver generelt ikke grund til at tvivle på datamaterialets normalfordelingsegenskaber.

I betragtning af det begrænsede antal deltagere er databehandling foretaget med robust statistik, som er en alternativ metode i henhold til ISO 5725 /11/.

Deltagerne modtog en foreløbig rapport med anmodning om at meddele eventuelle kommentarer senest den 6. december 2002. Referencelaboratoriet modtog dog ikke information om fejlbehæftede resultater, hvorfor alle data indgik i databehandlingen.

4.2 *Fastlæggelse af nominel værdi*

Hver prøve er tildelt en nominel værdi, som er Referencelaboratoriets bedste estimat af den sande koncentration i prøven.

I fremstilling er prøve 1, 4 og 6 sammenhørende, idet prøve 4 og 6 fremkom ud fra prøve 1 ved tilsætning af en kendt mængde af en referenceopløsning (spiking). På tilsvarende måde er prøve 2 og 5 sammenhørende.

Den nominelle værdi for prøve 1 er fastlagt ud fra medianværdierne af deltageres resultater for prøve 1 og 4 efter at medianværdien for prøve 4 er fratrasket den tilsatte koncentration. Prøve 6 indgik ikke i beregning af nominel værdi, da det af deltagerne fundne gennemsnit var mindre end den beregnede tilsætning.

Tilsvarende er den nominelle værdi for prøve 2 fastlagt ud fra medianværdierne for prøve 2 og 5 efter subtraktion af den tilsatte koncentration fra prøve 5.

Den nominelle værdi for prøve 4, 5 og 6 er fremkommet ved addition af den tilsatte koncentration til basisprøven, dvs. prøve 1 eller 2.

Prøve 3 er en kvalitetskontrolprøve, hvor en kendt koncentration er tilsat laboratoriets fortyndingsvand og resultatet korrigeret for fortyndingsvandets bidrag til BOD. Den nominelle værdi for prøve 3 fremkommer ved beregning ud fra prøvefremstillingen.

Prøve 7 var laboratoriernes fortyndingsvand og den nominelle værdi for denne prøve er fastsat til medianværdien for deltagernes resultater.

Usikkerheden for de nominelle værdier er estimeret. Dog har det ikke været muligt at inddrage usikkerhedsbidrag stammende fra eventuel bias på de nominelle værdier.

Usikkerheden for tilsatte koncentrationer (spike1, spike2, spike3 og kvalitetskontrol) er estimeret ud fra fabrikanternes tolerance på de anvendte vægte og volumetrisk udstyr. Da slutfortynding er foretaget på deltagernes laboratorier, og der af den grund ikke findes viden om kvalitetsklasse for det volumetriske udstyr, er det valgt at fastlægge usikkerheden ud fra tolerancerne for klasse B udstyr i et ”worst case scenario”.

Usikkerheden på de nominelle værdier, der er baseret på medianværdier, er estimeret ud fra robust standardafvigelse for de indgående medianværdier. Hertil er adderet usikkerheden på spikeopløsninger i det omfang koncentrationen af disse indgår i fastlæggelsen af den nominelle værdi.

Usikkerheden er angivet som ekspanderet usikkerhed med dækningsfaktoren 2.

De nominelle værdier og dertil hørende usikkerheder er vist i oversigt i tabel 4.

Tabel 4 Nominelle værdier og tilhørende usikkerheder.

Prøve	Prøvebeskrivelse	Nominel værdi ± ekspanderet usikkerhed	
		DS/EN 1899-1 og DS/R 254	DS/EN 1899-2(NY)
1	Spildevand 1	$0,95 \pm 0,16$	$1,05 \pm 0,13$
2	Spildevand 2	-	$0,95 \pm 0,15$
3	Kvalitetskontrol	$4,19 \pm 0,034$	$4,19 \pm 0,034$
4	Spildevand 1 + spike 1	$5,93 \pm 0,17$	$6,03 \pm 0,13$
5	Spildevand 2 + spike 2	-	$9,95 \pm 0,17$
6	Spildevand 1 + spike 3	$14,9 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,2$
7	Laboratoriernes fortyndingsvand	$0,60 \pm 0,31$	$0,21 \pm 0,09$

Som det fremgår er der for prøve 7, der ligger tæt på eller under metodens forventede detektionsgrænse, en meget stor usikkerhed på omkring 50% af den nominelle værdi. I prøve 1 og 2, som ligger på ca. det dobbelte af detektionsgrænsen er usikkerheden stadig betydelig, men dog reduceret til 10 - 20%. For de øvrige prøver er usikkerheden under 3%.

Tabel 4 viser, at de udsendte prøver dækker hele metodens måleområde med to prøver tæt på den nedre ende af måleområdet ($0,5 \text{ mg/L O}_2$) og en prøve herunder samt yderligere 4 prøver fordelt over den resterende del af måleområdet op til den øvre grænse (15 mg/L O_2).

Overensstemmelsen for de nominelle værdier med deltagernes data er testet ved sammenligning af den nominelle værdi i hver prøve med gennemsnittet af deltagernes resultater efter udelukkelse af eventuelle outliers. Sammenligningen er foretaget ved en t-test på 95% konfidensniveau. Testen viser ingen forskel mellem middelværdier og nominelle værdier med undtagelse af prøve 6 målt med DS/EN 1899-2 (NY). I Referencelaboratoriets homogenitetstest for den ampul, der er anvendt til fremstilling af prøven hos de deltagende laboratorier, er den forventede værdi fundet med 101% genfindning målt ved

NVOC. Der er således intet der tyder på, at den fremstillede ampul ikke indeholder den forventede mængde organisk stof. Gennemsnit fundet med den ny metode stemmer overens med gennemsnit fundet med laboratorierne egen metode. Forskellen mellem nominel værdi og deltagernes gennemsnit er ikke statistisk signifikant ved anvendelse af egen metode som følge af større spredning på resultaterne. Den nominelle værdi fastholdes derfor.

5 RESULTATER

Metodeafprøvningen havde i alt 8 deltagere, Referencelaboratoriet inkluderet. Alle 8 laboratorier havde imidlertid ikke ressourcer til analyse af alle prøver. For den enkelte prøver er antallet af deltagere derfor mellem 5 og 8. Resultater fra alle deltagere er vist i bilag I og afbildet grafisk i bilag K. I oversigten er de metoder, deltagerne har anvendt som egen rutinemetode, angivet med et metodenummer. En forklaring til metodenumrene er vist i bilag J.

Alle prøver med undtagelse af prøve 2 og 5, prøve fra Lundtofte renseanlæg uden og med spiking, blev analyseret med to metoder, hvoraf den ene var metoden til afprøvning, DS/EN 1899-2 (NY). Den anden metode var enten DS/EN 1899-1, som er fortyndingsmetoden for BOD, eller egen metode. Som egen metode har de fleste laboratorier valgt enten DS/EN 1899-1 eller den nært beslægtede DS/R 254. Ét laboratorium anvender imidlertid DS/EN 1899-2 modificeret ved tilsætning af ATU som egen metode for prøve 1. Dette laboratorium analyserer således prøverne uden fortynding.

En oversigt over kvalitetsparametre estimeret ud fra de modtagne resultater er vist i tabel 5.

Tabel 5 *Generel analysekvalitet for BOD (mg/L O₂) bestemt med DS/EN 1899-2 (NY).*

Prøve	1	2	3	4	5	6	7
p, antal laboratorier	8	8	5	7	7	7	7
n, antal replikater	2	2	2	2	2	2	1
μ, nominel værdi	1,05	0,95	4,19	6,03	9,95	15,0	0,21
m, middelværdi	1,212	0,926	3,612	5,836	9,926	13,51	0,216
M, median	1,185	0,900	3,950	5,920	10,00	13,40	0,210
genfinding*, %	113	95	94	98	101	90	100
s _r	0,089	0,047	0,356	0,136	0,409	0,21	-
s _L	0,221	0,201	0,177	0,396	0,450	1,01	0,098
s _R	0,238	0,207	0,375	0,419	0,608	1,03	0,098
CV _r , %	8,5	5,0	8,5	2,3	4,1	1,4	-
CV _L , %	21	21	4,2	6,6	4,5	6,7	47
CV _R , %	23	22	9,0	6,9	6,1	6,9	47

*: genfinding er beregnet som medianværdi i procent af nominel værdi.

Til sammenligning ses i tabel 6 kvalitetsparametre bestemt på de samme prøver ved anvendelse af fortyndingsmetoden, enten i henhold til DS/EN 1899-1 eller DS/R 254. For prøve 1 har ét laboratorium dog anvendt DS/EN 1899-2 modificeret ved tilsætning af ATU.

Tabel 6 Generel analysekvalitet for BOD (mg/L O₂) bestemt ved egen metode (prøve 1, 4 og 6) og fortyndingsmetoder (prøve 3 og 7).

Prøve	1	2	3	4	5	6	7
p, antal laboratorier	8		6	6		6	7
n, antal replikater	2		2	2		2	1
μ, nominel værdi	0,95		4,19	5,93		14,9	0,60
m, middelværdi	1,260		4,347	5,864		13,34	0,734
M, median	1,100		4,31	5,790		14,02	0,600
genfinding*, %	116		103	98		94	100
s _r	0,105		0,126	0,147		0,23	-
s _L	0,359		0,478	0,790		2,54	0,392
s _R	0,374		0,494	0,804		2,55	0,392
CV _r , %	11,0		3,0	2,5		1,5	-
CV _L , %	38		11,4	13,3		17,0	65
CV _R , %	39		11,8	13,6		17,1	65

*: genfinding er beregnet som medianværdi i procent af nominel værdi.

Både repeterbarhed og reproducerbarhed ved egen metode/fortyndingsmetoden som fremgår af tabel 6 er bedre end det normalt ses for afløbsvand ved præstationsprøvnin-
ger /12/.

5.1 Korrekthed

Det giver ikke mening at tale om korrekthed som sådan for en metode som BOD, hvor resultatet er afhængigt af den anvendte procedure. Imidlertid er det vigtigt at kende BOD-bidraget for standardstoffer med henblik på anvendelse i kvalitetskontrol og som tilsætning ved præstationsprøvnin-
ger.

Det forventes som udgangspunkt, at omsætningen med den ny metode vil være lige så stor som omsætningen med fortyndingsmetoden, f.eks. DS/EN 1899-1. I DS/EN 1899-1 angives en kontrolopløsning, hvorefter det kan udledes, at en blanding af 1 g glukose og 1 g glutaminsyre vil svare til $1,40 \pm 0,13$ g O₂ målt som BOD₅. Koncentrationen i de an-
vendte spike og kvalitetskontrolopløsninger er beregnet ud fra denne faktor.

Genfindingen af de tilsatte spike-opløsninger og i kontrolopløsningen er vist nedenfor i tabel 7 for den ny metode og for fortyndingsmetoderne.

Tabel 7 Genfinding af tilsatte spikeopløsninger og af kvalitetskontrolopløsning.

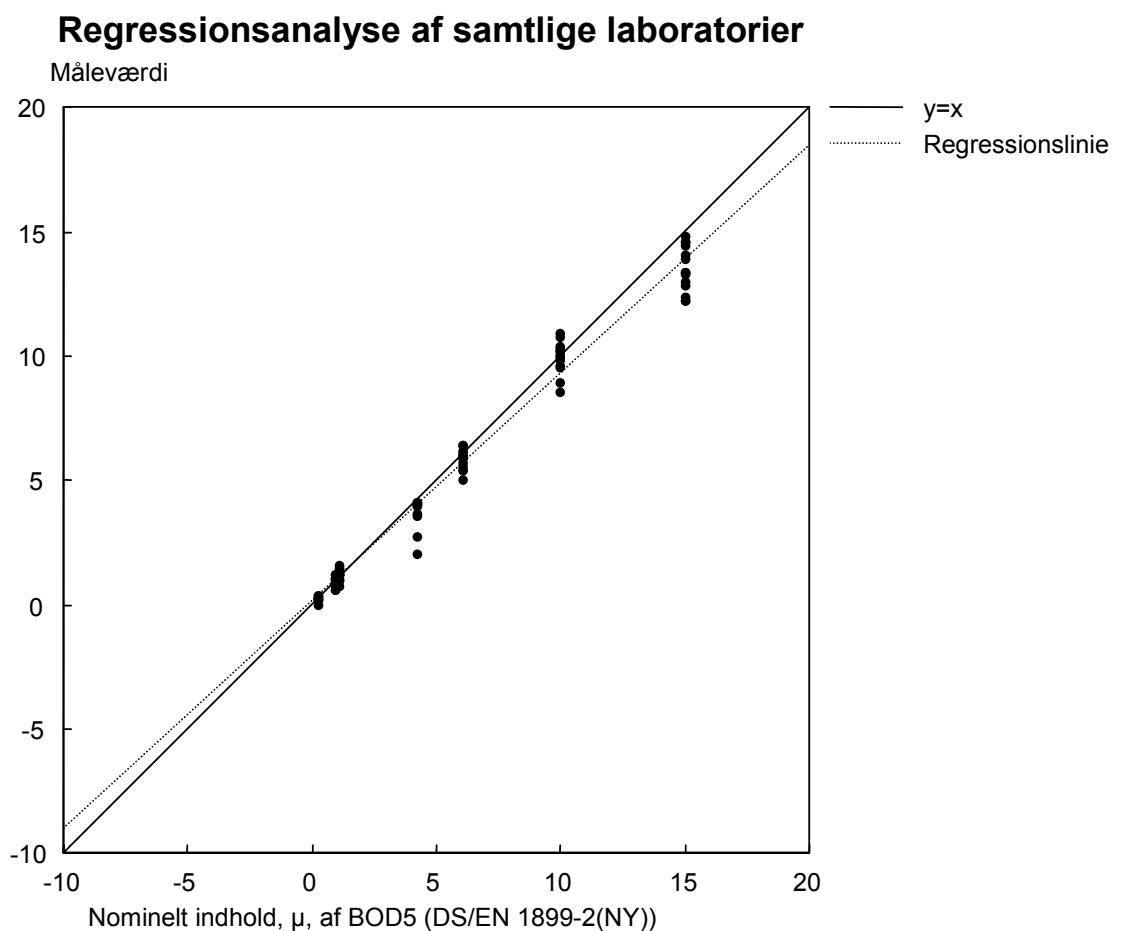
Prøve	Teoretisk værdi mg/L O ₂	DS/EN 1899-2 (NY)		Fortyndingsmetoder/egen metode	
		Fundet værdi mg/L O ₂	Genfinding %	Fundet værdi mg/L O ₂	Genfinding %
4 minus 1	4,98	4,735	95	4,69	94
6 minus 1	13,95	12,215	88	12,92	93
5 minus 2	9,00	9,10	101		
3	4,19	3,950	94	4,31	103
Middelgenfinding, %			95		97

Genfinding ved den ny metode er mindre end ved fortyndingsmetoderne, men forskel-
len er ikke stor. Imidlertid er det erfaringen fra præstationsprøvnin-
ger på ferskvand hvor både metode med og uden fortynding har været anvendt, at metode uden fortynding gi-

ver lidt lavere gennemsnit end fortyndingsmetoder. Spildevand anvendt som basis i denne metodeafprøvning er lige som det er tilfældet ved præstationsprøvninger stabiliseret inden udsendelse for at undgå ændring af indhold mens analysearbejdet pågår. En mulighed er derfor, at den biologiske aktivitet i de stabiliserede prøver derved er blevet så lav, at det påvirker det biokemiske oxygenforbrug for de metoder, der ikke anvender fortynding. Ved fortyndingsmetoder indgår normalt podning, hvorfor disse ikke forventes at være påvirket af lavere biologisk aktivitet i samme grad.

Genfinding (88-101%) er lavere end ved Referencelaboratoriets metodevalidering (100-113%).

Sammenhængen mellem nominel værdi og laboratorernes måleværdier er vist i figur 1.



Figur 1 Sammenhæng mellem nominel værdi og målt værdi for DS/EN 1899-2 (NY).

Referencelaboratoriet har derfor efter afholdelse af metodeafprøvningen foretaget en undersøgelse af BOD ved den ny metode, DS/EN 1899-2 (NY), parallelt med fortyndingsmetoden, DS/EN 1899-1. Ved undersøgelsen er anvendt frisk spildevand, afhentet umiddelbart inden start af måleprogrammet. Herudfra er fremstillet prøver svarende til de, der blev anvendt ved metodeafprøvningen. Programmet er suppleret med spildevand fra to rensesanlæg ud over de to, der blev anvendt ved metodeafprøvningen og desuden er prøven til kvalitetskontrol, som ved metodeafprøvningen blev fortyndet med de del-

tagende laboratoriers eget podevand, yderligere undersøgt fortyndet med to forskellige spildevandsprøver.

Resultaterne af de supplerende undersøgelser findes i bilag L og de bearbejdede data ses i tabel 8.

Tabel 8 Genfinding målt ved supplerende forsøg på Referencelaboratoriet.

Prøve	Teoretisk værdi mg/L O ₂	DS/EN 1899-2 (NY)		DS/EN 1899-1	
		Fundet værdi mg/L O ₂	Genfinding %	Fundet værdi mg/L O ₂	Genfinding %
A		2,65		2,93	
B		3,03		2,82	
H		1,01		1,22	
I		1,37		1,35	
Spiket prøve					
E minus A	4,98	4,89	98	4,87	98
G minus A	13,95	15,69	112	14,59	105
F minus B	9,00	8,27	92	8,49	94
Kontrol					
Tilsat prøve A	4,19	3,67	88	3,73	89
Tilsat prøve B	4,19	3,43	82	3,77	90
Tilsat podevand	4,19	2,95	70	2,91	69
Middelgenfinding, %			90		91

Resultaterne af de supplerende forsøg viser, at genfindingen ved anvendelse af frisk spildevand fortsat er forholdsvis lav, af samme størrelsesorden som ved det stabiliserede spildevand, der blev anvendt ved metodeafprøvningen. Resultaterne viser også (parret t-test) at der ikke er forskel på genfinding ved anvendelse af fortyndingsmetoden (DS/EN 1899-1) og den ny metode, DS/EN 1899-2 (NY). Genfindingen ligger i gennemsnit inden for tolerancen på det empiriske indhold af en glukose/glutaminsyreblending, som er angivet i DS/EN 1899-1.

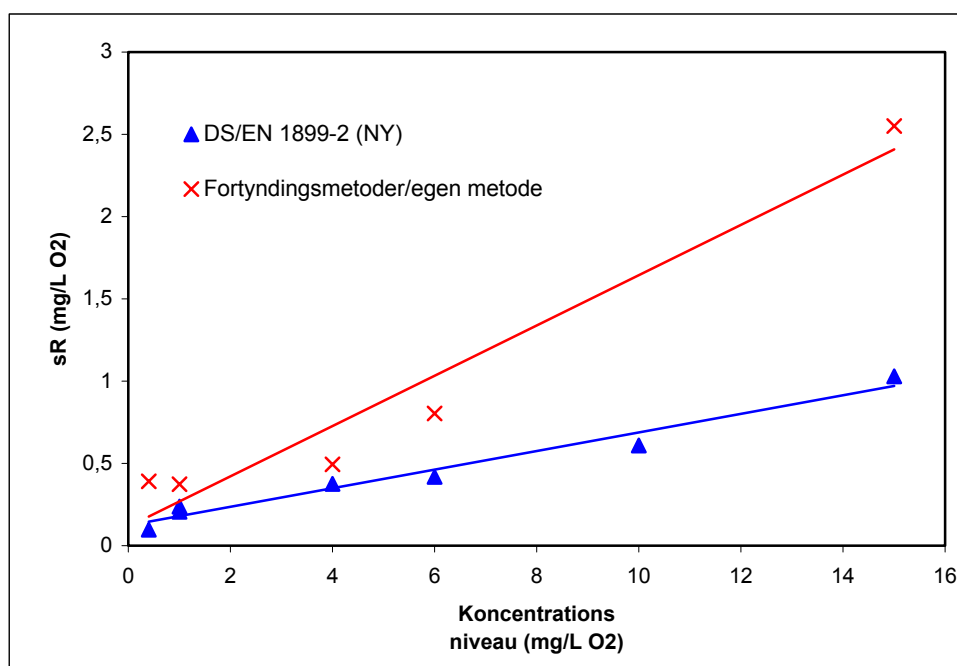
5.2 Præcision

Præcisionen opnået ved DS/EN 1899-2 (NY) er vist i tabel 5 og præcision ved fortyndingsmetode og egen metode i tabel 6. Disse data er summeret nedenfor i tabel 9.

Tabel 9 Præcision opnået ved DS/EN 1899-2 (NY) sammenlignet med præcision ved fortyndingsmetoden eller egen metode.

Prøve	Koncentrationsniveau mg/L O ₂	s _r (mg/L O ₂)		s _R (mg/L O ₂)	
		DS/EN 1899-2 (NY)	Fortyndingsmetoder/egen metode	DS/EN 1899-2 (NY)	Fortyndingsmetoder/egen metode
7	0,2 - 0,6	-	-	0,098	0,392
2	1	0,047		0,207	
1	1	0,089	0,105	0,238	0,374
3	4	0,356	0,126	0,375	0,494
4	6	0,136	0,147	0,419	0,804
5	10	0,409		0,608	
6	15	0,21	0,23	1,03	2,55

Tabel 9 viser for repeterbarhedsstandardafvigelse (s_r) dels, at der ikke sker en entydig stigning af s_r med stigende koncentration, og dels at s_r for den ny metode er sammenlignelig med s_r for de hidtil anvendte metoder (egen metode og fortyndingsmetoder). I modsætning hertil viser reproducerbarhedsstandardafvigelsen (s_R) klar stigning med stigende koncentration og mindre spredning for den ny metode sammenlignet med de hidtil anvendte. Dette er illustreret i figur 2.



Figur 2 Reproducerbarhedsstandardafvigelse (s_R) for DS/EN 1899-2 (NY) sammenlignet med fortyndingsmetoder, herunder egne metoder.

Præcisionen bestemt ved metodeafprøvningen bekræfter de præcisionsmål, som blev bestemt ved Referencelaboratoriets metodevalidering.

5.3 Detektionsgrænse

Repetbarhedsstandardafvigelsen er for begge metoder af størrelsesorden 0,1 mg/L O₂, hvilket betyder, at en detektionsgrænse på 0,5 mg/L O₂ burde være mulig uanset valg af metode. Resultaterne for prøve 1 og 2 for DS/EN 1899-2 (NY) antyder dog, at denne metode muligvis kan give en lavere detektionsgrænse, af størrelsesorden 0,2 - 0,3 mg/L O₂. Datamaterialet er dog for spinkelt til at konkludere om en lavere detektionsgrænse er mulig, men det kan med sikkerhed siges, at detektionsgrænsen 0,5 mg/L O₂ er opnåelig.

Detektionsgrænsen bekræfter de bestemmelser af detektionsgrænse, som blev foretaget ved Referencelaboratoriets metodevalidering.

6 KONKLUSIONER OG ANBEFALINGER

Metodeafprøvningen viser, at den udviklede metode til bestemmelse af BOD₅ på lavt niveau i afløbsvand fra renseanlæg er egnet til formålet. Metodeafprøvningen viser kvalitetsparametre for metoden som anført nedenfor.

Korrektthed bestemt under forudsætning af, at den empiriske værdi for BOD₅ i en blanding af lige dele glukose og glutaminsyre, som er gældende i henhold til DS/EN 1998-1:1998, er gældende. Herved giver en blanding af 1 g af hvert stof en BOD₅ på 1,40 g/L O₂:

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

Repeterbarhedsstandardafvigelse:

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 her 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 .

Det anbefales at udgive metoden, der er anført i bilag M, som metode fra Referencelaboratoriet.

Middelgenfindingen (95%) er forholdsvis lav, men ikke forskellig fra genfinding ved anvendelse af fortyndingsmetoden på de samme prøver. Det anbefales at opsamle yderligere data om genfinding ved metodens anvendelse i kommende præstationsprøvninger til belysning af metodens korrektthed. Såfremt disse data giver grundlag herfor, revideres metodens angivelse af korrektthed.

7 REFERENCER

- /1/ Miljøstyrelsens bekendtgørelse nr. 501, *Bekendtgørelse om spildevandstilladelser m.v. efter miljøbeskyttelseslovens kapitel 3 og 4*, 21. juni 1999.
- /2/ Miljøstyrelsens bekendtgørelse nr. 204, *Bekendtgørelse om ferskvandsdambrug*, 31. marts 1998.
- /3/ DS/EN 1899-1, *Vandundersøgelse, Biokemisk iltforbrug over n døgn (BOD_n), Del 1: Fortyndingsmetode med podning og tilsætning af N-allylthiourinstof*, 1999.
- /4/ DS/EN 1899-2, *Vandundersøgelse, Biokemisk iltforbrug over n døgn (BOD_n), Del 2: Metode uden fortynding*, 1999.
- /5/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium, DHI Institut for Vand og Miljø, *BOD_5 på lavt niveau, Udvikling og validering af metode til bestemmelse af BOD_5 på lavt niveau ud fra DS/EN 1899-2*, Rapport til Miljøstyrelsen, Juni 2000.
- /6/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium, DHI Institut for Vand og Miljø, *BOD_5 på lavt niveau, Evaluering af BOD_5 metoder til anvendelse på detektionsgrænseniveau i spildevand*, Rapport til Miljøstyrelsen, December 2000.
- /7/ Miljøstyrelsens bekendtgørelse nr. 637, *Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger udført af akkrediterede laboratorier, certificerede personer m.v.*, 30. juni 1997.
- /8/ Miljøstyrelsen, *Nationalt program for overvågning af vandmiljøet 1998 - 2003 "NOVA 2003", Programbeskrivelse*, 1999.
- /9/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium, DHI Institut for Vand og Miljø, *Usikkerhed for oxygenmålinger i forbindelse med BOD analyse*, Notat til Miljøstyrelsen, December 2001.
- /10/ DS/ISO 5725-2, *Nøjagtighed (korrekthed og præcision) af målemetoder og resultater – Del 2: Grundlæggende metode til bestemmelse af repeterbarhed og reproducerbarhed for en standardiseret målemetode*, 1995.
- /11/ DS/ISO 5725-5, *Nøjagtighed (korrekthed og præcision) af målemetoder og resultater – Del 5: Alternative metoder til bestemmelse af præcisionen af en standardiseret målemetode*, 2000.
- /12/ Miljøstyrelsens Referencelaboratorium, DHI Institut for Vand og Miljø, *Rådgivning ved revision af Bekendtgørelse nr. 637 - Sammenstilling af analysekvalitet fra præstationsprøvninger 1990 - 2001*, Rapport til Miljøstyrelsen, Marts 2002.

B I L A G

B I L A G A

Metodeforskrift DS/EN 1899-2 (NY)

Udkast til metodeforskrift for BOD₅ analyser på lavt niveau.

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

1.1 Detektionsgrænse

Detektionsgrænsen er 0,5 mg/L O₂

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 BOD₅ mindre end 0,2 mg/L O₂ 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 (C₄H₈N₂S) 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 (stamopløsning 2060 mg/L O₂ i batch VKI-21-2-0897) eller tilsvarende, alternativt stamopløsning fremstillet af en blanding af glukose og glutaminsyre.

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.

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 Beluftsudstyr

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°C i en fyldt, hermetisk lukket beholder efter prøvetagningen. Analyserne skal påbegyndes umiddelbart efter prøvetagningen, eller højest 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.

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:

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

I hver analyseserie udføres tillige mindst en kontrolanalyse, hvor 2 mL af en kontrol opløsning med cirka 2000 mg/L O_2 som BOD_5 (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 ud fra den gennemsnitlige, relative variationsbredde r:

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

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

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

7. Beregning af resultat

7.1 Bestemmelse af fortynding

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

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

C₁ er opløst ilt ved tiden 0 i mg O₂/L, og

C₂ er opløst ilt ved tiden 5 dage i mg O₂/L

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

7.2 Beregning af BOD₅ uden fortynding

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

$$BOD_5 = (C_1 - C_2)$$

C₁ og C₂ er beskrevet i 7.1

7.3 Beregning af BOD₅ med fortynding

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

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

C₁ og C₂ er beskrevet i 7.1.

C₃ er koncentrationen af opløst ilt fundet i blank testen (6.4) ved tiden 0 i mg O₂/L.

C₄ er koncentrationen af opløst ilt fundet i blank testen (6.4) ved tiden 5 dage i mg O₂/L

V_e er volumen af prøve benyttet til fremstilling af testopløsningen (se 6.3) i mL.

V_t er det totale volumen til fremstilling af testopløsningen (se 6.3) i mL.

7.4 Beregning af endeligt resultat

Gennemsnittet af de udregnede BOD₅ resultater for mindst 2 fortyndinger (inkl. ufortyndet), der opfylder kravet i 7.1, benyttes som analyseresultat. Resultatet angives med 2 betydende cifre.

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 O₂ under 7,5 mg/L O₂ 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 O₂
4. Bemærkninger om eventuelle modifikation i metoden eller andre supplerende oplysning om analysens gennemførelse

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

B I L A G B

Deltagerliste

NAVN
A/S AnalyCen
Eurofins A/S, Hørsholm
Eurofins Danmark A/S, Odense
Jysk Miljølaboratorium A/S
MILANA Miljølaboratoriet
Miljøcenter Vestjylland I/S
Mølleåværkets Driftslaboratorium
ROVESTA Miljø I/S
Steins Laboratorium A/S

B I L A G C

Information til deltagerne

Til deltagere i BOD metodeafprøvning

Eurofins A/S
Agern Allé 11
2970 Hørsholm

Tlf.: +45 70 22 42 30
Fax: +45 70 22 42 55
E-mail: mik@eurofins.dk
Web: www.eurofins.dk

Vedr.: Metodeafprøvning af modificeret metode til BOD i udløbsvand fra renseanlæg

Dato: 3. sep 2002
Init.: MIK
Sag: 20038-13

Tak for tilmeldingen til afprøvningen af den ny metode til BOD i udløbsvand fra renseanlæg (DS/EN 1899-2 (NY)).

Følgende prøvevand og ampuller er udsendt sammen med dette brev:

- Spildevand 1: Dunk med 10 liter
- Spildevand 2: Dunk med 5 liter
- Kontrolampul: 1 stk. ampul med 25 mL indhold
- Spike-ampuller: 3 stk. brune ampuller om ca. 22 mL

Resultatskemaet bedes returneret til KPMG, senest den 27. september 2002.

De modtagne resultater vil indgå anonymt i datatilbage melding og i rapport. Navne på de laboratorier som har deltaget i metodeafprøvningen vil indgå i rapporten.

De bearbejdede resultater vil blive udsendt til korrekturlæsning og information i tabel- og diagramform.

Såfremt der er problemer med de modtagne prøver eller spørgsmål i øvrigt i forbindelse med denne metodeafprøvning, er De naturligvis velkommen til at kontakte os.

Med venlig hilsen
Eurofins A/S

Mikael Krysell

Ulla O. Lund

VEJLEDNING

Fremgangsmåde for analyse:

En oversigt over de analyser som bedes udført findes i følgende tabel:

Prøve-nummer	Prøvebeskrivelse	Forventet BOD ₅	DS/EN 1899-1 (antal analyser)	Laboratoriets normale metode (antal analyser)	DS/EN 1899-2 (NY) (antal analyser)
1	Spildevand 1	ca. 1 mg/L O ₂		2	2
2	Spildevand 2	ca. 3 mg/L O ₂			2
3	Kvalitetskontrol	ca. 4 mg/L O ₂	2		2
4	Spildevand 1 + spike 1	ca. 6 mg/L O ₂		2	2
5	Spildevand 2 + spike 2	ca. 12 mg/L O ₂			2
6	Spildevand 1 + spike 3	ca. 15 mg/L O ₂		2	2
7	Laboratoriets fortyndingsvand	<1 mg/L O ₂	1		1-3 (gennemsnit rapporteres)

3. Spildevand 1: Afløbsvand fra renseanlæg med hovedsageligt husholdningsspildevand
4. Spildevand 2: Afløbsvand fra renseanlæg belastet med industri-spildevand
5. Kvalitetskontrol: En ampul med et kendt indhold fortyndet med laboratoriernes eget podemateriale og efterkorrigeret med podematerialets bidrag.
6. Spike 1, 2 og 3: Ampuller med spike-materiale
7. Fortyndingsvand: For 1899-1 podevand, for 1899-2 (NY) rent fortyndingsvand (millipore eller tilsv.)

Instruks til fremstilling af prøverne:

Fremstilling af prøve 1 og 2:

Spildevand 1 og 2 er færdige til analyse. Laboratoriet bedes udføre dobbeltbestemmelse af begge prøver ifølge DS/EN 1899-2 (ny), og desuden en dobbeltanalyse af Spildevand 1 ifølge den metode laboratoriet normalt bruger.

Da den forventede koncentration er rimlig godt kendt, regner vi med at det vil være nok med 2 fortyndinger (i praksis måske kun uden fortynding, da BOD er lav i begge prøver).

Fremstilling af prøve 3:

Ampul mærket ”Prøve 3, Kontrol” stabiliseres ved stuetemperatur, og knækkes på en sådan måde at glasdele ikke falder ned i den. Indholdet fortyndes 100 gange med laboratoriets eget podevand, f.eks. fortyndes 20 mL til 2000 mL.

Fremstilling af prøve 4-6

Ampullerne stabiliseres ved stuetemperatur, og knækkes på en sådan måde at glasdele ikke falder ned i dem. Spikemateriale udtages med pipette ifølge tabel neden:

Prøve	mL spikemateriale	Fortyndes med spildevand op til (mL):
Spildevand 1 + spike 1	10,00	5000
Spildevand 2 + spike 2	10,00	2000
Spildevand 1 + spike 3	10,00	2000

Analyserne bedes udført i tilfældig rækkefølge for hver metode.

Rapportering af resultater:

Resultatskemaet bedes brugt til rapportering af resultaterne.

NB! Hvis flere end én fortynding overholder kravet til iltforbrug, bedes laboratoriet rapportere et gennemsnit for det to fortyndinger (ifølge afsnit 7.3 i 1899-2 (NY)). Eksempel: For en prøve fremstilles dobbeltprøve i to fortyndinger, altså totalt 4 prøver. Hvis alle 4 overholder kravet til iltforbrug, bliver Resultat 1 gennemsnittet af resultaterne af den første flaske i hver fortynding, og Resultat 2 gennemsnittet af resultaterne for den anden flaske i hver fortynding, således at både Resultat 1 og 2 er beregnet som et gennemsnit af de to fortyndinger.

Venligst husk at angive metodekode for den metode laboratoriet har brugt som sin normale metode.

Resultaterne bedes sendt til:

KPMG

Att.: Gitte Goldschmidt

Borups Allé 177

2000 Frederiksberg

fax 3818 3882

således at de er KPMG i hænde senest 27. september 2002

Analyseresultater for metodeafprøvning af ny BOD-metode (DS/EN 1899-2 (NY))

Prøve-nummer	Prøvebeskrivelse	DS/EN 1899-1			Laboratoriets normale metode			DS/EN 1899-2 (NY)		
		BOD5 (mg/L O2)			BOD5 (mg/L O2)			BOD5 (mg/L O2)		
		Resultat 1*	Resultat 2*	antal#	Resultat 1*	Resultat 2*	antal#	Resultat 1*	Resultat 2*	antal#
1a	Spildevand 1									
2a	Spildevand 2									
3a	Kvalitetskontrol									
4a	Spildevand 1 + spike 1									
5a	Spildevand 2 + spike 2									
6a	Spildevand 1 + spike 3									
7	Laboratoriets fortynningsvand									

*: Resultaterne bedes angivet med tre betydende cifre. #: Antal fortyndinger som brugtes ved beregning af resultaterne

Metodekode for laboratoriets normale metode: _____ (se tabel næste side)

Kodenr:
Udfyldes af KPMG

Denne del opbevares af KPMG

Kodenr:
Udfyldes af KPMG

Laboratorium: _____ Underskrift: _____ Dato: _____

Resultatskemaet bedes returneret til: KPMG, att: Gitte Goldschmidt (Fax nr. 3818 3882), senest 27. september 2002

Metodekoder for ”laboratoriets normale metode”

Den metode som er brugt bedes anført på resultatskemaet

Metode-nummer	Princip	Reference
Standardmetoder		
1	Prøven fortyndes med oxygenholdigt vand, podevand, salte og A.T.U (2 mg/L). Prøven inkuberes i helt fyldte, lukkede flasker i mørke i 5 døgn ved 20°C. Oxygenindholdet bestemmes før og efter inkubation.	DS/EN 1899-1:1999; EN 1899-1:1998
2A	Prøven fortyndes med oxygenholdigt vand, podevand og salte. Prøven tilsættes A.T.U. Inkubationsperioden er som ved metode 1. Tilsat mængde A.T.U.: 2 mg/L.	DS 254/R, 1. udg.:1977
2B	Andet mg/L – specificer venligst mængde under kommentarer i resultatskema.	
3	Prøven tempereres og beluftes om nødvendigt. Prøven inkuberes i helt fyldte, lukkede flasker i mørke i 5 døgn ved 20°C. Oxygenindholdet bestemmes før og efter inkubation.	DS/EN 1899-2:1999; EN 1899-2:1998
4	Prøven fortyndes med oxygenholdigt vand, podevand og salte. Prøven tilsættes stof til hæmning af nitrifikation. Inkubationsperioden er som ved metode 1.	SM 19.-20. udg. metode 5210 B
Hurtigmetoder		
51	Dr. Lange 4-1650 mg/L	Dr. Lange LCK 555
52	Dr. Lange 0,5 – 12 mg/L.	Dr. Lange LCK 554
Andre metoder		
99	Anden metode (venligst anfør):	

Hvis reference er anført under ”Anden metode”, bedes også denne side returneret sammen med resultatskemaet.

Kodenr:
Udfyldes af KPMG

B I L A G D

Resultater fra test af potentielle referencestoffer

Forforsøg 1 (lactose og phenylalanin)

Prøve	Startværdi	Slutværdi
Blind – 4 dage	8.21	8.09
Blind – 4 dage	8.21	9.07
Blind – 5 dage	8.19	8.24
Blind – 5 dage	8.18	8.07
Lactos – 4 dage	8.20	0.07
Lactos – 4 dage	8.19	0.05
Lactos – 5 dage	8.24	0.06
Lactos – 5 dage	8.23	0.05
Phenylalanin – 4 dage	8.32	0.08
Phenylalanin – 4 dage	8.32	0.05
Phenylalanin – 5 dage	8.26	0.07
Phenylalanin – 5 dage	8.26	0.05

Forforsøg 2 (natriumbenzoat)

Prøve	Startværdi	Slutværdi
Blind – 4 dage	7.60	6.74
Blind – 4 dage	7.57	6.55
Blind – 5 dage	7.57	6.95
Blind – 5 dage	-	6.88
Na-benzoat – 4 dage	7.63	0.97
Na-benzoat – 4 dage		0.84
Na-benzoat – 5 dage	7.61	1.09
Na-benzoat – 5 dage		2.05

B I L A G E

Prøvefremstilling

Spildevand 1

Renset spildevand fra fra Nivå renseanlæg (hovedsageligt hus-holdningsspildevand). Vandet blev hentet fredag den 30. august og stabiliseret ved beluftning ved brug af peristaltisk pumpe weekenden over. Mandag den 2. september blev prøven fordelt på 10 L dunke og udsendt til laboratorierne

Spildevand 2

Renset spildevand fra fra Lundtofte renseanlæg (bidrag fra industrispildevand). Vandet blev hentet fredag den 30. august og stabiliseret ved beluftning ved brug af peristaltisk pumpe weekenden over. Mandag den 2. september blev prøven fordelt på 5 L dunke og udsendt til laboratorierne

Ampulopløsninger

Fremstilles i glasbeholder. Glasset renses ved vask og glødning. Kemikalierne tørres i varmeskab ved 105 grader i to timer

Ampul Spike 1

Stof	Stofmængde	Færdig koncentration
D-Glucose	8,9276 g	2500 mg/L O ₂ som BOD ₅
L-glutaminsyre	8,9278 g	
Milli-q vand op til	5000 mL	

Opløsningen fyldes på 150 stk 25 mL brune ampuller mærket A1, hvor der fyldes min. 20 mL i hver ampul. Ampullerne autoklaveres.

Ampul Spike 2

Stof	Stofmængde	Færdig koncentration
D-Glucose	3,8586 g	1800 mg/L O ₂ som BOD ₅
L-glutaminsyre	3,8560 g	
Milli-q vand op til	3000 g	

Opløsningen fyldes på 50 stk 25 mL brune ampuller mærket A2, hvor der fyldes ca. 20 mL i hver ampul. Ampullerne autoklaveres.

Ampul Spike 3

Stof	Stofmængde	Færdig koncentration
D-Glucose	9,9970 g	2800 mg/L O ₂ som BOD ₅
L-glutaminsyre	9,9944 g	
Milli-q vand op til	5000 mL	

Opløsningen fyldes på 150 stk 25 mL brune ampuller mærket A3, hvor der fyldes ca. 20 mL i hver ampul. Ampullerne autoklaveres.

Kvalitetskontrol

Standardampul til interlaboratorieundersøgelse, PP4, etiketteres "Prøve 3, kontrol".
Fremstilling af PP4:

Stof	Stofmængde	Færdig koncentration
D-Glucose	2,99 g	419 mg/L O ₂ som BOD ₅
L-glutaminsyre	2,99 g	
Milli-q vand op til	10000 g	

Opløsningen fyldes på 360 stk 25 ml brune ampuller, hvor der fyldes 25 ml i hver ampul. Ampullerne autoklaveres.

B I L A G F

Homogenitet og stabilitet

Homogeneity test BOD metodeafprøvning

Sample Ampul spike 3
Parameter NVOC, mg/L

Date	Sample	I	II	M. bottle	Var.replicate	Day mean	Day var.
11-16-02	Ampul 1	1633	1647	1640.0	98		
	Ampul 2	1647	1640	1643.5	25		
	Ampul 3	1682	1645	1663.5	685		
	Ampul 4	1639	1655	1647.0	128		
	Ampul 5	1654	1655	1654.5	1		
	Ampul 6	1629	1641	1635.0	72		
	Ampul 7	1639	1572	1605.5	2245		
	Ampul 8	1595	1670	1632.5	2813		
	Ampul 9	1639	1659	1649.0	200		
	Ampul 10	1649	1630	1639.5	181		
	Ampul 11	1644	1548	1596.0	4608		
	Ampul 12	1635	1653	1644.0	162	1637.5	369

Homogeneity

F test value = var.bottle/var.rep.	0.394
F critical value = inv. 95%(f bottle,f rep)	2.717
F critical value = inv.99%(f bottle,f rep)	4.220

	s	var.	f
Replicate	30.571	934.58	12
Bottle	19.196	368.50	11

Eurofins' standard deviation from internal quality control s(w) = 14.40

s = standard deviation

M. = mean

Var. = variance

Rep. = Replicate = within the bottle

Bottle = between bottles

f = number of degrees of freedom

Conclusion

Homogeneity: The standard deviation between bottles was tested against the standard deviation within a bottle. As the F-test value is less than 1 in the homogeneity test, the samples are considered homogeneous.

B I L A G G

Symboler og forkortelser

Tabeller

<	"Mindre end" er ikke medtaget i beregningerne
U, UL, **	Manuelt udelukkede resultater
UC, C**	Cochran outlier. Resultaterne er ikke medtaget i den statistiske behandling
UG, G**	Grubbs outlier. Resultaterne er ikke medtaget i den statistiske behandling

Plots

<	"Mindre end" er ikke medtaget i plots
U, UL, **	Manuelt udelukkede resultater, ikke medtaget i plots
•	Nominal værdi (= "sand" værdi)

Statistiske symboler

μ	Nominal værdi
p	Antal laboratorier der indgår i beregningerne. Dette svarer til antal rapporterede resultater minus eventuelle udelukkelser efter sagkyndig vurdering (**) minus Cochran outliers (UC) og minus Grubbs outliers (UG)
n	Antal resultater medtaget i beregningerne
m	Middelværdi af alle ikke-udelukkede resultater
M	Median
d	Den gennemsnitlige differens mellem resultater fra et prøvepar, korigeret for split
t	Test størrelse ved Student's t-test
p	Et sandsynlighedsniveau for en statistisk test
s	Standardafvigelse
F	Test størrelse for F-test
s_i	Den enkelte deltagers standardafvigelse, svarende til variationen ved gentagne bestemmelser af en prøve
s_r	Standardafvigelse inden for ét laboratorium
s_r^2	Repeterbarhed
s_L	Standardafvigelse mellem laboratorierne
s_L^2	Laboratorievarians
s_R	Standardafvigelse på reproducerbarheden
s_R^2	Reproducerbarhed
	$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2$
CV_r	Variationskoefficient inden for ét laboratorium $(s_r \cdot 100)/\mu$
CV_R	Total variationskoefficient $(s_R \cdot 100)/\mu$

B I L A G H

Kontrol af genfinding

BOD₅ (DS/EN 1899-2(NY)), mg/L O₂
 Kontrol af genfinding, gennemsnit af resultater

Laboratorium	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5	Niveau 6	Niveau 7
1	1.175	0.865	3.860	5.920	9.840	13.40	0.210
2	1.005	0.600	-	5.465	8.735	12.30	0.180
3	1.180	0.765	3.740	5.530	9.575	12.90	-0.020
4	1.370	1.175	4.040	6.045	10.100	14.70	0.325
5	1.335	1.005	2.360	6.375	10.430	14.24	0.160
6	0.850	1.105 UC	-	-	10.600	-	-
7	1.250	0.847	4.060	5.440	10.200	12.75	0.317
8	1.535	1.050	-	6.075	-	14.25	0.240
Antal lab., p	8	7	5	7	7	7	7
Antal repl., n	2	2	2	2	2	2	2
m	1.212	0.901	3.612	5.836	9.926	13.51	0.202
s ²	0.046	0.037	0.507	0.131	0.394	0.82	0.014
s	0.215	0.192	0.712	0.362	0.628	0.91	0.116
Nominel værdi, μ	1.05	0.95	4.19	6.03	9.95	15.0	0.21
Genfinding, %	115.5	94.8	86.2	96.8	99.8	90.0	96.1
$t = \sqrt{p} \cdot (m - \mu) / s$	2.1425	-0.6758	-1.8146	-1.4198	-0.1024	-4.3649	-0.1882
Sign. niveau, p(t)	0.0694	0.5244	0.1438	0.2055	0.9218	0.0047 **	0.8569

* markerer, at t-testet er signifikant på et 5%-niveau
 ** markerer, at t-testet er signifikant på et 1%-niveau
 *** markerer, at t-testet er signifikant på et 0,1%-niveau
 UC markerer en Cochran outlier

BOD₅ (Laboratoriets normale metode), mg/L O₂
 Kontrol af genfinding, gennemsnit af resultater

Laboratorium	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5	Niveau 6	Niveau 7
1	1.070	-	-	5.625	-	11.45	-
2	1.100	-	-	5.700	-	-	-
3	1.070	-	-	5.800	-	14.95	-
4	1.380	-	-	4.760	-	9.87	-
5	1.450	-	-	6.450	-	15.80	-
6	0.915	-	-	-	-	-	-
7	0.513	-	-	5.290 UC	-	14.40	-
8	2.585	-	-	7.425	-	13.59	-
Antal lab., p	8	0	0	6	0	6	0
Antal repl., n	2	2	2	2	2	2	2
m	1.260	-	-	5.960	-	13.34	-
s ²	0.369	-	-	0.806	-	5.10	-
s	0.607	-	-	0.898	-	2.26	-
Nominel værdi, μ	0.95	-	-	5.93	-	14.9	-
Genfinding, %	132.7	-	-	100.5	-	89.5	-
$t = \sqrt{p} \cdot (m - \mu) / s$	1.4457	-	-	0.0818	-	-1.6901	-
Sign. niveau, p(t)	0.1915	-	-	0.9380	-	0.1518	-

Ingen teststørrelser blev fundet signifikante.
 UC markerer en Cochran outlier

BOD₅ (DS/EN 1899-1), mg/L O₂

Kontrol af genfinding, gennemsnit af resultater

Laboratorium	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5	Niveau 6	Niveau 7
1	-	-	3.960	-	-	-	1.290
2	-	-	-	-	-	-	0.900
3	-	-	4.210	-	-	-	0.600
4	-	-	4.390	-	-	-	0.270
5	-	-	4.750	-	-	-	0.600
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	3.840	-	-	-	0.470
8	-	-	4.930	-	-	-	1.020
Antal lab., p	0	0	6	0	0	0	7
Antal repl., n	2	2	2	2	2	2	2
m	-	-	4.347	-	-	-	0.736
s ²	-	-	0.186	-	-	-	0.123
s	-	-	0.431	-	-	-	0.351
Nominal værdi, μ	-	-	4.19	-	-	-	0.60
Genfinding, %	-	-	103.7	-	-	-	122.6
$t = \sqrt{p} \cdot (m - \mu) / s$	-	-	0.8899	-	-	-	1.0229
Sign. niveau, p(t)	-	-	0.4143	-	-	-	0.3458

Ingen teststørrelser blev fundet signifikante.

B I L A G I

Resultater fra deltagerne

Prøve Laboratorium	BOD ₅ DS/EN 1899-2 (NY), mg/L O ₂							
	1 Nominel værdi 1,05		2 Nominel værdi 0,95		3 Nominel værdi 4,19		4 Nominel værdi 6,03	
1	1,18	1,17	0,89	0,84	4,10	3,62	5,93	5,91
2	1,04	0,97	0,61	0,59	-	-	5,53	5,40
3	1,19	1,17	0,71	0,82	3,91	3,57	5,37	5,69
4	1,42	1,32	1,19	1,16	3,99	4,09	5,95	6,14
5	1,28	1,39	0,97	1,04	2,72	2,00	6,38	6,37
6	0,94	0,76	1,30	0,91	-	-	-	-
7	1,32	1,18	0,830	0,863	4,06	4,06	5,00	5,88
8	1,56	1,51	1,07	1,03	-	-	6,12	6,03

Prøve	BOD ₅ egen metode, mg/L O ₂			BOD ₅ DS/EN 1899-1, mg/L O ₂		BOD ₅ egen metode, mg/L O ₂	
	1 Nominel værdi 0,95			3 Nominel værdi 4,19		4 Nominel værdi 5,93	
Laboratorium							
1	1,08	1,06		4,29	3,63	5,63	5,62
2	1,0	1,2		-	-	5,6	5,8
3	1,12	1,02		4,18	4,24	5,78	5,82
4	1,43	1,33		4,45	4,33	4,69	4,83
5	1,4	1,5		4,8	4,7	6,6	6,3
6	0,95	0,88		-	-	-	-
7	0,513	0,513		4,12	3,56	5,82	4,76
8	2,71	2,46		4,99	4,87	7,46	7,39

Prøve	BOD ₅ DS/EN 1899-2 (NY), mg/L O ₂					
	5 Nominel værdi 9,95		6 Nominel værdi 15,0		7 Nominel værdi 0,21	
Laboratorium						
1	9,86	9,82	13,4	13,4	0,21	-
2	8,54	8,93	12,4	12,2	0,18	-
3	9,52	9,63	12,8	13,0	-0,02	-
4	10,0	10,2	14,8	14,6	0,325	-
5	10,74	10,12	14,44	14,04	0,16	-
6	10,3	10,9	-	-	-	-
7	10,0	10,4	13,3	12,2	0,317	-
8	-	-	14,6	13,9	0,24	-

Prøve		BOD ₅ egen metode, mg/L O ₂		BOD ₅ DS/EN 1899-1, mg/L O ₂		
		6 Nominel værdi 14,9		7 Nominel værdi 0,60		Metode nr. for egen metode
Laboratorium						
1		11,4	11,5	1,29	-	1
2		-	-	0,90	-	2A
3		14,9	15,0	0,60	-	3/2A
4		9,98	9,75	0,270	-	1
5		16,0	15,6	0,6	-	2A
6		-	-	-	-	2A
7		14,5	14,3	0,470	-	1
8		13,44	13,74	1,02	-	1

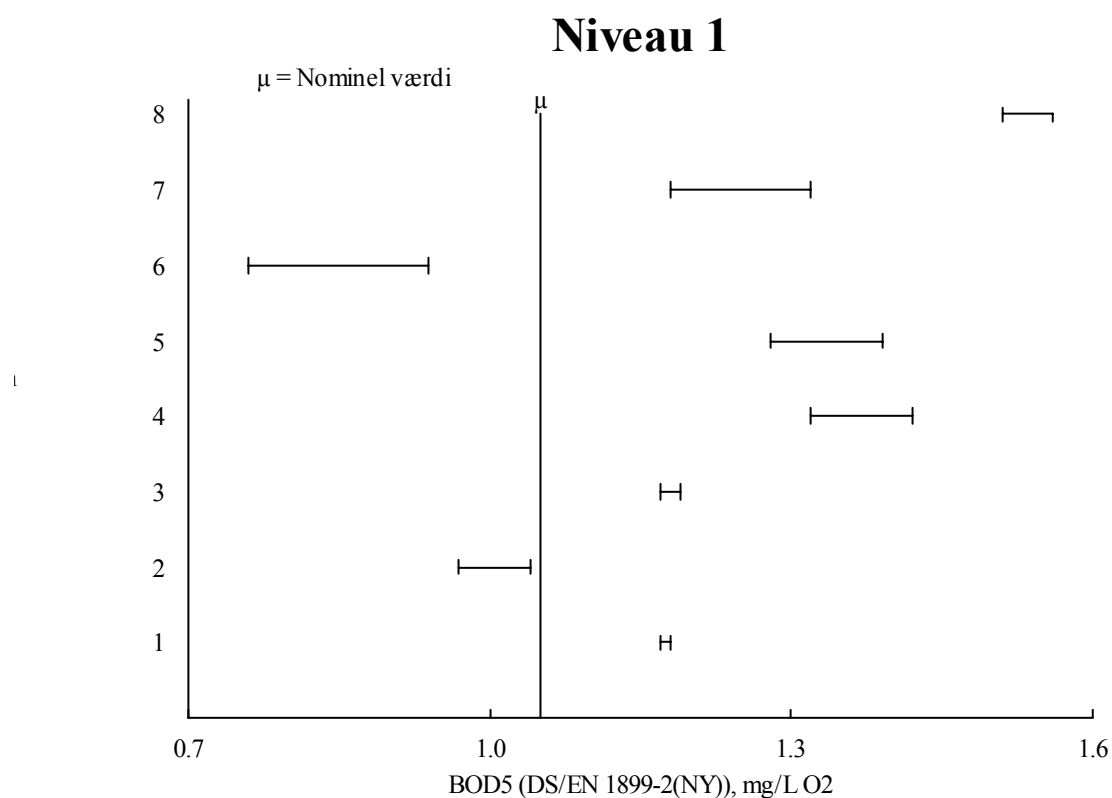
B I L A G J

Metoder

Metode-nummer	Princip	Reference
Standardmetoder		
1	Prøven fortyndes med oxygenholdigt vand, podevand, salte og A.T.U (2 mg/L). Prøven inkuberes i helt fyldte, lukkede flasker i mørke i 5 døgn ved 20°C. Oxygenindholdet bestemmes før og efter inkubation.	DS/EN 1899-1:1999; EN 1899-1:1998
2A	Prøven fortyndes med oxygenholdigt vand, podevand og salte. Prøven tilsættes A.T.U. Inkubationsperioden er som ved metode 1. Tilsat mængde A.T.U.: 2 mg/L.	DS 254/R, 1. udg.:1977
3	Prøven tempereres og beluftes om nødvendigt. Prøven inkuberes i helt fyldte, lukkede flasker i mørke i 5 døgn ved 20°C. Oxygenindholdet bestemmes før og efter inkubation. Tilsat mængde A.T.U.: 2 mg/L.	DS/EN 1899-2:1999, modificeret; EN 1899-2:1998-modificeret

B I L A G K

Grafisk afbildning af deltagernes resultater



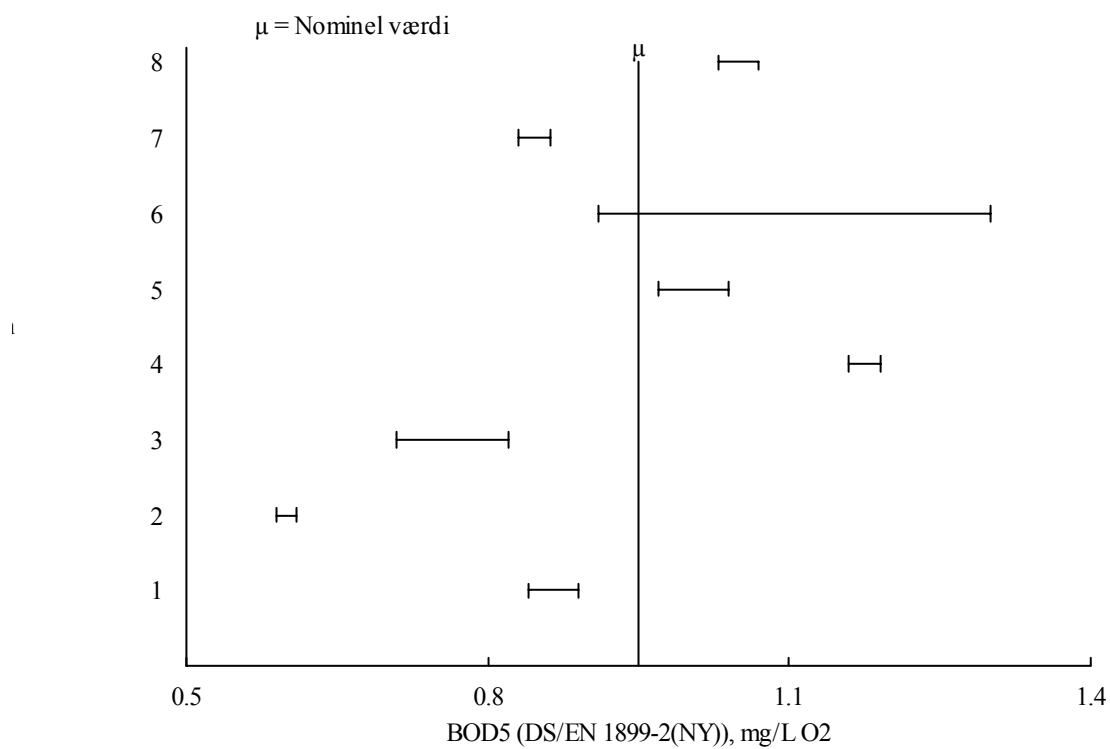
Alle resultater inklusive outliers: $n = 16$ Middelværdi = 1.20

Std.afv = 0.21

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 16$ Middelværdi = 1.20

Std.afv = 0.21

Niveau 2



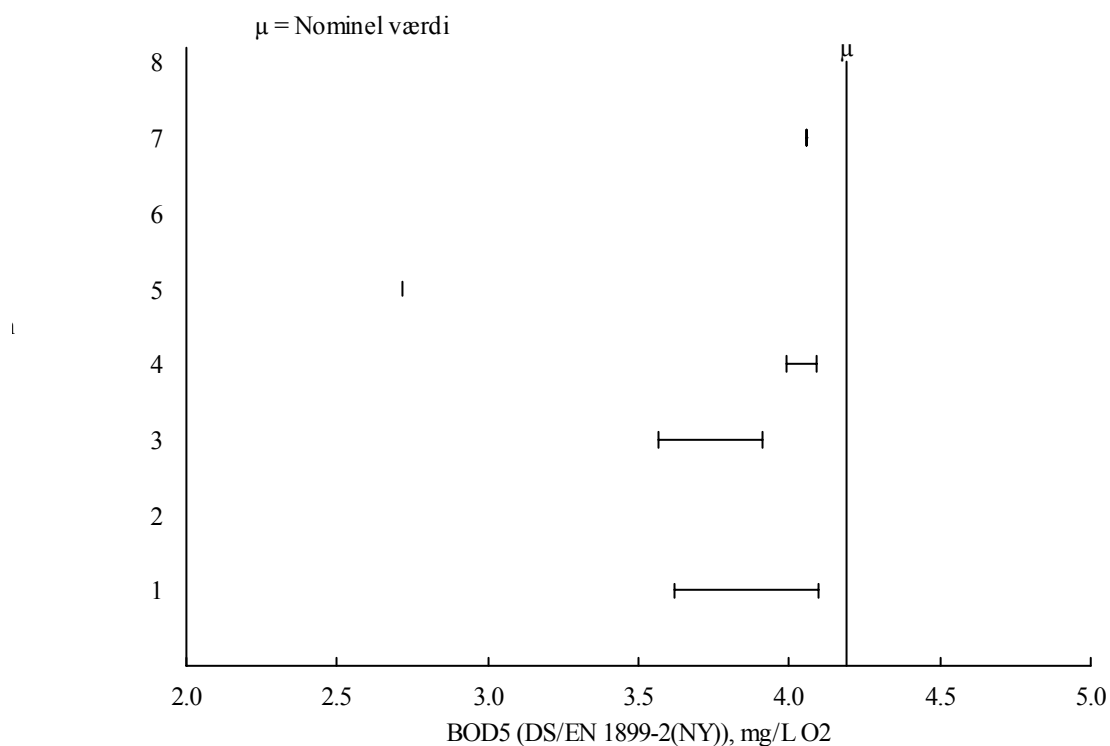
Alle resultater inklusive outliers: $n = 16$ Middelværdi = 0.93

Std.afv = 0.20

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 16$ Middelværdi = 0.93

Std.afv = 0.20

Niveau 3



Alle resultater inklusive outliers: $n = 10$ Middelværdi = 3.60

Std.afv = 0.71

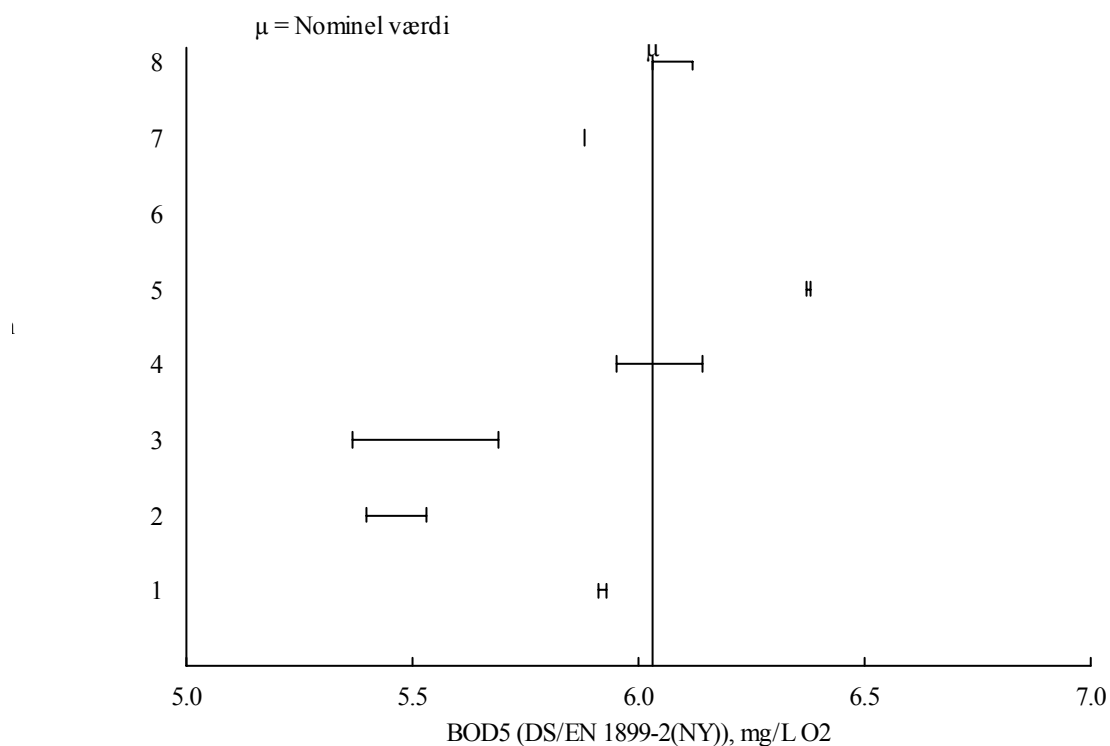
Alle resultater eksklusive outliers: $n = 10$ Middelværdi = 3.60

Std.afv = 0.71

Resultater der ikke er medtaget i ovenstående diagram:

Laboratorium 5, resultat=2.00

Niveau 4



Alle resultater inklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 5.80

Std.afv = 0.40

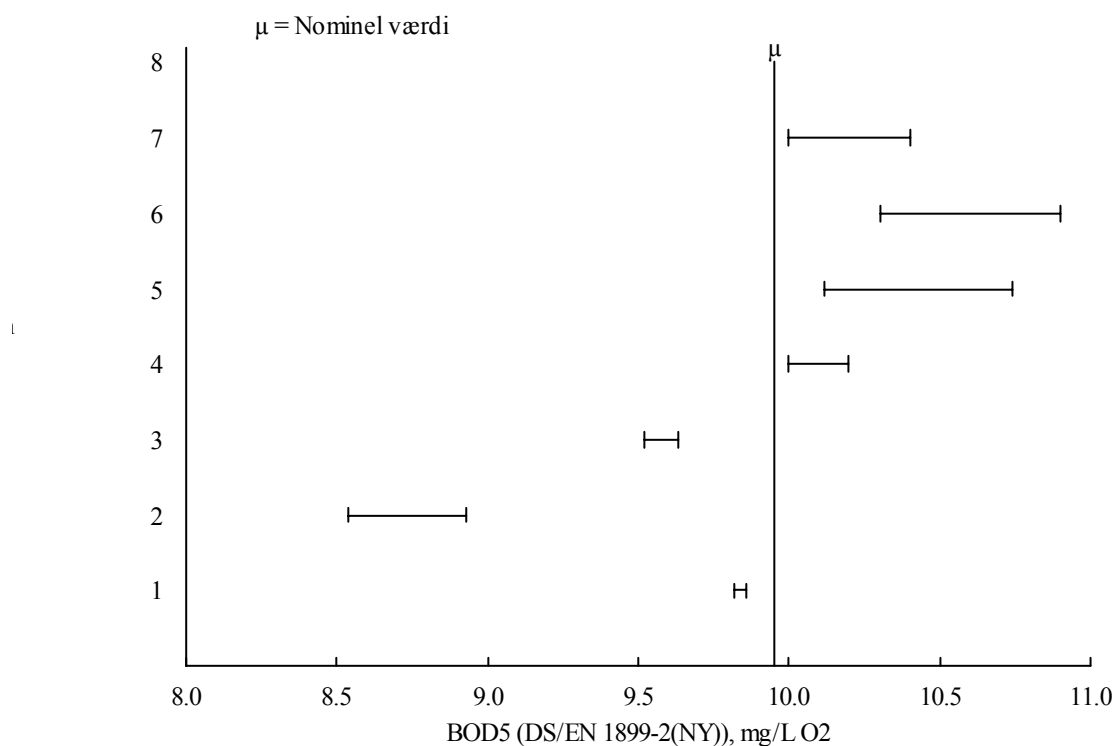
Alle resultater eksklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 5.80

Std.afv = 0.40

Resultater der ikke er medtaget i ovenstående diagram:

Laboratorium 7, resultat=5.00

Niveau 5



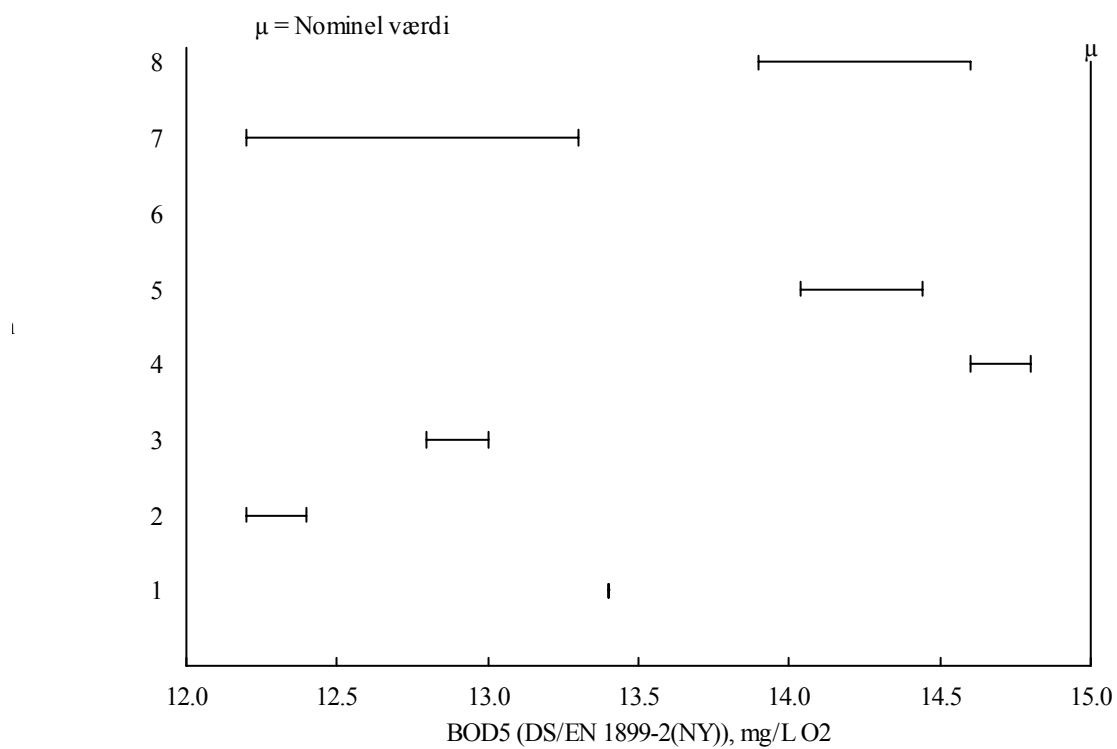
Alle resultater inklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 9.90

Std.afv = 0.64

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 9.90

Std.afv = 0.64

Niveau 6



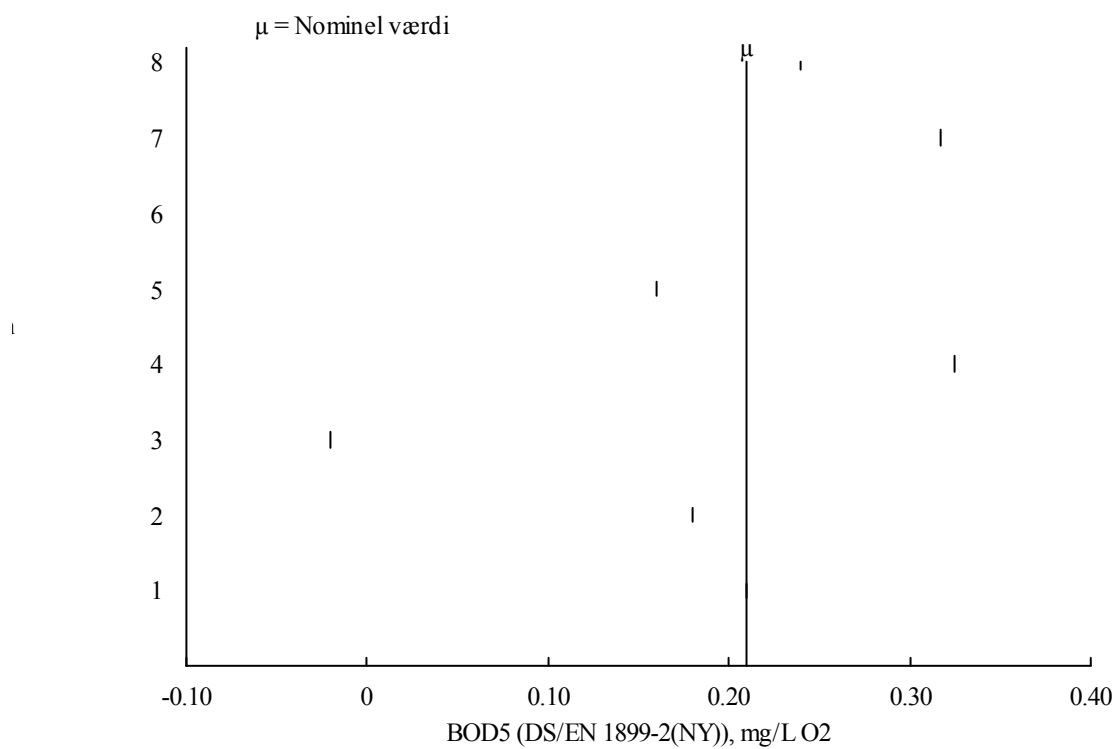
Alle resultater inklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 14.0

Std.afv = 0.9

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 14.0

Std.afv = 0.9

Niveau 7



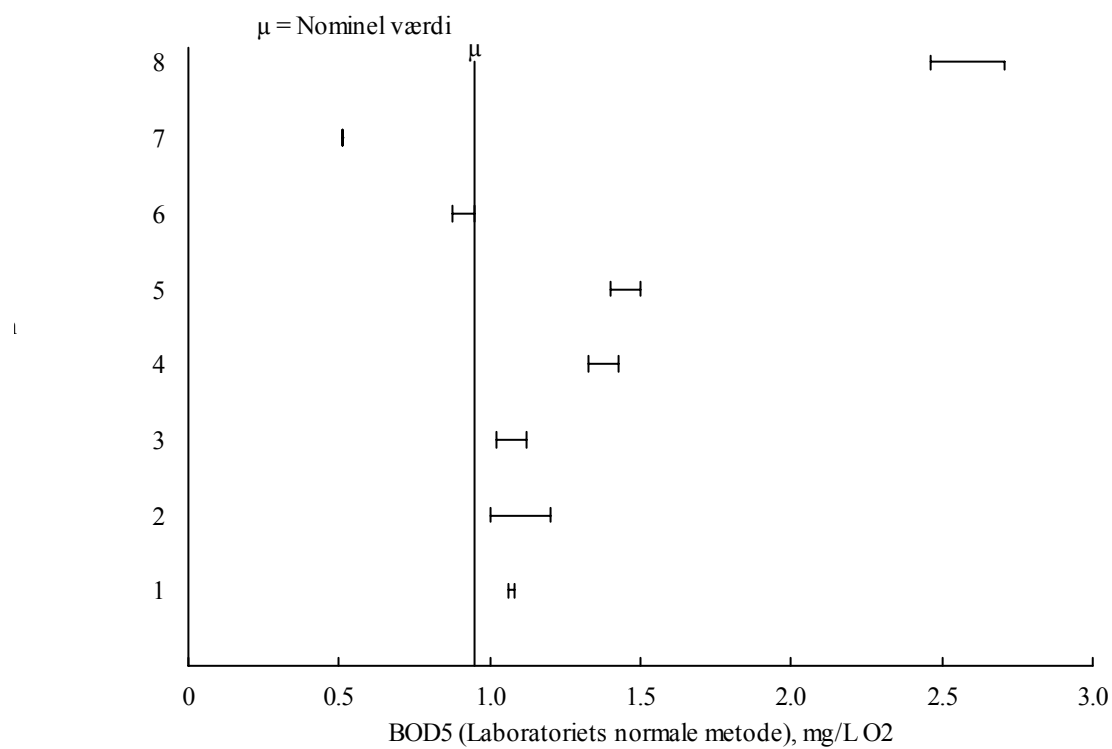
Alle resultater inklusive outliers: $n = 7$ Middelværdi = 0.20

Std.afv = 0.12

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 7$ Middelværdi = 0.20

Std.afv = 0.12

Niveau 1



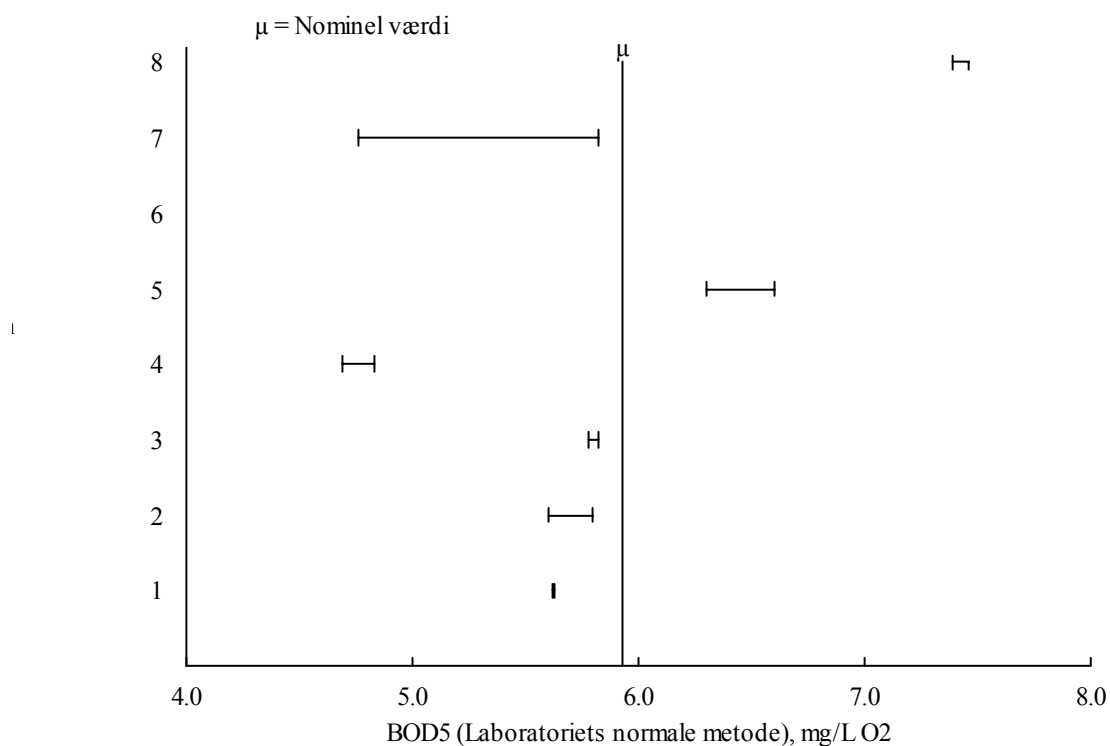
Alle resultater inklusive outliers: $n = 16$ Middelværdi = 1.30

Std.afv = 0.59

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 16$ Middelværdi = 1.30

Std.afv = 0.59

Niveau 4



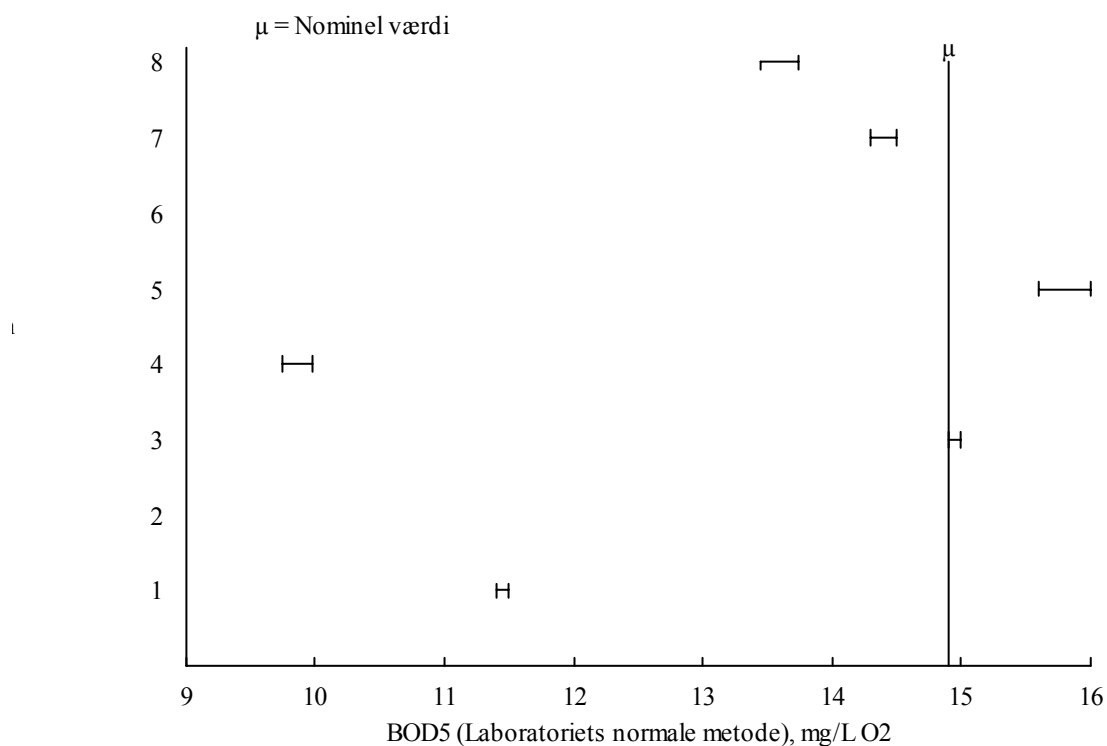
Alle resultater inklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 5.90

Std.afv = 0.85

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 14$ Middelværdi = 5.90

Std.afv = 0.85

Niveau 6



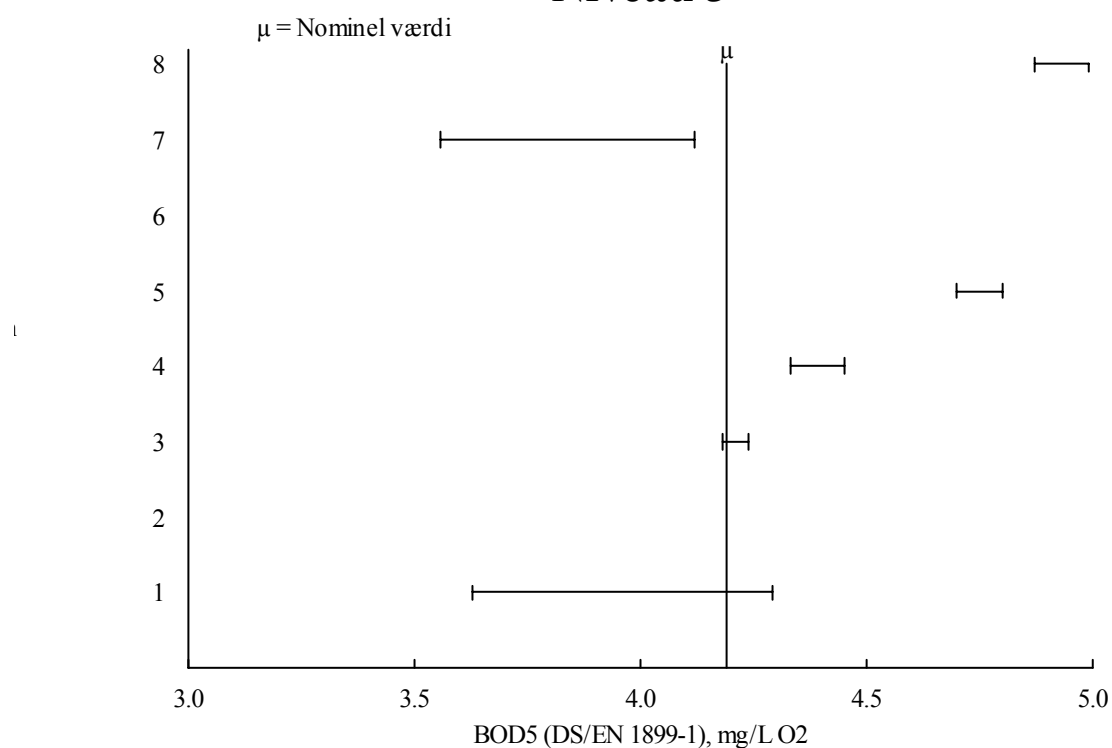
Alle resultater inklusive outliers: $n = 12$ Middelværdi = 13.0

Std.afv = 2.2

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 12$ Middelværdi = 13.0

Std.afv = 2.2

Niveau 3



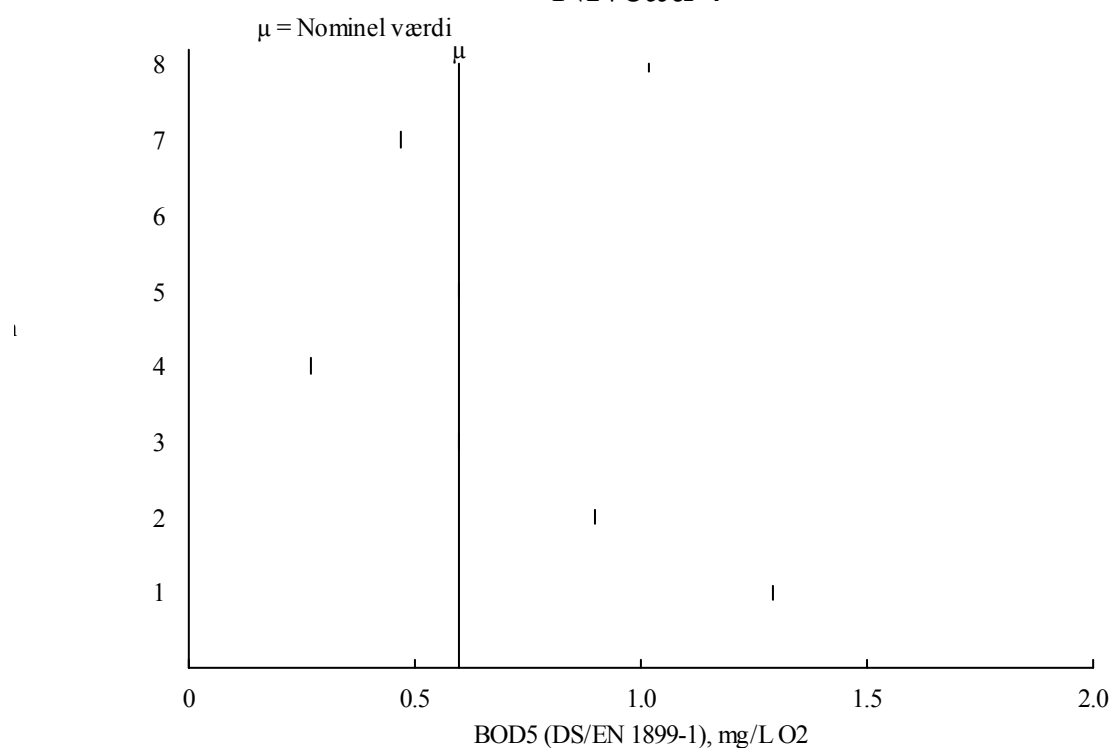
Alle resultater inklusive outliers: $n = 12$ Middelværdi = 4.30

Std.afv = 0.45

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 12$ Middelværdi = 4.30

Std.afv = 0.45

Niveau 7



Alle resultater inklusive outliers: $n = 7$ Middelværdi = 0.74

Std.afv = 0.35

Alle resultater eksklusive outliers: $n = 7$ Middelværdi = 0.74

Std.afv = 0.35

B I L A G L

Resultater af supplerende forsøg

Prøver

Prøve	Prøvebeskrivelse	Forventet BOD ₅	DS/EN 1899-1 (antal analyser)	DS/EN 1899-2 (NY) (antal analyser)
A	Spildevand 1	a = ca. 1 mg/L O ₂	2	2
B	Spildevand 2	b = ca. 3 mg/L O ₂	2	2
C	Spildevand 1 + Kvalitetskontrol	a + 4,19 mg/L O ₂	2	2
D	Spildevand 2 + Kvalitetskontrol	b + 4,19 mg/L O ₂	2	2
E	Spildevand 1 + spike 1	a + 5 mg/L O ₂	2	2
F	Spildevand 2 + spike 2	b + 9 mg/L O ₂	2	2
G	Spildevand 1 + spike 3	a + 14 mg/L O ₂	2	2
H	Spildevand 3	c	2	2
I	Spildevand 4	d	2	2
K	Kvalitetskontrol fortyndet med podet fortyndingsvand	e + 4,19 mg/L O ₂	2	2

Spildevand 1

Renset spildevand fra fra Nivå renseanlæg (hovedsageligt husholdningsspildevand). Vandet blev hentet om morgenen samme dag som BOD-analyserne blev startet.

Spildevand 2

Renset spildevand fra fra Lundtofte renseanlæg (bidrag fra industrispildevand). Vandet blev hentet om morgenen samme dag som BOD-analyserne blev startet.

Spildevand 3

Renset spildevand fra fra Usserød renseanlæg (hovedsageligt husholdningsspildevand). Vandet blev hentet om morgenen samme dag som BOD-analyserne blev startet.

Spildevand 4

Renset spildevand fra fra Måløv renseanlæg (hovedsageligt husholdningsspildevand). Vandet blev hentet om morgenen samme dag som BOD-analyserne blev startet.

Resultater

Prøve	BOD ₅ (mg/L O ₂)			
	DS/EN 1899-2 (NY)		DS/EN 1899-1	
A	2,40	2,89	2,89	2,96
B	2,88	3,17	2,66	2,97
C	6,33	6,30	6,69	6,61
D	6,27	6,64	6,43	6,74
E	7,46	7,61	7,66	7,92
F	11,40	11,18	11,06	11,55
G	18,95	17,72	17,99	17,04
H	0,92	1,10	1,16	1,27
I	1,42	1,31	1,40	1,29
K	2,76*	3,13*	3,03*	2,78*

*: Referencelaboratoriets kontrol var usædvanligt lav ved pågældende analyseserie. Målingen vil blive gentaget.

B I L A G M

Endelig metodeforskrift (REFLAB Metode 2:2002)

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 BOD_5 på 2100 ± 200 mg/L O_2 . Ved denne metode forventes en genfindning 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 $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

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 Beluftsudstyr

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 Dobbeltbestemmelse 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 :

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

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 O_2 som BOD_5 (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 :

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

8. Beregning af resultat

8.1 Krav til oxygenforbrug under testforløbet

Til udregning af BOD_5 benyttes de testopløsninger, der opfylder kravet:

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

C_1 er opløst oxygen ved tiden 0 i mg/L O_2 , og
 C_2 er opløst oxygen ved tiden 5 dage i mg/L O_2 .

8.2 Beregning af BOD_5 uden fortynding

Det biokemiske oxygenforbrug efter 5 dage beregnes i mg/L O_2 ved

$$BOD_5 = (C_1 - C_2)$$

C_1 og C_2 er beskrevet i 8.1.

8.3 Beregning af BOD_5 med fortynding

Det biokemiske oxygenforbrug efter 5 dage beregnes i mg/L O_2 ved

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

C_1 og C_2 er beskrevet i 8.1.

C_3 er koncentrationen af opløst oxygen fundet i blind testen (7.4) ved tiden 0 i mg/L O_2 .

C_4 er koncentrationen af opløst oxygen fundet i blind testen (7.4) ved tiden 5 dage i mg/L O_2 .

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 BOD_5 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 BOD_5 i en blanding af lige dele glukose og glutaminsyre er gældende. Herved giver en blanding af 1 g af hvert stof en BOD_5 på 1,40 mg/L O_2 .

Korrekthed:

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

Repeterbarhedsstandardafvigelse:

0,05 – 0,09 mg/L O_2 ved koncentration 1 mg/L O_2 (2 prøver).

1 – 9% i koncentrationsområdet fra 4 til 15 mg/L O_2 (4 prøver).

Reproducerbarhedsstandardafvigelse:

0,1 - 0,2 mg/L O_2 i koncentrationsområdet 0,2 - 1 mg/L O_2 (3 prøver).

6 – 9% i koncentrationsområdet fra 4 til 15 mg/L O_2 (4 prøver).

Detektionsgrænse:

Ud fra standardafvigelsen for repeterbarhed ved lav koncentration (0,05 – 0,09 mg/L O_2) findes, at en detektionsgrænse på 0,5 mg/L O_2 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:

5. Reference til denne metode
6. Angivelse af, at nitrifikation var undertrykt
7. Resultatet i mg/L O_2
8. Bemærkninger om eventuelle modifikationer i metoden eller andre supplerende oplysninger om analysens gennemførelse

Det skal endvidere anføres, om BOD_5 resultater er fundet med eller uden fortynding.