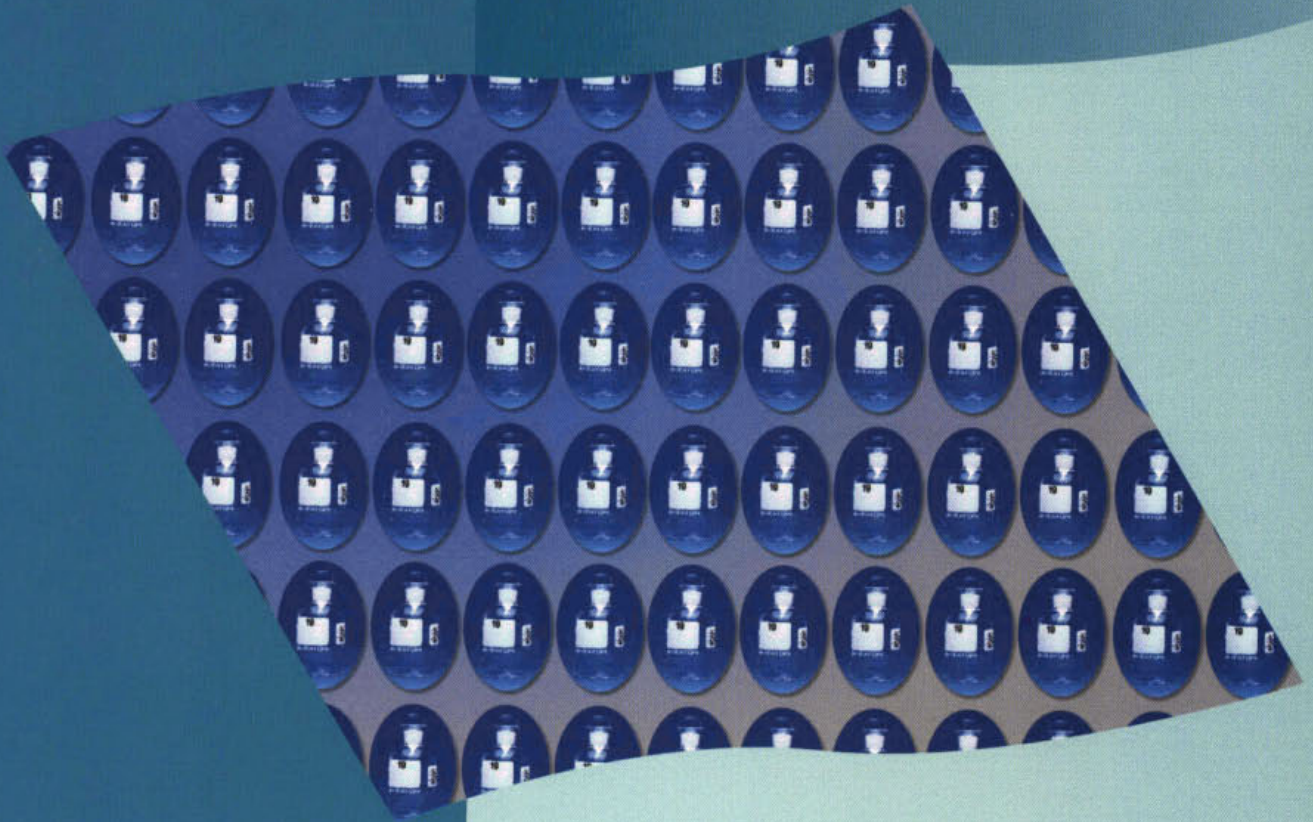


2002-04\_optimalisatie-BZV5-analyse

**stowa**

King Toegepast Onderzoek Waterbeheer

## Optimalisatie van de BZV<sub>5</sub>-analyse



2002 04

## Optimalisatie van de BZV<sub>5</sub>-analyse



illustratie's D.W. Clark and J. Carley, *The Wizard of BOD's*, Public Works, January, 1992

2002

04

Arthur van Schendelstraat 816  
Postbus 8090, 3503 RB Utrecht  
Telefoon 030 232 11 99  
Fax 030 232 17 66  
E-mail [stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl)  
<http://www.stowa.nl>

Publicaties en het publicatie-  
overzicht van de STOWA kunt u  
uitsluitend bestellen bij:  
*Hageman Fulfilment*  
Postbus 1110  
3330 CC Zwijndrecht  
tel. 078 - 629 33 32  
fax 078 - 610 42 87  
e-mail: [hff@wxs.nl](mailto:hff@wxs.nl)  
o.v.v. ISBN- of bestelnummer en  
een duidelijk afleveradres.  
ISBN 90.5773.159.2

## INHOUDSOPGAVE

blz.

	<b>TEN GELEIDE</b>	3
	<b>SAMENVATTING</b>	5
	<b>SUMMARY</b>	
<b>1</b>	<b>INLEIDING</b>	9
1.1	Algemeen	9
1.2	Probleemstelling	9
1.3	Doelstelling	9
1.4	Leeswijzer	9
<b>2</b>	<b>AANPAK VAN HET PROJECT</b>	10
2.1	Literatuuronderzoek	10
2.2	Enquête	10
2.3	Praktijkonderzoek	10
2.4	Verbeteranalyse	10
<b>3</b>	<b>ACHTERGRONDINFORMATIE BIJ DE BZV<sub>5</sub>-ANALYSE</b>	11
3.1	Principe van de BZV-analyse	11
3.2	Geschiedenis van de BZV-analyse	11
3.3	Kritiek op de BZV-analyse	12
3.4	De kinetiek van de BZV-analyse	13
<b>4</b>	<b>LITERATUURONDERZOEK</b>	
4.1	Algemeen	17
4.2	Monstername, transport en conservering	18
4.3	Voorbehandeling van de monsters	19
4.4	Verdunningswater	19
4.5	Invloed van entmateriaal	20
4.6	Incubatie	21
4.7	Invloed van temperatuur	22
4.8	Invloed van nitrificatie	23
4.9	Zuurstofmeting	24
<b>5</b>	<b>ENQUÊTE</b>	27
5.1	Algemeen	27
5.2	Monstername, transport en conservering	27
5.3	Voorbehandeling van de monsters	27
5.4	Entmateriaal	28
5.5	Verdunningswater	29
5.6	Incubatie	29
5.7	Zuurstofmeting	29

<b>6</b>	<b>KNELPUNTENANALYSE</b>	31
6.1	Algemeen	31
6.2	Invloed van conservering	31
6.3	Invloed van homogenisering	32
6.4	Invloed van ATU	32
6.5	Invloed van het entmateriaal	32
6.6	Invloed van menging	33
6.7	Invloed van het temperatuurprofiel	33
6.8	Invloed van de eindconcentratie zuurstof	33
6.9	Negatieve blanco's	33
<b>7</b>	<b>PRAKTIJKONDERZOEK</b>	35
7.1	Algemeen	35
7.2	Onderzoeksopzet	35
7.2.1	Invloed van conservering	35
7.2.2	Invloed van homogenisering	36
7.2.3	Invloed van ATU	36
7.2.4	Invloed van het entmateriaal	36
7.2.5	Invloed van menging	37
7.2.6	Invloed van het temperatuurprofiel	37
7.2.7	Invloed van de eindconcentratie zuurstof	37
7.2.8	Negatieve blanco's	38
7.2.9	Ringtest	38
7.3	Procedure van de BZV <sub>5</sub> -analyse	38
7.4	Resultaten en discussie	38
7.4.1	Invloed van conservering	38
7.4.2	Invloed van homogenisering	41
7.4.3	Invloed van ATU	41
7.4.4	Invloed van het entmateriaal	42
7.4.5	Invloed van menging	44
7.4.6	Invloed van het temperatuurprofiel	44
7.4.7	Invloed van de eindconcentratie zuurstof	45
7.4.8	Negatieve blanco's	46
7.4.9	Ringtest	46
<b>8</b>	<b>VERBETERANALYSE</b>	49
8.1	Algemeen	49
8.2	Conservering	50
8.3	Homogenisering van het monster	52
8.4	Toevoeging van ATU	53
8.5	Type entmateriaal	53
8.6	Menging	55
8.7	Temperatuur	55
8.8	Eindconcentratie zuurstof	55
8.9	Invloed van de verbeteranalyse op de prestatiekenmerken	56
<b>9</b>	<b>CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN</b>	59
<b>10</b>	<b>LITERATUURREFERENTIES</b>	61

## TEN GELEIDE

Het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) is een veel gebruikte parameter voor het meten van de organische verontreiniging van afvalwater en oppervlaktewater. De mogelijkheid om via biochemische oxidatie waterstromen te karakteriseren kent een lange geschiedenis. Al in 1884 werd hier voor het eerst melding van gemaakt en vanaf dat moment is de BZV-analyse voortdurend onderhevig geweest aan verandering, verbetering en verfijning. Met een gemiddelde van circa één keer per decennium werd een aangepast analysevoorschrift gepresenteerd.

De BZV-analyse is in de literatuur ook regelmatig onderworpen aan scherpe kritiek aangaande de uitvoering en toepassing van het BZV als afvalparameter. Alhoewel de kritiek vaak terecht werd geuit, is tot heden ten dage het BZV wereldwijd een standaard gebleven voor de hoeveelheid afbreekbaar organisch materiaal in watermonsters. De parameters chemisch zuurstofverbruik (CZV) of 'total organic carbon' (TOC) vormen geen direct alternatief omdat ze geen informatie opleveren over de afbreekbaarheid van het organisch materiaal. Het is juist die afbreekbaarheid die van doorslaggevende betekenis is bij het vaststellen van het effect van de lozing van organische verontreinigingen op het oppervlaktewater en bij het ontwerp van afvalwaterzuiveringsinrichtingen.

De geschiedenis van de BZV-analyse kenmerkt zich door een ontwikkeling waarin een aantal van de beperkingen lijkt te worden genegeerd en vergeten en vervolgens herontdekt en overdreven onderzocht. Het onderzoek dat is beschreven in voorliggend rapport geeft een vervolg aan deze ontwikkeling. Concreet bespreekt dit rapport de optimalisatie van de BZV<sub>5</sub>-analyse door een verbetering en/of verfijning van de thans geldende norm NEN-EN 1899-1.

Op basis van literatuur, een enquête en praktijkonderzoek, is een verbeteranalyse opgesteld die voldoende aanleiding geeft om de norm NEN-EN 1899-1 aan te passen. Eén van de bevindingen is het belang van een goede communicatie tussen monsternemer, laboratorium en de uiteindelijke afnemer van de BZV<sub>5</sub>-waarde. Wanneer bijvoorbeeld afspraken worden gemaakt over de noodzakelijkheid van bepaalde prestatiekenmerken, kan hiermee bij de uitvoering van de BZV-analyse rekening worden gehouden. De gepresenteerde verbeteranalyse biedt daarbij een goed handvat.

Het onderzoek werd in eigen beheer van de STOWA uitgevoerd. Het praktijkgedeelte is uitbesteed aan de afdeling Central Research van AKZO Nobel te Arnhem (dr. ir. C.G. van Ginkel en C.A. Stroo). Hierbij is medewerking verleend door de laboratoria van Zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden, Zuiveringsschap Limburg en Waterschap Veluwe. Voor de begeleiding van het project zorgde een commissie bestaande uit drs. G. IJff (voorzitter), ing. H. Kroon, mevr. ir. N. Hegeman, ir. P.J. Roeleveld, ir. P.C. Stamperius, mevr. G.C.M. Tielens-Wester en drs. P.J.M. Tulder. Bij de uitvoering van het praktijkonderzoek en de beoordeling hiervan, heeft de werkgroep bestaande uit W. Dompeling, D. Janssen en M. Lenders een belangrijke rol gehad.

Tien laboratoria hebben voor dit project relevante gegevens verstrekt. De STOWA is hen zeer erkentelijk voor deze informatie.

Utrecht, januari 2002

De directeur van de STOWA

ir. J.M.J. Leenen



## SAMENVATTING

### *BZV als afvalwaterparameter*

Voor het meten van de organische verontreiniging van afvalwater en oppervlaktewater is het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) een veel gebruikte parameter. Het wordt gebruikt als parameter voor het dimensioneren van zuiveringsinstallaties en voor het voorspellen van het effect van het lozen van (gezuiverd) afvalwater op de kwaliteit van het oppervlaktewater. Daarmee vormt het BZV een belangrijke parameter in heffingsgrondslagen voor de behandeling van afvalwater en de lozing van (gezuiverd) afvalwater op oppervlaktewater. Doorgaans wordt gebruik gemaakt van het BZV dat wordt gemeten na een incubatietijd van 5 dagen (BZV<sub>5</sub>), en geïncubeerd bij een temperatuur van 20 °C (BZV<sub>5</sub><sup>20</sup>).

### *De BZV<sub>5</sub>-analyse*

De analyse van de parameter BZV<sub>5</sub> kent in haar huidige vorm een aantal beperkingen. Veel van deze beperkingen worden veroorzaakt door de vele factoren waaraan een BZV<sub>5</sub>-analyse onderhevig is, zoals keuze van het entmateriaal, invloed van conservering, remming van nitrificatie en de invloed van de temperatuur tijdens de incubatie. Diverse knelpunten resulteren in een relatief lage nauwkeurigheid, reproduceerbaarheid en representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse. Doel van onderhavig onderzoek was om via een knelpuntenanalyse de huidige analysemethode te optimaliseren en het analyseprotocol te verbeteren en/of aan te scherpen. Voor dit onderzoek heeft de norm NEN-EN 1899-1 "Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik na n dagen (BZV<sub>n</sub>) – Deel 1: Verdunning en enting onder toevoeging van allylthiourem" als uitgangspunt gediend.

### *Knelpunten van de BZV<sub>5</sub>-analyse*

De BZV<sub>5</sub>-analyse kent inmiddels een lange geschiedenis. Daarom is met een literatuuronderzoek beoogd een overzicht te krijgen van knelpunten die wereldwijd zijn ondervonden met het uitvoeren van de BZV<sub>5</sub>-analyse. Omdat dit project is gericht op de Nederlandse praktijk, is daarnaast een schriftelijke enquête uitgeschreven om een volledig overzicht te krijgen van de knelpunten die bij Nederlandse laboratoria spelen. Via de enquête is tevens geïnformeerd of in de praktijk op bepaalde aspecten wordt afgeweken van de geldende NEN-norm. Op basis van het literatuuronderzoek en de enquête zijn de volgende knelpunten naar voren gekomen:

- invloed van conservering;
- invloed van homogenisering;
- invloed van ATU;
- invloed van het entmateriaal;
- invloed van menging;
- invloed van temperatuur;
- invloed van eindconcentratie zuurstof;
- negatieve blanco's.

Bovengenoemde knelpunten zijn nader onderzocht via een praktijkonderzoek. Op basis van de resultaten van dit praktijkonderzoek en theoretische beschouwingen, is een verbeteranalyse voor de BZV<sub>5</sub>-meting uitgevoerd. Hierbij is ruim aandacht besteed aan de nauwkeurigheid, reproduceerbaarheid en representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse.

## *De verbeteranalyse*

De resultaten van het onderzoek naar menging waren niet eenduidig; hiervoor kan daarom geen verbeteranalyse worden geformuleerd. Ook voor de negatieve blanco's is geen sluitende verklaring gevonden, alhoewel het invetten van de dopjes een mogelijkheid is om dit knelpunt te reduceren.

Conservering. Het knelpunt conservering heeft een grote invloed op de representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse; vooral voor de matrix afvalwater. Omdat laboratoria verschillend omgaan met het conserveren van monsters, beïnvloedt het ook de onderlinge reproduceerbaarheid. In de verbeteranalyse wordt geadviseerd om met meer klem te adviseren de monsters zo snel mogelijk in te zetten (binnen 6 h na monsternamen). Indien dit toch niet mogelijk mocht zijn, dient een waarschuwend opmerking te worden geplaatst in het voorschrift dat dit de representativiteit niet ten goede zal komen. Ook de tijd om het monster na conservering op kamertemperatuur te laten komen, moet tot een minimum worden beperkt. Voor het omzeilen van de problemen rond het inzetten van analyses in het weekend is het advies de monsters in te vriezen (< -18°C). De monsters dienen dan direct na het weekend te worden ingezet voor analyse. Om terugmeting in het weekend te voorkomen kan de BZV<sub>2+5</sub>-methode worden gebruikt die staat beschreven in NEN 1899-1.

Homogenisering. Het homogeniseren van een monster met een Ultra Turrax wordt afgeraden. Het gebruik van een Ultra Turrax voor een korte periode resulteert al in een significante afname van het BZV<sub>5</sub>-gehalte. Ook voor monsters met een hoog gehalte aan gesuspendeerde stof en voor monsters die uit de vriezer komen wordt het gebruik van een Ultra Turrax niet geadviseerd. De reproduceerbaarheid van de meting zal dan moeten worden getoetst via een meervoudige bepaling (minimaal in drievoud).

ATU-dosering. Het verhogen van de ATU-dosering van 2 naar 5 mg/l biedt meer zekerheid om nitrificatie tijdens de BZV<sub>5</sub>-meting te voorkomen. Deze verhoging heeft geen verdere consequenties voor de resultaten van de BZV<sub>5</sub>-meting.

Entmateriaal. De norm NEN-EN 1899-1 biedt te veel vrijheid in de keuze van het entmateriaal. Stedelijk afvalwater dient in ieder geval niet als entmateriaal te worden gebruikt. Voor afvalwater wordt geadviseerd alleen effluent van een rwzi als entmateriaal toe te passen. Indien niet gedesinfecteerd, voorzien de matrices effluent en oppervlaktewater zelf al in het benodigde entmateriaal.

Eindconcentratie zuurstof. Voor de goedkeuring van de BZV-meting biedt de norm NEN-EN 1899-1 onterecht te weinig flexibiliteit voor de eindconcentratie zuurstof. In de verbeteranalyse wordt voorgesteld de meting nog goed te keuren bij een eindconcentratie van minimaal 1 mg O<sub>2</sub>/l. Dit levert goede resultaten op en minder afkeuringen voor de praktische uitvoering van de BZV<sub>5</sub>-analyse.

Temperatuur. De norm NEN-EN 1899-1 schrijft terecht een toelaatbare variatie voor van ± 1°C tijdens de incubatie. Uit de resultaten van de enquête wordt opgemaakt dat deze richtlijn in de praktijk met meer striktheid moet worden nageleefd. Het voorkomen van temperatuurverschillen in de BZV-flessen op verschillende posities in de incubator kan de binnenlaboratorium-reproduceerbaarheid negatief beïnvloeden. Ook kan het openen van de incubator resulteren in een significante daling of stijging van de temperatuur. Laboratoria zouden het optreden van deze effecten moeten nagaan voor hun eigen situatie om meer inzicht te krijgen in de binnenlaboratorium-reproduceerbaarheid.



### ***Betekenis voor de prestatiekenmerken***

De gepresenteerde verbeteranalyse zal hoogstwaarschijnlijk resulteren in een verbetering van de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid en de representativiteit. De binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid zal nauwelijks worden beïnvloed; het niet gebruiken van een Ultra Turrax kan zelfs leiden tot een lagere reproduceerbaarheid. Bij het streven naar de kwaliteit van bepaalde prestatiekenmerken is een goede communicatie tussen de monsternemer, het laboratorium en de afnemer van de BZV<sub>5</sub>-waarde van groot belang. Wanneer afspraken worden gemaakt over de noodzakelijkheid van de representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse, kan hiermee rekening worden gehouden. De gepresenteerde verbeteranalyse biedt daarbij een goed handvat.

Voordat de verbeteranalyse kan leiden tot een aanpassing van het analysevoorschrift NEN-EN 1899-1, dient deze te worden getoetst in de praktijk. Daarom wordt aanbevolen om onder de laboratoria van de waterkwaliteitsbeheerders een ringtest te houden waarin de elementen van de verbeteranalyse worden meegenomen. Voor de uitvoering van deze ringtest wordt geadviseerd om ook een afvalwatermonster van een rwzi in het onderzoek te betrekken. Vanwege de relatief hoge mate van afbreekbaarheid en het relatief hoge gehalte aan gesuspendeerde stoffen, kunnen spreidingen die worden veroorzaakt door het niet homogeen zijn van het monster beter worden verklaard.

### ***Voorstellen voor aanscherping van NEN 1899-1***

Op basis van het onderzoek worden de volgende voorstellen gedaan om NEN 1899-1 aan te scherpen ter optimalisatie van de BZV<sub>5</sub>-analyse:

- na monstername dient de BZV<sub>5</sub>-analyse zo snel mogelijk te worden ingezet. Indien conservering vereist is, dient dit te geschieden door invriezing (< -18 °C);
- monsters mogen niet worden gehomogeniseerd met behulp van een Ultra Turrax;
- de toelaatbare ATU-dosering dient te worden verhoogd naar 5 mg/l;
- voor de matrix afvalwater dient de keuze van het entmateriaal te worden beperkt tot effluent van een rwzi. Indien niet gedesinfecteerd, voorzien de matrices effluent en oppervlaktewater zelf al in het benodigde entmateriaal;
- de toelaatbare minimale eindconcentratie zuurstof dient te worden verlaagd naar 1 mg O<sub>2</sub>/l.



# 1 INLEIDING

## 1.1 Algemeen

Voor het meten van de organische verontreiniging van afvalwater en oppervlaktewater is het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) een veel gebruikte parameter. Het biochemisch zuurstofverbruik is de hoeveelheid zuurstof die nodig is om door middel van micro-organismen de biochemisch oxideerbare bestanddelen in één liter water te mineraliseren. Het BZV wordt gebruikt als parameter voor het dimensioneren van zuiveringsinstallaties en voor het voorspellen van het effect van het lozen van (gezuiverd) afvalwater op de kwaliteit van het oppervlaktewater. Daarmee vormt het BZV een belangrijke parameter in heffingsgrondslagen voor de behandeling van afvalwater en de lozing van (gezuiverd) afvalwater op oppervlaktewater. Doorgaans wordt gebruik gemaakt van het BZV dat wordt gemeten na een incubatietijd van 5 dagen (BZV<sub>5</sub>), en geïncubeerd bij een temperatuur van 20 °C (BZV<sub>5</sub><sup>20</sup>).

## 1.2 Probleemstelling

De analyse van de parameter BZV<sub>5</sub> kent in haar huidige vorm een aantal beperkingen. Veel van deze beperkingen worden veroorzaakt door de vele microbiologische factoren waaraan een BZV<sub>5</sub>-analyse onderhevig is, zoals keuze van het entmateriaal, invloed van conservering, remming van nitrificatie en de invloed van de temperatuur tijdens de incubatie. Andere knelpunten die in de Nederlandse praktijk worden waargenomen zijn het optreden van negatieve blanco's en het bepalen van prestatiekenmerken. De diverse knelpunten resulteren in een relatief lage nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van de BZV<sub>5</sub>-analyse.

## 1.3 Doelstelling

Via onderhavig onderzoek is getracht om via een knelpuntenanalyse de huidige methode te optimaliseren en het analyseprotocol te verbeteren en/of aan te scherpen. Voor dit onderzoek heeft de norm NEN-EN 1899-1 "Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik na n dagen (BZV<sub>n</sub>) – Deel 1: Verdunning en enting onder toevoeging van allylthioureum" als uitgangspunt gediend.

## 1.4 Leeswijzer

Deze leeswijzer maakt onderdeel uit van hoofdstuk 1 waarin de achtergrond en doelstelling van het project zijn weergegeven. Hoofdstuk 2 beschrijft de aanpak van het project met de verschillende onderzoeksfases. Voordat wordt overgegaan tot een bespreking van de onderzoeksfases, wordt in hoofdstuk 3 achtergrondinformatie bij de BZV<sub>5</sub>-analyse gegeven. Achtereenvolgens wordt in hoofdstuk 4 de literatuurstudie uiteengezet en worden in hoofdstuk 5 de enquêteresultaten besproken. Hoofdstuk 6 beslaat de knelpuntenanalyse op basis van de literatuurstudie en de enquêteresultaten. Het praktijkonderzoek aan de geïncubeerde knelpunten wordt besproken in hoofdstuk 7, waarna in hoofdstuk 8 de verbeteranalyse plaatsvindt. Hoofdstuk 9 presenteert de conclusies en aanbevelingen die op basis van het onderzoek konden worden geformuleerd. Het rapport is voorzien van een uitgebreide literatuurlijst in hoofdstuk 10.

## 2 PROJECTOPZET

Voor het optimaliseren van het analysevoorschrift NEN-EN 1899-1 voor de bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik na  $n$  dagen ( $BZV_n$ ) is gekozen voor een projectopzet waarin de volgende fasen zijn doorlopen:

- literatuuronderzoek;
- enquête;
- praktijkonderzoek;
- verbeteranalyse van de  $BZV_5$ -analyse;
- rapportage.

In de volgende paragrafen wordt per onderzoeksfase de uitvoering nader besproken en wordt aangegeven hoe de interactie is geweest tussen de verschillende fasen.

### 2.1 Literatuuronderzoek

De  $BZV_5$ -analyse kent een geschiedenis van meer dan 100 jaar en het  $BZV_5$  wordt wereldwijd gebruikt als parameter voor afbreekbaar organisch materiaal in waterstromen. In de literatuur zijn veel publicaties verschenen die de ontwikkeling van de  $BZV_5$ -analyse in de twintigste eeuw weergeven. Onderzoeksresultaten die in de vele literatuurreferenties staan beschreven hebben vaak vorm gegeven aan de (langzaam) voortschrijdende ontwikkeling van de  $BZV_5$ -analyse. In het literatuuronderzoek is een zoekopdracht uitgevoerd die gericht is geweest op literatuurreferenties na 1960. Amerikaanse en Europese analysevoorschriften hebben een voorname rol gespeeld in het literatuuronderzoek. Met het literatuuronderzoek is beoogd een compleet beeld te krijgen van knelpunten die wereldwijd zijn ondervonden met het uitvoeren van de  $BZV_5$ -analyse.

### 2.2 Enquête

Omdat dit project is gericht op de laboratoria van de Nederlandse waterkwaliteitsbeheerders, is een schriftelijke enquête uitgeschreven om een volledig overzicht te krijgen van de diverse knelpunten die bij Nederlandse laboratoria spelen. De geënquêteerde laboratoria is bovendien gevraagd om ideeën en/of oplossingen in te brengen om meer gerichte onderzoekspunten te verkrijgen. De enquête is parallel met het literatuuronderzoek uitgevoerd zodat een knelpuntenanalyse heeft plaatsgevonden op basis van een evaluatie van beide fasen.

### 2.3 Praktijkonderzoek

Aan de hand van de resultaten van het literatuuronderzoek en de enquête is een beeld gevormd van de knelpunten en onderzoekspunten. Deze knelpunten en onderzoekspunten zijn nader onderzocht via praktijkonderzoek. Het praktijkonderzoek was zo ingericht dat een verbeteranalyse voor de  $BZV_5$ -meting kon worden uitgevoerd.

### 2.4 Verbeteranalyse

Mede gesteund door een theoretische beschouwing en/of raadpleging van de literatuur, is voor de geïnterpreteerde knelpunten een verbeteranalyse opgesteld. De verbeteranalyse moet als leidraad dienen voor een mogelijke aanpassing van NEN-EN 1899-1.

### 3 ACHTERGRONDINFORMATIE BIJ DE BZV<sub>5</sub>-ANALYSE

#### 3.1 Principe van de BZV-analyse

De bepaling van het BZV is een zogenaamd "bio-essay": een meetmethode waarbij van biologische omzettingen gebruik wordt gemaakt. In de praktijk wordt bij de BZV-analyse een monster afvalwater gemengd met een hoeveelheid verdunningswater met een hoog gehalte zuurstof en geënt met aërobe micro-organismen. Ten behoeve van de groei van micro-organismen moeten voldoende nutriënten aanwezig zijn in het verdunningswater.

De BZV-analyse moet in het donker gebeuren, zodat niet tegelijkertijd zuurstofproductie door algen kan optreden. Na een incubatie van  $n$  dagen (meestal 5 of 7) op een donkere plaats bij 20 °C, wordt bepaald hoeveel zuurstof is verbruikt. Hiervoor zijn twee zuurstofmetingen noodzakelijk, één voor de incubatie en één na de incubatie. Bij de bepaling moet er voor worden gezorgd dat vanaf het begin voldoende zuurstof aanwezig is in het water, minimaal 8 tot 9 mg/l bij 20 °C. Als het zuurstofgehalte in het water gedurende de bepaling uitgeput is, is deze bepaling niet bruikbaar. Daarom worden verschillende verdunningen met zuurstofrijk water ingezet. Als blancobepaling wordt van het verdunningswater het zuurstofverbruik gemeten over dezelfde periode als het monster.

Omdat het BZV wordt gebruikt als parameter voor de hoeveelheid afbreekbaar organisch materiaal, mag voor een juiste interpretatie van de resultaten geen nitrificatie optreden tijdens de incubatie. Om de nitrificatie te remmen wordt een bepaalde hoeveelheid ATU gedoseerd. De benodigde hoeveelheid is afhankelijk van de nitrificatiecapaciteit van het watermonster, of van het entmateriaal, en van de lengte van de incubatieperiode.

#### 3.2 Geschiedenis van de BZV-analyse

Door LeBlanc [15] wordt een kort overzicht gegeven van de geschiedenis van de BZV<sub>5</sub>-analyse zoals we die hedendaags gebruiken. Het moderne concept van biochemische oxidatie verscheen in 1884, toen werd aangetoond dat de afname in opgelost zuurstof van geïncubeerde monsters werd veroorzaakt door de metabole activiteit van aanwezige micro-organismen. In 1898 liet de "British Royal Commission on Sewage Disposal" zien dat er een significante relatie bestond tussen het zuurstofgehalte in oppervlaktewater en de mate van verontreiniging in deze wateren. In het achtste rapport van de "Royal Commission" werd voorgesteld om de hoeveelheid zuurstof benodigd voor de biochemische oxidatie van organisch materiaal, gedurende vijf dagen en bij een temperatuur van 18,3 °C, te nemen als parameter voor de kwaliteit van het water [15]. De temperatuur van 18,3 °C werd gekozen omdat deze maximaal werd verwacht in de binnenwateren van Groot-Brittannië gedurende de zomer. Een incubatie van vijf dagen werd genomen omdat hierbij een groter percentage van het afbreekbaar materiaal geoxideerd kon worden en nitrificatie gedurende deze periode waarschijnlijk niet zou optreden. Een andere belangrijke beweegreden om te kiezen voor vijf dagen was het feit dat dit de maximale tijd is die een Britse rivier nodig heeft om uit te monden in de zee of oceaan. Er werd gesteld dat een periode langer dan vijf dagen niet significant zou zijn omdat het oppervlaktewater na vijf dagen wordt verdund met zuurstofverzadigd zeewater. De BZV-analyse uit Groot-Brittannië werd in 1936 overgenomen door de "American Public Health Association Standard Methods Committee" met een arbitraire wijziging van de incubatietemperatuur van 18,3 naar 20 °C.

Duidelijk is dat tot heden ten dage het BZV<sub>5</sub><sup>20</sup> wereldwijd een standaard is gebleven voor de mate van afbreekbaar organisch materiaal in watermonsters. In het begin werd het BZV<sub>5</sub> vooral gebruikt voor het vaststellen van het effect van de lozing van organische verontreinigingen op het oppervlaktewater. Later is het BZV<sub>5</sub> ook gebruikt als ontwerp- en controleparameter voor zuiveringssystemen en als factor voor het bepalen van de kosten van de zuivering van afvalwater.

De analysevoorschriften voor de BZV<sub>5</sub>-analyse zijn in de twintigste eeuw continu onderhevig geweest aan verandering, verbetering en verfijning. In Amerika en Europa werd met een gemiddelde van circa één keer per decennium een aangepast analysevoorschrift gepresenteerd.

In de literatuur wordt veelvuldig aandacht besteed aan het optimaliseren van de BZV<sub>5</sub>-analyse. Titels als "Let's upgrade the BOD test (1974) [2]" en "Refinements to the BOD test (1989) [31]" zijn hiervan sprekende voorbeelden. Daarnaast wordt de BZV<sub>5</sub>-analyse in de literatuur regelmatig onderworpen aan scherpe kritiek aangaande de uitvoering en toepassing van het BZV<sub>5</sub> als afvalparameter. Literatuurreferenties die een kritische noot plaatsen zijn onder andere "BOD<sub>5</sub>: are there alternatives available? (1979) [26]" en "Kritik am BSB<sub>5</sub> als Verschmutzungsparameter (1977) [34]".

Sherard et al. [26] stellen dat de BZV<sub>5</sub>-analyse tegemoetkomt aan een aantal criteria waarom het BZV<sub>5</sub> als geschikte controleparameter kan worden gebruikt en dat dit vooral gerelateerd is aan de betrekkelijk eenvoudige opzet en de lage kosten. Het is echter ook onderhevig aan serieuze beperkingen en hoewel deze bekend zouden moeten zijn, is een periodieke evaluatie soms nodig. Een aantal van de beperkingen lijkt te worden genegeerd en vergeten en vervolgens herontdekt en overdreven onderzocht.

### 3.3 Kritiek op de BZV-analyse

Het principe van een BZV-analyse lijkt betrekkelijk eenvoudig maar de praktijk bewijst het tegendeel. Dit wordt grotendeels bepaald door het feit dat de analyse gebruik maakt van een microbiologisch principe, waarop vele factoren van invloed zijn. Factoren die de resultaten en de nauwkeurigheid van de BZV-analyse kunnen beïnvloeden zijn bijvoorbeeld:

- het type watermonster en de afbreekbaarheid van het organisch materiaal;
- het type en de hoeveelheid entmateriaal;
- het optreden of de remming van nitrificatie;
- de remming door toxische stoffen;
- het zuurstofgehalte;
- de temperatuur;
- het homogeniseren tijdens de incubatie.

Met betrekking tot de nauwkeurigheid van de BZV-analyse stellen Sherard et al. [26] dat de nauwkeurigheid van "bio-essay"-methoden lager is dan van chemische bepalingen. Waarschijnlijk de meest gebruikte en meest gestandaardiseerde "bio-essay"-methode is de bepaling van de sterkte van antibiotica. Bij deze methode wordt geen nauwkeurigheid kleiner dan  $\pm 5\%$  verwacht. Onafhankelijk van een adequate uitvoering moet ook voor de BZV-analyse geen hogere nauwkeurigheid worden verwacht; in de praktijk is de nauwkeurigheid significant slechter en worden waarden van 10 tot 20% vastgesteld.

Sherard et al. [26] stellen in hun artikel dat het begrip van een analist voor de principes en de procedure van de BZV-analyse een primaire voorwaarde is voor een adequate bepaling. Regelmatig is een analyse uitgevoerd zonder voldoende aandacht voor details, waarbij de slechte resultaten dan niet per definitie inherent aan de BZV-analyse zelf zijn. De Nederlandse NEN-norm stelt ook dat het buitengewoon belangrijk is dat de analyses worden uitgevoerd door daartoe gekwalificeerd personeel.

Arthur [2] geeft als nadeel dat het moeilijk is om de nauwkeurigheid van de BZV-analyse vast te stellen en dat hiervoor in feite alleen een standaard substraat en (bij voorkeur) een standaard entmateriaal geschikt zijn. Verder zijn de kleine benodigde hoeveelheid monster en de noodzakelijke verdunning direct verantwoordelijk voor de geringe nauwkeurigheid van de test. Het is praktisch onmogelijk om exact dezelfde karakteristieken te verkrijgen in twee kleine monsters afvalwater [2].

### 3.4 De kinetiek van de BZV-analyse

De BZV-analyse is een indirecte bepaling van de hoeveelheid organisch materiaal in watermonsters. In feite wordt alleen de verandering in de concentratie van opgelost zuurstof gemeten. Deze verandering is een gevolg van de afbraakreacties die door de micro-organismen worden uitgevoerd. Een deel van het biologisch afbreekbaar organisch substraat wordt geoxideerd voor de energievoorziening van de micro-organismen ten behoeve van celgroei en celreproductie; een ander deel wordt ingebouwd in nieuw celmateriaal. Bij afsterving en afbraak van micro-organismen zal het deel van het substraat dat zit opgeslagen in biomassa, via de endogene ademhaling tot uiting komen in het zuurstofverbruik bij de BZV-bepaling (mede door de activiteit van protozoa). Naast de totale hoeveelheid zuurstof die voor de afbraak noodzakelijk is, is ook het tempo waarin deze afbraak plaatsvindt van belang. De snelheid waarmee zuurstof door de micro-organismen wordt gebruikt, weerspiegelt in grote mate de snelheid waarmee de micro-organismen zelf groeien.

De afbraak van substraat en tegelijkertijd de groei van de micro-organismen komt op gang na een zekere periode van adaptatie. De lengte van deze periode kan uiteenlopen van enkele uren tot zelfs enkele dagen. Dit is één van de bronnen voor onnauwkeurigheid bij de BZV-bepaling en hangt nauw samen met de keuze van het entmateriaal voor het te analyseren watermonster.

Hoewel gebleken is dat voor de bepaling van de reactiesnelheid in biochemische processen niet altijd een reactiekinetiek van de eerste orde kan worden gebruikt, is hier voor de kinetiekbeschrijving van de BZV-bepaling wel van uitgegaan. Voor de snelheid waarmee zuurstof door de micro-organismen gebruikt wordt, kan geformuleerd worden dat deze evenredig is met de hoeveelheid nog in het water aanwezig organisch materiaal. De verandering van de BZV met de tijd kan worden uitgedrukt volgens:

$$\frac{dBZV_{R,t}}{dt} = -k_{BZV} BZV_{R,t} \quad \{1\}$$

waarin:  $BZV_{R,t}$  = resterende hoeveelheid BZV op  $t = t$  (mg  $O_2/l$ );  
 $k_{BZV}$  = afbraakconstante ( $d^{-1}$ ).

Integratie van bovenstaande vergelijking levert:

$$BZV_{R,t} = BZV_{t=0} \cdot e^{-k_{BZV}t} \quad \{2\}$$

waarin:  $BZV_{t=0}$  = initieel BZV op  $t = 0$  (mg O<sub>2</sub>/l).

Het initieel BZV is het maximale zuurstofverbruik dat kan worden verwacht van een watermonster. Deze hoeveelheid komt overeen met het zuurstofverbruik op de lange termijn en kan worden aangegeven met de term  $BZV_{tot}$ ; een maat voor de hoeveelheid organisch materiaal die tijdens een langdurige test maximaal kan worden afgebroken. Het tijdens een BZV-meting geproduceerde inerte materiaal komt niet tot uiting in het  $BZV_{tot}$ . Hierdoor zal het gemeten  $BZV_{tot}$  lager zijn dan het CZV van het afbreekbare materiaal in het influent. Het gemeten zuurstofverbruik in het watermonster is per definitie gelijk aan het verschil tussen de maximale hoeveelheid organisch materiaal en de overgebleven hoeveelheid. Voor het gemeten BZV op ieder tijdstip geldt:

$$BZV_{G,t} = BZV_{tot} - BZV_{R,t} \quad \{3\}$$

waarin:  $BZV_{G,t}$  = gemeten BZV (mg O<sub>2</sub>/l).

Na invullen van vergelijking 3 volgt:

$$BZV_{G,t} = BZV_{tot} (1 - e^{-k_{BZV}t}) \quad \{4\}$$

Met behulp van bovenstaande vergelijking kan het verloop van het BZV als functie van de tijd worden weergegeven. De waarde van de snelheidsconstante  $k_{BZV}$  is van veel soorten watermonsters experimenteel bepaald. Enige in de literatuur gegeven waarden zijn opgenomen in tabel 1.

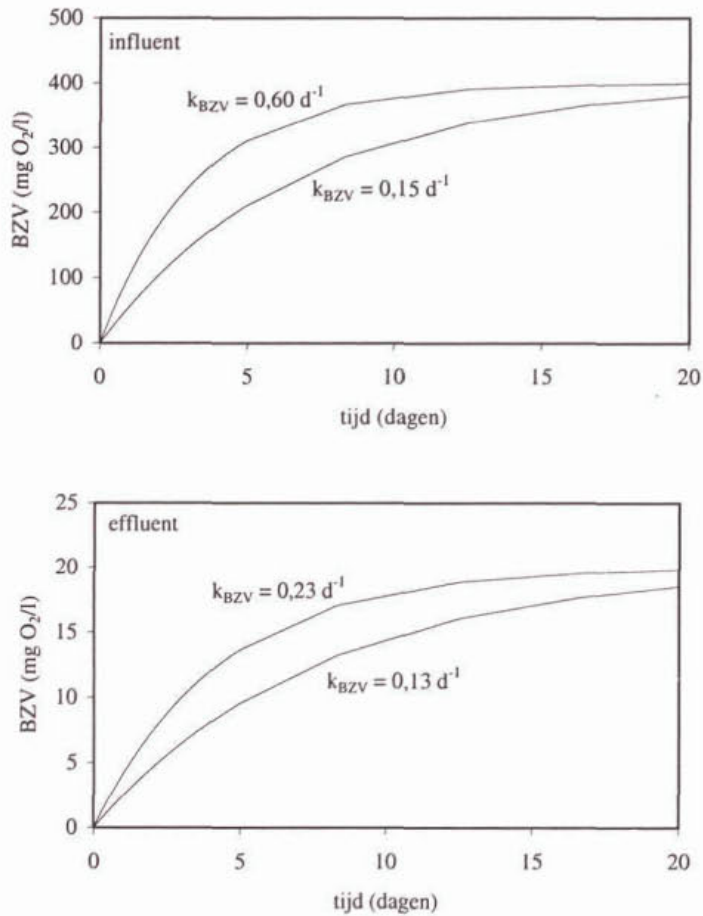
**Tabel 1:** Waarden van  $k_{BZV}$  voor verschillende matrices.

Type watermonster	$k_{BZV}$ (d <sup>-1</sup> )
Onbehandeld afvalwater	0,15 – 0,60 [24]
Effluent zuiveringsinstallatie	0,13 – 0,23 [16]
Rivieren met geringe vervuiling	0,01 – 0,18 [16]

In de literatuur [16] wordt algemeen gesteld dat afhankelijk van het type afvalwater na vijf dagen circa 60 tot 70% van de maximale BZV is bereikt en na 20 dagen circa 95 tot 99%.

In figuur 1 zijn voor afvalwater (influent) en effluent BZV-curves gepresenteerd bij verschillende waarden voor de afbraakconstante  $k_{BZV}$ . Een hoge waarde van  $k_{BZV}$  geeft aan dat het afvalwater in verhouding een hoog gehalte heeft aan snel afbreekbare organische stof (meestal opgelost) ten opzichte van langzaam afbreekbare organische stof (meestal onopgelost). Wanneer afvalwater een voorbehandelingsstap ondergaat zal dit van invloed zijn op de waarde van  $k_{BZV}$ . Toepassing van voorbezinking resulteert bijvoorbeeld in een verhoging van  $k_{BZV}$  omdat gesuspendeerd materiaal wordt verwijderd. Onafhankelijk van de waarde van het  $BZV_{tot}$  kan worden vastgesteld dat bij een variatie van  $k_{BZV}$ , na vijf dagen 50% ( $k_{BZV} = 0,15$ ) tot 95% ( $k_{BZV} = 0,60$ ) van het afbreekbaar materiaal zal zijn geoxideerd; dit kan dus significant afwijken van de algemeen genoemde waarden van 60 tot 70% [16].





**Figuur 1:** BZV-curves voor influent en effluent bij verschillende waarden voor de  $k_{BZV}$ .

Voor de interpretatie van de BZV<sub>5</sub>-metingen moet worden gerealiseerd dat de aanwezigheid van sulfide en gereduceerde ijzerverbindingen kunnen resulteren in een verhoging van het BZV<sub>5</sub>-gehalte. Sulfide kan in hogere concentraties aanwezig zijn indien het afvalwater wordt aangevoerd met een lang persleidingstelsel. In de afloop van de voorbezinktank kunnen gereduceerde ijzerverbindingen voorkomen indien pre-precipitaat wordt toegepast. Door afvalwatermonsters te bepalen op sulfides en gereduceerde ijzerverbindingen, kan een correctie op het BZV-gehalte worden uitgevoerd.



## 4 LITERATUURONDERZOEK

### 4.1 Algemeen

Bij het literatuuronderzoek zijn diverse bronnen geraadpleegd. Naast een zoekopdracht op Internet is een zoekopdracht geplaatst bij de Hydrotheek van de STOWA waarbij gebruik is gemaakt van Aqualine, een uitgebreid literatuurbestand met referenties vanaf 1960. De beoordeling van een aantal analysevoorschriften heeft een belangrijk aandeel gehad in het literatuuronderzoek.

**Tabel 2:** Samenvatting van geraadpleegde voorschriften voor de BZV<sub>5</sub>-analyse.

Analysevoorschrift	NEN-EN 1899-1 [18]	DIN 38 409 T.51 [8]	Standard Methods [27]
<b>Monstername, transport en conservering</b>			
Temperatuur monstername	4 °C	4 °C	4 °C
Temperatuur bij transport	4 °C	4 °C	4 °C
Conserveringstemperatuur	0 - 4 °C	2 - 5 °C	< 4 °C
Analyse na monstername	< 24 h	< 3 d	< 24 h
<b>Voorbehandeling monsters</b>			
Neutralisatie (pH)	6,0 - 8,0	6,0 - 9,0	6,5 - 7,5
Homogeniseren	- bij voorkeur niet; - bij grote deeltjes in monster; - bij ingevroren monsters.	- bij ingevroren monsters.	- geen opmerkingen.
Temperatuur	20 ± 2 °C	-	20 ± 1 °C
<b>Entmateriaal</b>			
Type entmateriaal	- monster vormt zijn eigen ent; - stedelijk afvalwater zonder industriële verontreiniging, CZV<300; TOC<100 mg/l na decanteren of filtratie; - oppervlaktewater dat stedelijk afvalwater bevat; - bezonken effluent uit rwzi; - water dat micro-organismen bevat die geadapteerd zijn aan het te analyseren monster; - commercieel entmateriaal.	- stedelijk afvalwater zonder industriële verontreiniging; - water dat micro-organismen bevat die geadapteerd zijn aan het te analyseren monster.	- monster vormt zijn eigen ent; - effluent uit rwzi; - bezonken stedelijk afvalwater; - water dat micro-organismen bevat die geadapteerd zijn aan het te analyseren monster.
<b>Verduunningswater</b>			
Beluchtingstijd	min. 1 uur	3 dagen	niet vermeld
Zuurstofconcentratie	min. 8 mg/l	circa 9 mg/l	circa 9 mg/l
Temperatuur	20 ± 2 °C	20 ± 1 °C	20 °C
Entmateriaal	5 - 20 ml/l	-	-
BZV	< 1,5 mg/l	< 1,5 mg/l	< 1,0 mg/l
Bewaartermijn	max. 24 uur	10 dagen	max. 24 uur
<b>Remming van nitrificatie</b>			
ATU-oplossing	2 mg/l	2 - 5 mg/l	-
TCMP-oplossing	-	optioneel	10 mg/l
<b>Incubatie</b>			
Mate van licht	donker	donker	donker
Variatie in temperatuur	20 ± 1 °C	20 ± 1 °C	20 ± 1 °C
Menging	niet vermeld	bij voorkeur	niet vermeld
<b>Zuurstofmeting</b>			
O <sub>2</sub> -bereik (na incubatie)	½O <sub>2,begin</sub> < O <sub>2,eind</sub> < ¾O <sub>2,begin</sub>	> 0,5 mg/l	1 - 7 mg/l

Het analysevoorschrift volgens de Nederlandse norm NEN-EN 1899-1 [18] diende als uitgangspunt voor de optimalisatie van de BZV<sub>5</sub>-analyse in deze studie. In deze NEN-norm wordt ook een alternatieve incubatietijd aangereikt via het BZV<sub>2+5</sub> om de praktische problemen met terugbepaling in het weekend te voorkomen (§ 4.2).

Ten behoeve van een vergelijking zijn de Duitse (DIN [8]) en Amerikaanse (Standard Methods [27]) analysevoorschriften geraadpleegd. In tabel 2 zijn de verschillen tussen de drie analysevoorschriften samengevat. Een toelichting op de diverse aspecten wordt in de paragrafen 4.2 tot en met 4.9 gegeven, aangevuld met relevante informatie uit de literatuur.

## 4.2 Monstername, transport en conservering

In de drie analysevoorschriften wordt geadviseerd om de temperatuur tijdens monstername, transport en conservering te handhaven op een waarde van 4 °C. In de NEN-norm en Standard Methods wordt gesteld dat na monstername het watermonster binnen 24 uur moet zijn ingezet. De DIN-norm houdt een ruimere marge aan van 3 dagen, waarschijnlijk rekening houdend met de praktische problemen in het weekend. In al de voorschriften wordt overigens aangegeven dat de tijd tussen monstername en analyse tot een praktisch minimum moet worden beperkt, waarbij Standard Methods specifiek waarschuwt dat tijdens deze periode een significante afname kan optreden in het BZV. Verder is in de voorschriften opgenomen dat de monsterflessen luchtdicht moeten worden afgesloten.

Tyers en Shaw [31] hebben in een onderzoek ten behoeve van het verfijnen van de BZV<sub>5</sub>-analyse, aandacht besteed aan het effect van conservering op de stabiliteit van het monster. Door de auteurs wordt gerefereerd aan een onderzoek van de North West Water Authority die vaststelde dat bij het bewaren van monsters een significante afname in het BZV<sub>5</sub> kan optreden. In effluentmonsters, bewaard voor een periode van 48 uur bij kamertemperatuur, werd een afname waargenomen van 34%, terwijl bij conservering tussen 2-4 °C nog altijd een afname van 18% in het BZV werd vastgesteld. Tyers en Shaw [31] herhaalden dit onderzoek voor een grotere verscheidenheid aan watermonsters; bij conservering van onverdunde monsters tussen 2-4 °C werd een zeer significante afname in het BZV<sub>5</sub> waargenomen van 16 tot 48%. Wanneer dezelfde monsters voor conservering werden voorverdund (verdunningsfactor is niet vermeld) bleek de afname na 48 uur bij 2-4 °C slechts 5% te bedragen.

Van de door Tyers en Shaw geadviseerde voorverdunningsmethode wordt gebruik gemaakt in de norm NEN-EN 1899-1 bij de bepaling van het BZV<sub>2+5</sub>. Deze methode voorkomt problemen met terugbepaling in het weekend. De procedure is dezelfde als bij de BZV<sub>5</sub>-bepaling maar de eerste 2 dagen wordt de BZV-fles, waarin de benodigde verdunning reeds heeft plaatsgevonden, eerst geïncubeerd bij 4 °C en vervolgens voor 5 dagen geïncubeerd bij 20 °C. Voor meerdere matrices is in een uitgebreide interlaboratoriumproef [18] vastgesteld dat er geen significante verschillen optreden tussen het BZV<sub>5</sub> en BZV<sub>2+5</sub>.

### 4.3 Voorbehandeling van de monsters

Bij de neutralisatie van monsters zijn de pH-bereiken in de geraadpleegde analysevoorschriften nagenoeg identiek; de Nederlandse norm gaat uit van een pH van 6,0 tot 8,0. Aanwezigheid van vrij en/of gebonden chloor wordt verwijderd door een zekere hoeveelheid natriumsulfietoplossing toe te voegen. Wanneer het monster voor een bepaalde tijd is geconserveerd bij 4 °C geven de NEN-norm en Standard Methods aan dat het monster voor verdere verwerking eerst op 20 °C moet worden gebracht, waarbij de NEN-norm een marge aanhoudt van  $\pm 2$  °C en Standard Methods van  $\pm 1$  °C.

Homogenisering door deeltjes te verkleinen, bijvoorbeeld met een Ultra Turrax of laboratorium-blender, wordt in de NEN-norm voor routinegebruik niet aangeraden. Indien een monster grote deeltjes bevat en een hoge verdunningsfactor vereist, kan homogenisering overwogen worden. Volgens de NEN- en DIN-norm moeten ingevroren monsters na te zijn ontdooid altijd worden gehomogeniseerd. Het effect op de resultaten van een BZV<sub>5</sub>-meting door deeltjes te verkleinen wordt in de literatuur niet beschreven; desondanks kan worden aangenomen dat een dergelijke voorbehandeling effect zal hebben op de  $k_{\text{BZV}}$ -waarde en daarmee ook op de BZV<sub>5</sub>-meting.

### 4.4 Verdunningswater

Om een hoog zuurstofgehalte in het verdunningswater te bereiken wordt in de NEN-norm uitgegaan van een minimale beluchtingstijd van één uur. De gewenste zuurstofconcentratie bedraagt minstens 8 mg/l. Omdat het water niet oververzadigd mag zijn met zuurstof moet de oplossing voor gebruik één uur staan in een niet afgesloten houder. In de DIN-norm wordt uitgegaan van een beluchtingstijd van drie dagen ten behoeve van een ontwikkeling van de biomassa en het bereiken van een BZV van het verdunningswater van 0,5 tot 1,5 mg/l. In de DIN-norm en Standard Methods bedraagt de zuurstofconcentratie circa 9 mg/l en wordt ook de opmerking geplaatst dat het verdunningswater niet verzadigd mag zijn met zuurstof. Volgens de drie voorschriften moet het verdunningswater op een temperatuur zijn gebracht van 20 °C, met een onderlinge variatie in de temperatuur van  $\pm 1$  tot  $\pm 2$  °C

De NEN-norm adviseert een bepaalde hoeveelheid entmateriaal van 5 tot 20 ml per liter verdunningswater met de randvoorwaarde dat het BZV van het verdunningswater niet hoger mag zijn dan 1,5 mg/l. De DIN-norm en Standard Methods beperken zich tot het stellen van een maximaal toelaatbaar BZV van respectievelijk 1,5 en 1,0 mg/l voor het te doseren entmateriaal.

Voor het bewaren van het verdunningswater stellen de NEN-norm en Standard Methods een maximale termijn van 24 uur. Als het verdunningswater langer wordt bewaard schrijft Standard Methods voor om een nitrificatieremmer toe te voegen zodat de ontwikkeling van nitrificeerders wordt voorkomen en de ammoniumconcentratie in het verdunningswater gelijk blijft. De NEN-norm biedt de vrijheid om het water gedurende langere tijd te bewaren als uit ervaring en/of controlewaarden blijkt dat het water langer bruikbaar is. De Duitse norm staat een bewaartermijn toe van tien dagen.

## 4.5 Invloed van entmateriaal

De geraadpleegde analysevoorschriften (tabel 2) hebben naast een aantal overeenkomsten ook opmerkelijke verschillen met betrekking tot het type entmateriaal dat kan worden ingezet voor het uitvoeren van een BZV-analyse. Voor de BZV-analyse is het noodzakelijk dat een populatie micro-organismen aanwezig is die de biodegradeerbare organische componenten in het watermonster kan oxideren.

De NEN-EN 1899-1 en Standard Methods gaan ervan uit dat indien een watermonster van nature voldoende aangepaste micro-organismen bevat, in principe geen entwater hoeft te worden gebruikt. Volgens Standard Methods geldt dit voor stedelijk afvalwater, niet gedesinfecteerd effluent van biologische zuiveringsinstallaties en oppervlaktewater dat afvalwater of effluent ontvangt. Als het monster geen geschikte microbiële populatie bevat, zoals bijvoorbeeld gedesinfecteerd effluent en onbehandeld industrieel afvalwater, dient het verdunningswater te worden geënt met entmateriaal. In Standard Methods wordt de voorkeur gegeven aan effluent (niet gedesinfecteerd) van de biologische zuivering die het afvalwater behandelt. Wanneer dit niet beschikbaar is kan stedelijk afvalwater na bezinking (max. 1 uur) als entmateriaal dienen. In de NEN-norm wordt geen voorkeur gegeven aan het gebruik van effluent of stedelijk afvalwater en kan bovendien oppervlaktewater worden gebruikt dat stedelijk afvalwater bevat of een in de handel verkrijgbaar entmateriaal. In de DIN-norm wordt slechts uitgegaan van bezonken stedelijk afvalwater als entmateriaal bij watermonsters zonder moeilijk afbreekbare componenten.

Indien stedelijk afvalwater wordt gebruikt als entmateriaal wordt in de drie voorschriften als voorwaarde gesteld dat het afvalwater overwegend van huishoudelijke oorsprong moet zijn, zonder significante industriële verontreiniging. Een extra voorwaarde in de NEN-norm is dat het CZV maximaal 300 mg/l mag bedragen en het TOC maximaal 100 mg/l.

In de drie voorschriften wordt uitgegaan van bezinking als voorbehandeling bij stedelijk afvalwater als entmateriaal; met de NEN-norm kan ook filtratie worden toegepast. Bij effluent van een biologische zuivering als entmateriaal wordt in de NEN-norm standaard uitgegaan van bezinking terwijl in Standard Methods geen voorbehandeling wordt voorgeschreven.

Als van industrieel effluent met moeilijk afbreekbare stoffen het BZV<sub>5</sub> moet worden bepaald, zijn de geraadpleegde analysevoorschriften eenduidig. In al de voorschriften wordt aangegeven dat in een dussdanig geval een entmateriaal moet worden genomen dat geadapteerd is aan de moeilijk afbreekbare componenten. Hierbij kan worden gedacht aan water dat benedenstreams (3-10 km) van de afvoer van het te analyseren water is verzameld, of water dat micro-organismen bevat die in het laboratorium op het afvalwater zijn gekweekt.

Over de bewaartermijn van het entmateriaal wordt in de analysevoorschriften geen melding gemaakt. Indien elke dag vers entmateriaal moet worden gebruikt, wordt als praktische beperking ervaren dat het laboratorium niet altijd gesitueerd is in de nabijheid van een biologische zuiveringsinstallatie die kan dienen als leverancier van een geschikt entmateriaal. Wanneer het entmateriaal voor een bepaalde periode geconserveerd kan worden, biedt dit voordelen voor de praktische uitvoering.

In de literatuur [32] wordt melding gemaakt van de mogelijkheid om entmateriaal in te vriezen bij een temperatuur van circa -18 °C. Voor gebruik werd het entmateriaal op kamertemperatuur (circa 20 °C) gebracht. In vergelijking met vers entmateriaal bleek het ingevroren entmateriaal (vriestijd: 6 dagen tot één jaar) geen adaptatietijd nodig te hebben bij gebruik van een standaard met 150 mg/l glucose en 150 mg/l glutaminezuur. De oxidatiesnelheden en resulterende BZV<sub>5</sub>-waarden waren vergelijkbaar. Ondersteund door langdurig gebruik van ingevroren entmateriaal door verschillende analisten, is geconcludeerd dat BZV<sub>5</sub>-waarden gemeten met ingevroren entmateriaal beter reproduceerbaar zijn dan met vers entmateriaal. In feite is deze conclusie niet onverwacht omdat de kwaliteit van dagelijks vers entmateriaal sterk kan variëren en deze variatie bij het gebruik van ingevroren entmateriaal wordt beperkt.

Een andere mogelijkheid om te voorkomen dat regelmatig vers entmateriaal moet worden aangeleverd is het gebruik van een in de handel verkrijgbaar entmateriaal. Fitzmaurice en Gray [9] hebben hiernaar onderzoek uitgevoerd. Een gedehydrateerde microbiologische ent werd vergeleken met enten van verschillende biologische zuiveringsinstallaties, gebruikmakend van een standaard met 150 mg/l glucose en 150 mg/l glutaminezuur. De herhaalbaarheid werd met het gedehydrateerde microbiologische entmateriaal significant verbeterd in vergelijking met entmateriaal van ruw afvalwater of effluent. Echter, de nauwkeurigheid van de BZV-test werd niet significant verbeterd.

## 4.6 Incubatie

### *Incubatieperiode*

De incubatie moet volgens de voorschriften plaatsvinden in het donker bij een temperatuur van  $20 \pm 1$  °C. De DIN-norm en Standard Methods geven aan dat het zuurstofgehalte in de BZV-flessen moet worden gemeten na 5 dagen, de NEN-norm heeft het over een incubatieperiode van 5 dagen  $\pm$  4 uur. Theoretisch kan worden vastgesteld dat een afwijking van 4 uur kan resulteren in een afwijking in de BZV<sub>5</sub>-waarde van  $\pm 2\%$ .

### *Menging tijdens incubatie*

In de NEN-norm en in Standard Methods wordt niet voorgeschreven dat de BZV-flessen continu (schudbak of magneetroerder) of discontinu (handmatig) moeten worden geschud. De DIN-norm merkt in zijn voorschrift op dat het gunstig is om de BZV-flessen continu te roeren of dat de flessen tenminste één keer per dag moeten worden geschud.

Onderzoek [30] heeft aangetoond dat in dertien proefseries geen verschillen konden worden waargenomen tussen niet bewegende en roterende monsters oppervlaktewater. In dezelfde literatuurreferentie [30] wordt gemeld dat Downing wel een effect vond van turbulentie; dit bleek afhankelijk te zijn van de deeltjesconcentratie. Turbulentie had bij een concentratie van 100 mg gesuspenderde deeltjes per liter een verhogend effect van 200 - 300 %; bij een concentratie van 10 mg/l was er geen effect. Arthur [2] geeft aan dat het niet schudden van de BZV-flessen geen goed contact teweegbrengt tussen de organismen, het substraat en zuurstof en dat dit resulteert in een lagere snelheid van het metabolisme van micro-organismen.

## 4.7 Invloed van de temperatuur

Bij meting van het BZV<sub>5</sub> wordt uitgegaan van een temperatuur van 20 °C, waarbij in de geraadpleegde voorschriften een variatie tijdens de incubatie van ±1 °C wordt getolereerd.

Omdat bacteriële activiteit een functie is van de temperatuur, is het resultaat van de BZV<sub>5</sub>-analyse temperatuurafhankelijk. Een veel gehanteerde relatie voor de temperatuurafhankelijkheid van de afbraakconstante is de volgende:

$$k_T = k_{20} \Theta^{(T-20)} \quad \{5\}$$

waarin:  $k_T$  = afbraakconstante bij temperatuur T (d<sup>-1</sup>);  
 $k_{20}$  = afbraakconstante bij een temperatuur van 20 °C (d<sup>-1</sup>);  
 $\Theta$  = constante (-);  
T = temperatuur (°C).

De experimenteel bepaalde waarde van  $\Theta$  blijkt in het temperatuursgebied tussen 20 en 30 °C 1,056 te zijn; in het gebied tussen 4 en 20 °C is een waarde van 1,135 gevonden [16]. Een waarde van 1,047 wordt algemeen gebruikt voor een temperatuur rond 20 °C. Dit betekent dat een afwijking in de temperatuur van ±1 °C resulteert in een verandering in de oxidatiesnelheid van circa 5%. Deze theoretisch vastgestelde afwijking werd bevestigd in onderzoek van Gray [12] waarin een watermonster met een BZV<sub>5</sub> van 140 mg/l werd geïncubeerd in een temperatuurbereik van 18 tot 22 °C en waarbij een afwijking werd gevonden van 5% in de BZV<sub>5</sub>-waarde per 1 °C verschil. Ten behoeve van een hoge nauwkeurigheid concludeert Gray dat de voorgestelde incubatietemperatuur van 20 ± 0,5 °C in de British Standards terecht is.

Om vast te stellen in hoeverre incubatoren voldoen aan de gewenste variatie in temperatuur heeft Gray [13] dertien incubatoren onderworpen aan een nader onderzoek. De temperatuur werd in dit onderzoek gemeten in de BZV-flesjes. Drie incubatoren voldeden aan een toegestane variatie van ± 0,5 °C, vijf hadden een variatie in de temperatuur van maximaal ± 1 °C en de overige incubatoren lieten een afwijking zien > 1 °C, met een maximale afwijking van 3 °C. De temperatuurvariatie in de gehele ruimte van een incubator werd onderzocht met behulp van een matrix van thermokoppels. Alhoewel de temperatuur in een individueel flesje redelijk constant bleef over een periode van 24 uur, varieerde de gemiddelde temperatuur over al de flesjes van 18,7 tot 20,9 °C, afhankelijk van de positie in de incubator.

Naarmate de dichtheid van de flesjes in de incubator toeneemt, worden ook de temperatuurvariaties in de onderlinge flesjes groter [13]. Een hoge dichtheid aan flesjes verhindert de luchtcirculatie en kan in extreme gevallen resulteren in een temperatuurstratificatie in de incubator. Verder is waargenomen dat het openen van de deur van de incubator, voor slechts een paar minuten, een direct effect heeft op de luchttemperatuur in de incubator. Tijdens het onderzoek resulteerde dit in een daling van de temperatuur in de BZV-flesjes van circa 2 °C. Vervolgens duurde het 4 tot 8 uur voordat de temperatuur in de flesjes op de gewenste temperatuur was teruggekomen.



#### 4.8 Invloed van nitrificatie

De aanwezigheid van nitrificerende organismen in watermonsters of entmateriaal kan tijdens de incubatie resulteren in de oxidatie van ammonium tot nitriet en nitraat. Vooral bij effluentmonsters van biologische zuiveringsinstallaties kan gedurende de incubatieperiode van vijf dagen het optreden van nitrificatie leiden tot verhoogde BZV<sub>5</sub>-waarden. De oxidatie van 1 mg ammonium tot nitraat leidt in de BZV<sub>5</sub>-waarde tot een verhoging van 4,57 mg O<sub>2</sub>/l. Omdat de BZV<sub>5</sub>-analyse wordt uitgevoerd voor het vaststellen van de hoeveelheid afbreekbaar organisch materiaal dient het optreden van nitrificatie tijdens de incubatie te worden voorkomen.

Zowel in de huidige NEN- als DIN-norm wordt ATU in een concentratie van 2 mg/l aan de BZV-fles toegevoegd ten behoeve van inhibitie van de nitrificatie. In de DIN-norm wordt aanvullend gesteld dat bij watermonsters en/of entmateriaal met een hoge nitrificatie-capaciteit 5 mg/l ATU nodig kan zijn om de nitrificatie blijvend te remmen. In de DIN-norm wordt bovendien aangegeven dat eventueel 2-chloor-6-(trichloormethyl)-pyridine (TCMP) kan worden gebruikt; gedetailleerde informatie hierover ontbreekt. In Standard Methods wordt standaard uitgegaan van het doseren van 10 mg/l TCMP.

Over de remming van nitrificatie op de BZV<sub>5</sub>-analyse is een groot aantal referenties gevonden. Hierbij is een bepaalde historische trend waar te nemen in de benodigde concentratie voor het remmen van de nitrificatie tijdens een periode van vijf dagen. Eén en ander houdt verband met een toename van het aantal nitrificerende zuiveringsinstallaties vanaf de jaren zeventig. In een artikel van 1966 beschrijven Wood en Morris [36] dat een concentratie van 0,5 mg ATU/l voldoende is om nitrificatie te remmen gedurende een periode van vijf dagen. Montgomery en Borne [17] bevestigen deze bewering en stellen bovendien dat bij een concentratie van 0,5 mg ATU/l de afbraak van organische componenten niet negatief wordt beïnvloedt. De concentratie van 0,5 mg ATU/l wordt in de jaren zeventig door meerdere Europese landen overgenomen als standaard in het analysevoorschrift voor de bepaling van het BZV<sub>5</sub>. In twee literatuurreferenties [22, 37] van 1973 wordt gemeld dat in watermonsters met een hogere nitrificatie-activiteit 0,5 ATU/l ontoereikend is om de nitrificatie volledig te remmen. In 1981 bevestigt Raff [20] dat een concentratie van 0,5 mg ATU/l onvoldoende is; hier wordt geadviseerd een concentratie te gebruiken van 3 tot 5 mg/l. Abendt en Fischermeier stellen in 1983 [1] dat 2 mg ATU/l voldoende is om de nitrificatie te remmen en dat alleen in situaties met een hoge nitrificatiecapaciteit 5 mg ATU/l moet worden overwogen. Verder wordt gevonden dat ATU tot een concentratie van 20 mg/l geen invloed heeft op de afbraak van organische componenten. De waarde van 2 mg ATU/l wordt vervolgens langzaam geïntroduceerd in de verschillende analysevoorschriften.

Raff [21] stelt vast dat behalve ATU ook TCMP kan worden gebruikt maar dat TCMP als praktisch nadeel heeft dat het slecht oplost in water en dat daardoor bijvoorbeeld geen stamoplossing kan worden gemaakt. Uit de geraadpleegde literatuur wordt niet duidelijk waarom in het huidige analysevoorschrift van Standard Methods wordt uitgegaan van 10 mg TCMP/l ten behoeve van nitrificatieremming.

## 4.9 Zuurstofmeting

Na incubatie wordt de concentratie aan opgeloste zuurstof bepaald in de BZV-fles. Het resultaat van de blancobepaling mag niet meer dan 1,5 mg/l zuurstof bedragen; indien deze waarde wordt overschreden moeten mogelijke verontreinigingsbronnen worden gecontroleerd. Na incubatie moet de concentratie aan opgeloste zuurstof volgens de NEN-norm tussen één- en tweederde van de beginconcentratie liggen. Bij een minimale streefwaarde van de beginconcentratie van 8 mg/l betekent dit een waarde van 2,7 tot 5,3. Na incubatie keurt de DIN-norm een BZV-meting goed bij een zuurstofconcentratie > 0,5 mg/l en Standard Methods bij een zuurstofconcentratie > 1 mg/l. Standard Methods stelt bovendien dat de afname in de zuurstofconcentratie minstens 2 mg/l moet bedragen.

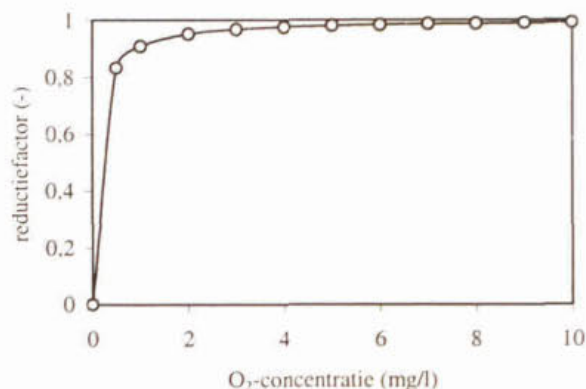
Het effect van de zuurstofconcentratie op een BZV-meting kan worden beschreven door vergelijking {1} als volgt uit te breiden:

$$\frac{dBZV_{R,t}}{dt} = -k_{BZV} \cdot BZV_{R,t} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \quad \{6\}$$

waarin:  $BZV_{R,t}$  = resterende hoeveelheid BZV op  $t = t$  (mg  $O_2/l$ );  
 $k_{BZV}$  = snelheidsconstante ( $d^{-1}$ );  
 $S_{O_2}$  = zuurstofconcentratie (mg  $O_2/l$ );  
 $K_{O_2}$  = affiniteitsconstante voor zuurstof (mg  $O_2/l$ ).

De functie met de zuurstofconcentratie ( $S_{O_2}$ ) en de affiniteitsconstante voor zuurstof ( $K_{O_2}$ ) beschrijft de afhankelijkheid van de afbraak van organische stof voor de zuurstofconcentratie. Omdat  $K_{O_2}$  een constante waarde betreft zal de functie kleiner worden bij een dalende zuurstofconcentratie; de afbraaksnelheid van organische stof wordt hierdoor verlaagd.

In figuur 2 is beschreven in welke mate de afbraaksnelheid wordt gereduceerd door een verlaging in de zuurstofconcentratie. Voor de affiniteitsconstante  $K_{O_2}$  worden in de literatuur waarden genoemd van 0,01 tot 0,2 [14]. De laatste waarde is een standaardwaarde die wordt toegepast bij het modelleren van actiefslibinstallaties [14] en verdisconteert enigszins het effect van diffusielimitatie bij vlokvorming. Bij de BZV-analyse speelt vlokvorming minder een rol. Om deze reden is in figuur 2 uitgegaan van een waarde voor  $K_{O_2}$  van 0,1 mg  $O_2/l$ .



**Figuur 2:** Reductiefactor voor de afbraaksnelheid van organische stof in afhankelijkheid van de zuurstofconcentratie,  $K_{O_2} = 0,1$  mg  $O_2/l$  (○).

In de geraadpleegde analysevoorschriften varieert de vereiste eindconcentratie zuurstof van 0,5 tot circa 3 mg O<sub>2</sub>/l. In tabel 3 is aangegeven hoeveel de afbraaksnelheid wordt gereduceerd ten opzichte van een beginconcentratie van 8 mg O<sub>2</sub>/l bij een eindconcentratie van 0,5 tot 3 mg O<sub>2</sub>/l (K<sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,1 mg O<sub>2</sub>/l).

**Tabel 3:** Reductie van de afbraaksnelheid in afhankelijkheid van de O<sub>2</sub>-concentratie ten opzichte van een O<sub>2</sub>-concentratie van 8 mg O<sub>2</sub>/l en een K<sub>O<sub>2</sub></sub> van 0,1 mg O<sub>2</sub>/l.

Zuurstofconcentratie (mg O <sub>2</sub> /l)	Reductie (%)
3,0	2
2,0	3,5
1,0	8
0,5	16

Bij deze theoretische benadering dient te worden aangetekend dat een lage zuurstofconcentratie (0,5 tot 3,0 mg O<sub>2</sub>/l) tijdens een BZV<sub>5</sub>-meting na een aantal dagen wordt bereikt, en de reductie in afhankelijkheid van de zuurstofconcentratie pas in een later stadium zijn invloed zal hebben op de afbraaksnelheid. Met een kinetiekbenadering van de eerste orde kan worden berekend dat bij een eindconcentratie van 3,0 of 0,5 mg O<sub>2</sub>/l, de waarde van het BZV<sub>5</sub> slechts 1% zal afwijken. Dit toont aan dat de voorgeschreven eindconcentratie zuurstof in NEN-EN 1899-1 aan de hoge kant is en de concentratie van 0,5 mg O<sub>2</sub>/l in de DIN-norm een reëel uitgangspunt vormt.



## 5 ENQUÊTE

### 5.1 Algemeen

Om een volledig overzicht te krijgen van diverse knelpunten die in de praktijk worden geconstateerd met de BZV<sub>5</sub>-analyse is een schriftelijke enquête georganiseerd onder laboratoria van waterbeheerders en commerciële laboratoria. De enquête heeft tevens tot doel gehad om verschillen in uitvoering van de BZV<sub>5</sub>-analyse onder laboratoria te achterhalen en na te gaan of op sommige aspecten wordt afgeweken van de geldende NEN-norm. Van de zestien aangeschreven laboratoria hebben tien laboratoria deelgenomen aan de schriftelijke enquête. De deelnemende laboratoria waren Sterlab geaccrediteerd voor de BZV-analyse.

De Nederlandse norm NEN-EN 1899-1, die als uitgangspunt heeft gediend voor onderhavig onderzoek, is gepubliceerd in september 1998. Omdat de enquête was uitgeschreven in juli 1998 maakten de geënuquëeerde laboratoria nog gebruik van norm NEN 6634 [19]. Verschillen tussen beide normen zijn dat in NEN 6634 de keuze van het type entmateriaal meer beperkt is en dat in NEN 6634 een ruimere marge wordt aangehouden voor de toegestane eindconcentratie zuurstof. In NEN-EN 1899-1 wordt naast een BZV<sub>5</sub> tevens een BZV<sub>2+5</sub> geïntroduceerd. Meer significante verschillen zijn niet geconstateerd. De resultaten van de enquête zijn daarom bruikbaar voor het optimaliseren van de analyse volgens NEN-EN 1899-1. Een samenvatting van de enquêteresultaten is gegeven in tabel 4, de diverse aspecten worden besproken in de paragrafen 5.2 tot en met 5.7.

### 5.2 Monstername, transport en conservering

Van de tien geënuquëeerde laboratoria wordt door drie laboratoria niet gekoeld tijdens monstername en/of transport. Voor de temperatuur tijdens monstername wordt in NEN 1899-1 geen voorschrift gegeven, bij transport wordt een temperatuur van 0 tot 4 °C voorgeschreven. Na ontvangst wordt bij negen laboratoria het monster bewaard bij een temperatuur van circa 4 °C en bij één laboratorium wordt het monster uitsluitend ingevroren. Vier laboratoria gebruiken naast koelen ook vriezen (circa -20 °C) als conserveringsmethode. Volgens NEN 1899-1 hoeft vriezen slechts te worden toegepast als het monster niet binnen 24 uur kan worden verwerkt. De watermonsters worden tijdens monstername, transport en conservering door de laboratoria hoofdzakelijk in het donker geplaatst.

Op werkdagen wordt bij de meeste laboratoria het monster na ontvangst binnen één dag verwerkt. Twee laboratoria streven naar een zo snel mogelijke verwerking en één laboratorium houdt een ruime marge aan van drie dagen. Voor monsters die in het weekend worden genomen wordt door de laboratoria een periode aangehouden die varieert van één tot drie dagen. Eén laboratorium verwerkt de watermonsters ook in het weekend.

### 5.3 Voorbehandeling van de monsters

Zes laboratoria geven aan dat wordt uitgegaan van het homogeniseren van de watermonsters met een Ultra Turrax. Uit de enquête komt echter niet naar voren of elk monster wordt gehomogeniseerd of dat het homogeniseren afhankelijk wordt gesteld van de hoeveelheid deeltjes of het feit dat de monsters ingevroren zijn geweest.

Van de tien geënuquëeerde laboratoria passen slechts vijf laboratoria een pH-correctie toe, terwijl de norm duidelijk is en voorschrijft watermonsters te neutraliseren op een pH van 6,0 tot 8,0.

**Tabel 4:** Samenvatting van de resultaten van de schriftelijke enquête onder de laboratoria.

Laboratorium	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Monstername, transport en conservering</b>										
Koelen tijdens monstername	ja	nee	ja	ja	nee	ja	ja	ja	ja	ja
Koelen tijdens transport	ja	ja	ja	ja	nee	ja	nee	ja	ja	ja
Koelen na ontvangst										
- koelen (4 °C)	x	x	x	-	x	x	x	x	x	x
- vriezen (-20 °C)	x	-	x	x	-	-	x	-	x	-
Bewaren reservemonsters	ja	ja	ja	nee	nee	ja	nee	ja	ja	ja
- koelen (4 °C)	-	x	-			x		n.v.	n.v.	-
- vriezen (-20 °C)	x	-	x			-		n.v.	n.v.	x
Tijd tussen monstername en meting										
- werkdagen	0-3 d	1 d	1 d	1 d	0-1 d	0-1 d	1 d	1 d	1 d	1 d
- weekend	3 d	2 d	3 d	2 d	3 d	1-2 d	2 d	3 d	3 d	2 d
<b>Voorbehandeling monsters</b>										
- pH-correctie	x	x	-	x	x	-	-	-	x	-
- turraxen	-	-	x	x	x	-	x	-	x	x
Inzetten van monsters										
- handmatig	-	x	x	x	-	x	x	x	x	x
- automatisch	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-
<b>Entmateriaal</b>										
Entmateriaal										
- influent	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-
- effluent	-	x	x	-	x	x	x	x	x	x
Bewaartermijn entmateriaal	3 d	2 wk	3 d	1mnd	3 d	0 d	0 d	5 d	3 d	1 wk
Voorbereiding entmateriaal										
- filtratie	x	-	x	-	-	-	x	-	x	x
- bezinking	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-
- conform NEN-norm	-	x	-	x	x	-	-	x	-	-
<b>Verdunningswater</b>										
Samenstelling verdunningswater	NEN	NEN	NEN	NEN	NEN	NEN	NEN	NEN	NEN	NEN
Beluchtingstijd verdunningswater	24 h	12 h	24 h	20 h	0,5 h	7 d	7 d	24 h	24 h	24 h
Bewaartermijn verdunningswater	3 d	0 d	n.v.	n.v.	0 d	7 d	7 d	n.v.	n.v.	n.v.
<b>Incubatie</b>										
Blootstelling aan licht	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	ja	nee
Temperatuurvariatie (20 °C)	± 2	± 5	± 2	± 1	± 1	± 1	± 0,5	± 1	± 2	± 1
Homogeniseren	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee
<b>Zuurstofmeting</b>										
Electrochemische zuurstofmeting	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Zuurstofmeting										
- handmatig	-	-	-	x	-	x	-	-	x	-
- automatisch	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x

x = wordt toegepast, - = wordt niet toegepast, n.v. = niet vermeld

#### 5.4 Entmateriaal

Zeven laboratoria gebruiken zowel influent als effluent van een rioolwaterzuiveringsinrichting (rwzi) als entmateriaal. Twee laboratoria gebruiken uitsluitend influent en één laboratorium gebruikt effluent. Bij de meeste laboratoria wordt gebruik gemaakt van influent en effluent van één zuivering, twee laboratoria geven aan dat ze het entmateriaal betrekken van willekeurige zuiveringen. Het grootste deel van de laboratoria bereidt het entmateriaal voor (filtratie of bezinking) conform het NEN-voorschrift.

De bewaartermijn van het entmateriaal varieert per laboratorium van nul dagen tot één maand. De gemiddelde bewaartijd bedraagt drie tot vijf dagen waarbij de conservering bij circa 4 °C algemeen gebruikt is.

Drie laboratoria geven bij de knelpuntenanalyse aan dat meer duidelijkheid wordt gewenst bij de keuze van het entmateriaal en dat eventueel meer aandacht moet worden besteed aan het gebruik van een gestandaardiseerd entmateriaal.

## 5.5 Verdunningswater

Voor de samenstelling van het verdunningswater wordt door al de laboratoria verwezen naar het NEN-voorschrift. Eén laboratorium geeft aan dat ATU reeds aan het verdunningswater wordt toegevoegd in plaats van aan het monster in de BZV-fles.

In het NEN-voorschrift wordt gesteld dat het verdunningswater minimaal 1 uur moet worden belucht. De meeste laboratoria beluchten het verdunningswater echter voor een periode van 12 tot 24 uur. Extreme afwijkingen zijn de beluchting bij twee laboratoria van 7 dagen en de beluchtingstijd van slechts een half uur bij één laboratorium. De bewaartermijn van het verdunningswater varieert van nul tot zeven dagen, terwijl het NEN-voorschrift uitgaat van een maximale bewaartermijn van 24 uur.

## 5.6 Incubatie

### *Invloed van licht*

Van de tien laboratoria geeft één laboratorium aan dat de BZV-flessen worden bewaard in een ruimte met een Na-lamp. Bij de overige laboratoria worden de flessen in het donker geplaatst. Een reden voor deze afwijking wordt niet gegeven.

### *Invloed van temperatuur*

De temperatuurvariatie in de incubator mag volgens het NEN-voorschrift  $20 \pm 1$  °C bedragen. Aan dit criterium voldoen zes laboratoria waarbij één laboratorium aangeeft het monster te bewaren bij een temperatuur van  $20 \pm 0,5$  °C. Drie laboratoria wijken af van de geldende norm en hanteren een temperatuur van  $20 \pm 2$  °C. Eén laboratorium hanteert een extreme variatie van 5 °C.

## 5.7 Zuurstofmeting

### *Zuurstofgehalte na incubatie*

De zuurstofmeting vindt bij alle laboratoria elektrochemisch plaats. Drie laboratoria voeren de meting handmatig uit, de overige hebben de beschikking over een automatische meting. In de NEN-norm wordt gesteld dat de verdunningsfactor zo moet worden gekozen dat na incubatie de restconcentratie opgeloste zuurstof een- tot tweederde van de aanvankelijke concentratie bedraagt. Wanneer na incubatie het zuurstofgehalte buiten dit bereik valt, wordt deze waarde niet gebruikt voor het berekenen van het BZV<sub>5</sub>. Omdat in veel gevallen het BZV<sub>5</sub> van een watermonster niet precies te voorspellen is, worden meerdere verdunningen ingezet om er zeker van te zijn dat de concentratie opgeloste zuurstof na incubatie binnen het gewenste bereik zal liggen.

In de enquête is gevraagd hoeveel verdunningen per watermonster worden ingezet (2 tot 3 verdunningen) maar het is niet duidelijk geworden bij welk opgelost-zuurstofgehalte een meting wordt afgekeurd. Uit mondelinge mededelingen van een aantal waterkwaliteits-beheerders is duidelijk geworden dat niet iedereen de NEN-norm nauwkeurig opvolgt. Bij een aantal beheerders wordt om praktische redenen de meting ook goedgekeurd wanneer de zuurstofconcentratie na incubatie minimaal 1 mg O<sub>2</sub>/l bedraagt. In de NEN-norm wordt uitgegaan van een minimale concentratie van 2,7 mg O<sub>2</sub>/l.

#### *Negatieve blanco's*

Zes laboratoria geven aan dat met regelmaat negatieve blanco's worden gemeten, wat door de laboratoria als een serieus knelpunt wordt ervaren. De oorzaak van het optreden van negatieve blanco's is niet duidelijk. Als mogelijke oorzaken worden genoemd: het oververzadigd zijn van verdunningswater met zuurstof, inadequate calibratie van de zuurstofmeter en het niet corrigeren van de zuurstofmeter op de luchtdruk.



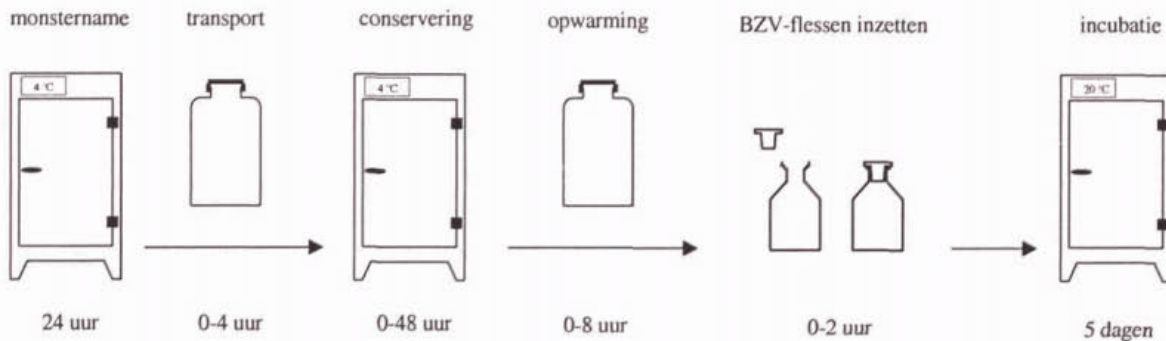
## 6 KNELPUNTENANALYSE

### 6.1 Algemeen

Via het literatuuronderzoek zijn knelpunten geïnventariseerd die wereldwijd zijn ondervonden met de BZV<sub>5</sub>-analyse. De enquête, gehouden onder tien laboratoria in Nederland, is gebruikt om een overzicht te krijgen van de knelpunten die in de praktijk worden ondervonden met de BZV<sub>5</sub>-analyse. Verder zijn via de enquête verschillen achterhaald in de uitvoeringswijze, en is bekeken of in de praktijk op bepaalde aspecten wordt afgeweken van de geldende NEN-norm. Aan de hand van de resultaten van het literatuuronderzoek en de enquête is een beeld gevormd van de knelpunten die nader dienen te worden onderzocht voor een aanscherping van norm NEN-EN 1899-1. In dit hoofdstuk worden de geconstateerde knelpunten geanalyseerd die in het praktijkonderzoek nader zijn onderzocht. De knelpunten die in de volgende paragrafen worden besproken hebben vooral betrekking op de BZV<sub>5</sub>-analyse van de matrix afvalwater omdat hiervoor de meeste knelpunten zijn geïnventariseerd. Voor rwzi-effluent en oppervlaktewater wordt overigens ook melding gemaakt van een relatief lage nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid. Indien relevant, worden in de evaluatie van hoofdstuk 8 ook voor effluent en oppervlaktewater uitspraken gedaan.

### 6.2 Invloed van conservering

Van monstername tot en met incubatie van de BZV<sub>5</sub>-flessen doorgaat het monster verschillende fasen (figuur 3).



**Figuur 3:** Schematische weergave van de fasen tussen monstername en incubatie.

Het is algemeen bekend dat in de monsterflessen processen plaatsvinden die de waarde van het BZV<sub>5</sub> kunnen beïnvloeden. In een aantal literatuurreferenties wordt aangegeven in welke mate de waarde van het BZV<sub>5</sub> door verschillende conserveringsmethoden kan worden beïnvloed. In de praktijk wordt hier echter niet altijd rekening mee gehouden, mede vanwege de praktische problemen die zich voordoen in het laboratorium. De terugbepaling in het weekend is hiervan een goed voorbeeld; NEN-EN 1899-1 biedt voor dit probleem overigens een adequaat alternatief voor de incubatietijd via het BZV<sub>2+5</sub>. Het niet in kunnen zetten van monsters in het weekend blijft desondanks een groot knelpunt.

Omdat in de praktijk wisselend wordt omgegaan met de conservering van monsters, is het uitvoeren van een kwantificering van de invloed op de BZV<sub>5</sub>-waarde zinvol om te beseffen dat de representativiteit van een BZV<sub>5</sub>-meting mede wordt bepaald door de conserveringsmethode en conserveringstijd.

### 6.3 Invloed van homogenisering

Via homogenisering van een monster wordt beoogd deelmonsters te kunnen nemen die een gelijkmatige samenstelling zullen hebben. Bij het analyseren van monsters met gesuspendeerd materiaal betekent dit dat deeltjes worden verkleind met bijvoorbeeld een Ultra Turrax. In de praktijk wordt hiervan veel gebruik gemaakt bij de analyse van afvalwatermonsters. Een dergelijke voorbehandeling kan echter van invloed zijn op de afbreekbaarheid van het afvalwater en het resultaat van een BZV<sub>5</sub>-meting.

### 6.4 Invloed van ATU

In het voorschrift NEN-EN 1899-1 wordt voor de remming van nitrificatie gedurende de vijfdaagse incubatie uitgegaan van een concentratie van 2 mg ATU/l. Uit het literatuuronderzoek en de enquête is met betrekking tot het gebruik van ATU een aantal knelpunten naar voren gekomen:

- In de literatuur [20] wordt aangegeven dat bij het gebruik van entmateriaal met een hoge nitrificatiecapaciteit een concentratie van 5 mg ATU/l moet worden overwogen. Vanwege de stikstofeisen wordt bij het ontwerp van de huidige generatie rwzi's rekening gehouden met een vergaande nitrificatie. Bij het gebruik van effluent van de huidige generatie rwzi's als entmateriaal moet daarom rekening worden gehouden met een hoge nitrificatiecapaciteit.
- ATU is een remmer van enzymen (oxygenases) die moleculaire zuurstof inbouwen, zoals bij de omzetting van ammonium in hydroxylamine in nitrificerende bacteriën. Dergelijke enzymen katalyseren bijvoorbeeld ook de initiële afbraak van fenolen, aromaten, harszuren en amino-carboxylaten.
- Het verdunningswater mag volgens NEN-EN 1899-1 een maximaal BZV<sub>5</sub> hebben van 1,5 mg O<sub>2</sub>/l. Indien ATU tijdens een BZV<sub>5</sub>-meting wordt afgebroken zal dit een extra ongewenst zuurstofverbruik tot gevolg hebben.

### 6.5 Invloed van het entmateriaal

Bij de invloed van het entmateriaal kunnen twee knelpunten worden aangedragen:

- Volgens de richtlijn NEN-EN 1899-1 is het mogelijk om entmateriaal van verschillende oorsprong te gebruiken. Uit de enquête is gebleken dat deze ruime keuze onduidelijkheid schept bij de laboratoria. In de eerdere NEN-normen was de keuze van het type entmateriaal meer beperkt.
- Het BZV<sub>5</sub> is een veelgebruikte ontwerpparameter voor rwzi's. Om deze reden is het aanbevelenswaardig om voor de betreffende rwzi een representatieve BZV<sub>5</sub>-analyse uit te voeren. In de praktijk wordt hier geen rekening mee gehouden, gezien de constatering bij de enquête dat doorgaans het influent of effluent van één rwzi als entmateriaal wordt gebruikt voor de BZV<sub>5</sub>-analyse van meerdere huishoudelijke afvalwaterstromen. Het gebruik van het influent of effluent van één rwzi heeft voor de laboratoria wel praktische voordelen.

## 6.6 Invloed van menging

Een deel van de organische verontreiniging in afvalwater bestaat uit gesuspendeerd materiaal. Wanneer de BZV-fles tijdens de incubatie niet wordt geschud zal het gesuspendeerd materiaal in de BZV-fles bezinken, en kan een lager BZV<sub>5</sub> (minder representatief) worden gevonden. Er wordt daarom een effect verwacht op het resultaat van een BZV<sub>5</sub>-analyse indien de vloeistof in de BZV-fles wel of niet wordt gemengd tijdens de incubatie. Een mogelijk effect van het niet schudden van de BZV-flessen is dat geen goed contact wordt teweeggebracht tussen de organismen, het substraat en zuurstof, met een lagere snelheid van het metabolisme van micro-organismen als gevolg.

## 6.7 Invloed van de temperatuur

In de literatuur [12] staat vermeld dat de BZV<sub>5</sub><sup>20</sup>-waarde met 5% kan afwijken wanneer een temperatuurverschil aanwezig is van  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Uit de enquête is naar voren gekomen dat een aantal laboratoria een ruimere marge (2 tot 5 °C) aanhoudt voor de toelaatbare temperatuurvariatie in de incubator. Een temperatuurvariatie kan plaatsvinden tijdens het verloop van de BZV-meting, terwijl de temperatuur in de BZV-flessen kan variëren met hun plaats in de incubator [13]. De laatstgenoemde temperatuurvariatie kan in een serie BZV-flessen resulteren in een onderling lagere reproduceerbaarheid.

## 6.8 Invloed van de eindconcentratie zuurstof

In norm NEN-EN 1899-1 wordt een beperkte marge aangehouden voor de eindconcentratie zuurstof bij de terugbepaling, namelijk 33 tot 66% van de beginconcentratie. Om binnen dit bereik te vallen moeten meestal meerdere verdunningen worden ingezet. In de geraadpleegde DIN-norm en Standard Methods wordt een ruimere marge aangehouden en wordt de meting goedgekeurd bij een eindconcentratie zuurstof van respectievelijk 0,5 en 1 mg O<sub>2</sub>/l. Theoretisch is vastgesteld dat het verschil in het BZV<sub>5</sub> niet significant zal zijn wanneer in plaats van 3 mg O<sub>2</sub>/l een eindconcentratie van 0,5 mg O<sub>2</sub>/l wordt bereikt.

## 6.9 Negatieve blanco's

Uit de enquête is gebleken dat meerdere laboratoria het meten van negatieve blanco's ervaren als een knelpunt. De oorzaak van het optreden is overigens niet duidelijk. Als mogelijke oorzaken worden genoemd: het oververzadigd zijn van verdunningswater met zuurstof, inadequate calibratie van de zuurstofmeter en het niet corrigeren van de zuurstofmeter op de luchtdruk.



## 7 PRAKTIJKONDERZOEK

### 7.1 Algemeen

De knelpunten die op basis van het literatuuronderzoek en de uitgevoerde enquête waren geanalyseerd (hoofdstuk 6) zijn in een praktijkonderzoek nader onderzocht. Dit praktijkonderzoek is in het bijzonder gericht geweest op de matrix afvalwater. Het praktijkonderzoek is uitgevoerd door de afdeling "Central Research" van AKZO NOBEL te Arnhem, in samenwerking met de laboratoria van het Waterschap Veluwe, het Zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden en het Zuiveringsschap Limburg. Een deel van de knelpunten is onderzocht aan de hand van resultaten uit intern praktijkonderzoek van de betrokken waterkwaliteitsbeheerders.

### 7.2 Onderzoeksopzet

#### 7.2.1 Invloed van conservering

De invloed van conservering is onderzocht met niet voorbezonken huishoudelijk afvalwater in een volledig gevulde fles via het schema zoals weergegeven in tabel 5. In het schema is rekening gehouden met de conserveringstijd van een aantal dagen in de koelkast (2 dagen) en de periode van opwarming van het monster wanneer het uit de koelkast is gehaald tot het moment dat een temperatuur van 20 °C is bereikt (4 tot 8 uur). De BZV<sub>5</sub>-metingen werden uitgevoerd in drievoud.

**Tabel 5:** Uitvoeringsschema voor het onderzoek naar de invloed van conservering.

Periode in koelkast (dag) \ Opwarmperiode (uur)	0	1	2
0	x	x	x
1	x	x	x
2	x	x	x
4	x	x	x
8	x	x	x

Van twee verschillende monsters afvalwater, die direct werden verdund met verdunningswater en dus nagenoeg gelijk een temperatuur van 20 °C hadden bereikt, werd het verloop in BZV gevolgd voor een periode van twee uur. Een wachttijd tot twee uur kan namelijk voorkomen wanneer de BZV-flessen automatisch worden ingezet met een BZV-baan.

In de NEN-norm wordt gesteld dat de monsters in een afgevlude en luchtdichte fles moeten worden geplaatst, direct nadat het monster is verzameld. Het effect van het niet geheel afvullen van een fles is gecontroleerd via het volgen van het CZV-verloop met het schema van tabel 5. Wanneer de flessen niet geheel zijn afgevlud bestaat de kans dat bepaalde organische componenten vervluchtigen of dat door het contactoppervlak tussen water en lucht, voldoende zuurstof aanwezig is voor een biologische afbraak. De CZV-metingen werden in drievoud uitgevoerd.

### 7.2.2 Invloed van homogenisering

Met niet voorbezonden afvalwater is een experiment uitgevoerd waarin het effect van homogenisering door het verkleinen van deeltjes met een Ultra Turrax is onderzocht. Het monster werd met een Ultra Turrax op maximaal vermogen voorbehandeld en na 1, 2 en 4 minuten werd het voorbehandelde monster geanalyseerd op CZV (in duplo). Via het CZV-verloop is het effect van het gebruik van een Ultra Turrax op het BZV<sub>5</sub> voorspeld. In het experiment waarbij is gekeken naar de invloed van menging werd een deel van het afvalwatermonster wél (10 minuten met een Ultra Turrax) en een deel werd niet voorbehandeld. Deze monsters werden geanalyseerd op BZV<sub>5</sub>.

### 7.2.3 Invloed van ATU

Een eventueel onvolledige remming van de nitrificatie met 2 mg ATU/l is onderzocht door verdunningswater verrijkt met ammonium vijf dagen te incuberen bij 20 °C, waarbij één fles is geënt met effluent met een lage nitrificatiecapaciteit en een tweede en derde fles met effluent met een hogere nitrificatiecapaciteit. Via het volgen van het ammoniumgehalte (in drievoud) kan dan een optredende nitrificatie worden waargenomen. Naast het gebruik van 2 mg ATU/l zijn ook flessen geïncubeerd met 5 mg ATU/l.

Het effect van ATU op de remming van bepaalde organische verbindingen is onderzocht met afvalwater van de petrochemische- en papierindustrie. Deze afvalwaterstromen bevatten NTA, aromaten, fenolen of harszuren, componenten waarbij de afbraak kan worden beïnvloed door de aanwezigheid van ATU. Het BZV van de afvalwatermonsters is bepaald in de aan- en afwezigheid van ATU.

De afbreekbaarheid van ATU is onderzocht in een "closed-bottle test" [11]. Eén test werd geënt met voorbezonden effluent (5 ml/l) van een rwzi en één met actief slib (2 mg d.s./l)

### 7.2.4 Invloed van entmateriaal

De invloed van het type ent is onderzocht met huishoudelijk afvalwater dat is voorbehandeld met een Ultra Turrax. De volgende typen entmateriaal zijn meegenomen in het onderzoek:

- gefiltreerd influent van een rwzi met een CZV < 300 mg/l;
- gefiltreerd effluent van een rwzi;
- bezonden effluent van een rwzi;
- rivierwater;
- commercieel entmateriaal (Cole Parmer BOD Microbe Capsules, Applicon Schiedam).

Voor de filtratie is gebruik gemaakt van een cellulosenitraatfilter (8 µm). Bij de bezinking is uitgegaan van een bezinktijd van 1 uur in een 1 liter maatcilinder. Om inzicht te krijgen in het effect van de hoeveelheid toegevoegd entmateriaal is voor het bezonden effluent een BZV<sub>5</sub>-analyse ingezet met 5 ml/l en 20 ml/l entmateriaal. Om de invloed van het monster als entmateriaal uit te sluiten is tevens een serie BZV<sub>5</sub>-analyses uitgevoerd met gesteriliseerd huishoudelijk afvalwater. Via deze aanpak bevatten de flessen zonder ent slechts micro-organismen die aanwezig zijn in het verdunningswater. De analyses zijn in achtvoud ingezet.

De representativiteit van een BZV<sub>5</sub>-analyse is onderzocht door verschillende typen afvalwater van drie rwzi's in vijfvoud te analyseren met het effluent van elke rwzi als entmateriaal volgens het schema in tabel 6.

**Tabel 6:** Uitvoeringsschema voor het onderzoek naar de invloed van het entmateriaal.

Monster Ent	rwzi A influent onbehandeld	rwzi B influent onbehandeld	rwzi B influent voorbezonden	rwzi B effluent oxidatiebed	rwzi C influent onbehandeld
Geen ent	x	x	x	x	x
Effluent rwzi A	x	x	x	x	x
Effluent rwzi B	x	x	x	x	x
Effluent rwzi C	x	x	x	x	x

### 7.2.5 Invloed van menging

De invloed van menging is onderzocht door een monster afvalwater zonder gesuspendeerd materiaal en een monster afvalwater met veel gesuspendeerd materiaal onder verschillende mengcondities te incuberen, variërend van ongemengd tot dagelijks gemengd en continu gemengd. De BZV-flessen die dagelijks werden gemengd, waren voorzien van glaspereels. De flessen werden éénmaal per dag met de hand enkele malen gekeerd. De continu gemengde flessen werden geïncubeerd in een schudincubator. Het onderscheid tussen een monster met en zonder gesuspendeerd materiaal werd verkregen door een monster afvalwater zonder voorbehandeling in te zetten en door een monster voor de analyse te filtreren over een papierfilter. Een extra variatie werd ingevoerd door een deel van het monster met gesuspendeerd materiaal te homogeniseren via een behandeling met een Ultra Turrax. Het BZV<sub>5</sub> werd in achtvoud geanalyseerd.

### 7.2.6 Invloed van temperatuurprofiel

Tijdens het praktijkonderzoek is in een experiment aandacht besteed aan het optreden van een temperatuurprofiel tijdens de BZV<sub>5</sub>-meting door twee temperatuurprofielen te simuleren. De eerste 72 uur van de incubatieperiode werd de temperatuur op respectievelijk 18°C en 22°C gehouden, van 72 tot 120 uur was de temperatuur in beide profielen 20°C. Het experiment is uitgevoerd met een monster voorbezonden huishoudelijk afvalwater, waarbij als entmateriaal effluent van de betreffende rwzi is gebruikt. De BZV<sub>5</sub>-analyses werden in achtvoud uitgevoerd.

### 7.2.7 Invloed van de eindconcentratie zuurstof

In paragraaf 4.9 is theoretisch vastgesteld dat het resultaat van een BZV<sub>5</sub>-meting in geringe mate wordt beïnvloed door de hoogte van de eindconcentratie zuurstof en dat het bereik waarin een BZV<sub>5</sub>-meting wordt goedgekeurd in principe kan worden verruimd in de NEN-norm. Door het Zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden is met behulp van cijfermateriaal uit het verleden nagegaan of uit de praktijk bekend is of de eindconcentratie zuurstof een grote invloed heeft op de BZV<sub>5</sub>-meting. Het geraadpleegde cijfermateriaal was verkregen met NEN 6634 als voorschrift, met als entmateriaal een mengsel van 50% influent en 50% effluent, afkomstig van een huishoudelijke zuivering. Op basis van twee verdunningen met een hoog en een laag zuurstofverbruik is beoordeeld of sprake kan zijn van een goede duplobepaling wanneer de twee waarden met elkaar worden vergeleken.

### 7.2.8 Negatieve blanco's

Door het Zuiveringschap Limburg is in intern onderzoek aandacht besteed aan het optreden van negatieve blanco's. Mogelijke oorzaken die werden onderzocht zijn een onjuiste correctie van de luchtdruk, onvoldoende zuurstofverzadiging bij het starten van de meting en het toevoegen van te weinig entwater.

### 7.2.9 Ringtest

Tussen AKZO Nobel en de laboratoria van de betrokken waterkwaliteitsbeheerders heeft een ringtest plaatsgevonden. Als monster heeft voorbezonden afvalwater van een rwzi gefungeerd. Het afvalwater van deze rwzi is voor 70% van huishoudelijk afkomst. Het monster is gehomogeniseerd met een Ultra Turrax en in porties ingevroren. De monsters zijn in bevroren toestand meegenomen. Door iedereen is op hetzelfde tijdstip het BZV<sub>5</sub> bepaald, met en zonder entmateriaal. Elk laboratorium heeft zijn eigen entmateriaal gebruikt.

## 7.3 Procedure van de BZV<sub>5</sub>-analyse

Bij een aantal experimenten is voor de BZV<sub>5</sub>-analyse uitgegaan van een aangepaste procedure ten opzichte van wat doorgaans gebruikelijk is in de praktijk. In de praktijk worden de monsters direct in de flessen gepipetteerd waarna de flessen gevuld worden met geënt en belucht verdunningswater. Voor het onderzoek naar de invloed van menging, verschillende typen entmateriaal en de invloed van een temperatuurprofiel is een procedure gehanteerd waarbij het monster, de ent en het verdunningswater werden gemengd vòòr het vullen van de flessen. Vervolgens werd dit mengsel ongeveer een uur belucht. Na deze periode werd de zuurstofconcentratie bepaald bij een temperatuur van circa 20°C. Deze procedure is van invloed op de BZV<sub>5</sub>-waarde; het had echter geen invloed op de vergelijking van de onderzoeksresultaten. Omdat het monster reeds is verdund zal het effect bovendien gering blijven.

De experimenten voor het onderzoeken van de invloed van conservering, homogenisering en de relatie tussen het entmateriaal en de representativiteit zijn onderzocht met de procedure waarbij het monster direct in de fles wordt gepipetteerd. Deze procedure is ook door alle deelnemers van de ringtest toegepast.

De BZV-flessen werden in kasten (Sanyo, Breda) bij  $20 \pm 0,1$  °C geïncubeerd. De zuurstofconcentratie werd electrochemisch bepaald met een zuurstofelectrode (WTW Trioxmatic EO 200) en zuurstofmeter (WTW OXI 530). Voor alle BZV<sub>5</sub>-analyses werden blancobepalingen meegenomen.

## 7.4 Resultaten en discussie

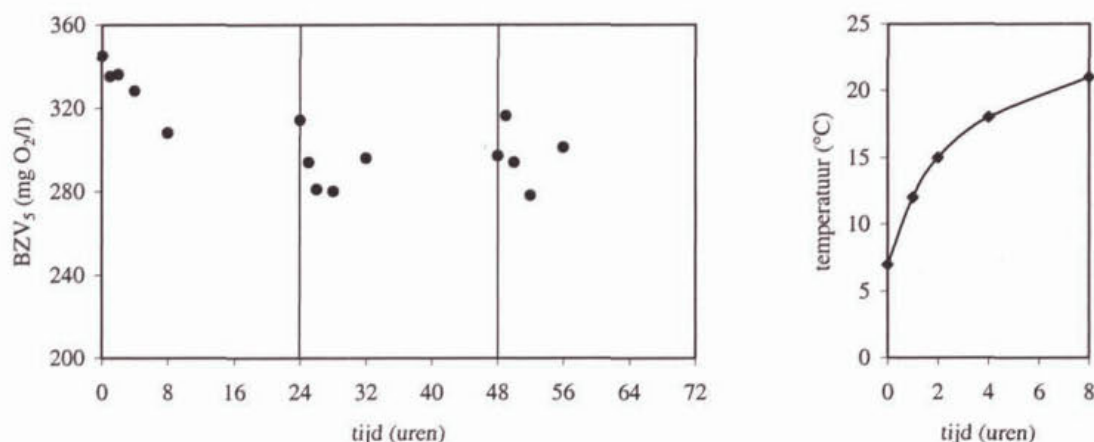
### 7.4.1 Invloed van conservering

In figuur 4 is het resultaat te zien van het experiment waarbij het effect van de conserverings-termijn en het effect van opwarming is bekeken op het BZV<sub>5</sub> van een monster huishoudelijk afvalwater (niet voorbehandeld) in een volledig afgevulde fles. In het rechtergedeelte van de figuur is het temperatuurverloop weergegeven vanaf het moment dat het monster uit de koelkast werd gehaald. De begintemperatuur geeft aan dat in de koelkast een temperatuur werd gehandhaafd van ongeveer 7 °C.



Het temperatuurverloop (vloeiende lijn) doet vermoeden dat de temperatuur van circa 20 °C werd behaald na een periode van 8 uur; de mogelijkheid bestaat echter dat de temperatuur van 20 °C reeds eerder werd bereikt (tussen 4 en 8 uur).

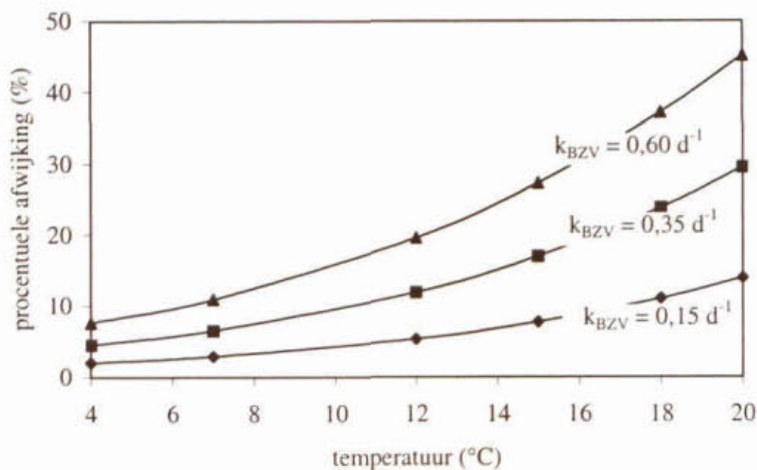
Via het volgen van het BZV<sub>5</sub> is waargenomen dat voor het onderzochte afvalwatermonster bij een temperatuur van 7 °C, 8% van het BZV<sub>5</sub> is omgezet na één dag en 14% na twee dagen. Tijdens de periode van 8 uur waarin het monster werd opgewarmd, werd op de eerste dag een afname gemeten van 10%, op de tweede dag wederom een afname van 10% en op de derde dag een afname van 6%. Op de tweede en derde dag werd de dalende trend verstoord door hogere BZV<sub>5</sub>-waarden; hierbij moet worden opgemerkt dat het samenstellen van een goed homogeen monster werd bemoeilijkt door een relatief hoog gehalte gesuspenderde stof.



**Figuur 4:** Het verloop van de BZV<sub>5</sub>-waarde in de koelkast en tijdens een periode van 8 uur opwarming van het monster (figuur links), en het temperatuurverloop tijdens opwarming (figuur rechts).

Met behulp van vergelijking {1} en de temperatuurcorrectie van vergelijking {5} kan theoretisch benaderd worden wat het effect van de temperatuur zal zijn op de kinetiek van het BZV. In de literatuur wordt aangegeven dat voor een temperatuurbereik van 4 tot 20 °C voor de constante  $\Theta$  een waarde van 1,135 kan worden gebruikt. In figuur 5 is weergegeven wat theoretisch de procentuele afbraak kan zijn, ten opzichte van het BZV<sub>5</sub><sup>20</sup>, wanneer een monster afvalwater voor een periode van 24 uur wordt bewaard bij een temperatuur van 4 tot 20 °C. De relatie is gegeven voor afvalwatermonsters met een bepaalde mate van afbreekbaarheid; uitgedrukt in een  $k_{BZV}$  van 0,15, 0,35 en 0,60 d<sup>-1</sup>.

In de NEN-norm wordt aangegeven dat de conservering na monsternamen dient plaats te vinden bij een temperatuur van 4 °C. In de praktijk wordt doorgaans aangenomen dat bij deze temperatuur de afname in het BZV<sub>5</sub> gering zal zijn. Theoretisch kan echter worden voorspeld dat na 24 uur 2% ( $k_{BZV} = 0,15 \text{ d}^{-1}$ ) tot 7,5% ( $k_{BZV} = 0,60 \text{ d}^{-1}$ ) van het BZV<sub>5</sub><sup>20</sup> kan zijn afgebroken bij een temperatuur van 4 °C. Na 48 uur zal deze afname zijn verdubbeld.



**Figuur 5:** Relatieve afwijking in BZV<sub>5</sub> voor een periode van 24 uur, afhankelijk van de afbreekbaarheid van het afvalwater.

Uit de theorie blijkt dat de biologische activiteit bij lage temperaturen voldoende hoog kan zijn om een deel van het BZV<sub>5</sub> om te zetten tijdens de conserveringstermijn. Niet duidelijk is hoe een voldoende hoge zuurstofconcentratie in het monstervat kan worden gehandhaafd ten behoeve van de biologische activiteit. De volgende factoren geven aanleiding om voor afvalwater aan te nemen dat het monster zuurstofloos moet zijn:

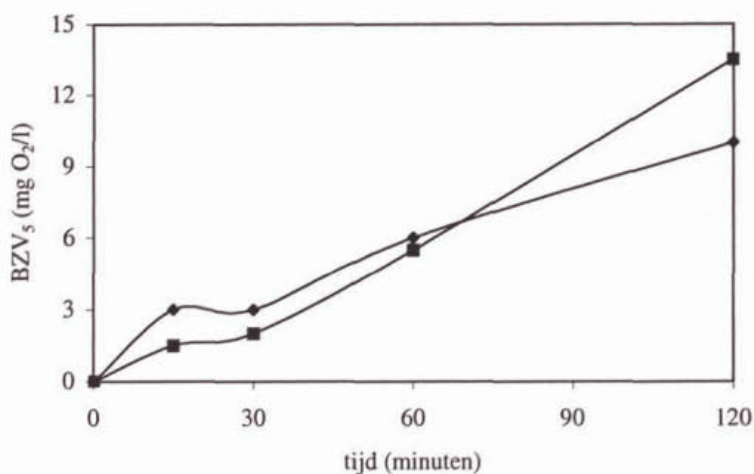
- lage beginconcentratie zuurstof;
- hoge concentratie organische stof;
- geen geforceerde beluchting;
- te verwaarlozen grensooppervlak lucht-water.

Er zijn echter ook factoren die indiceren dat de zuurstofconcentratie voldoende hoog kan zijn voor biologische activiteit:

- lagere affiniteitsconstante voor zuurstof (< 0,1 mg O<sub>2</sub>/l);
- hogere oplosbaarheid van zuurstof bij lagere temperatuur;
- hogere deficietfactor en daardoor grotere drijvende kracht voor zuurstofinbreng.

Vooralsnog is het niet duidelijk welke factoren bepalend zijn voor de zuurstofinbreng in een monstervat tijdens conservering. Op basis van de literatuur en het praktijkonderzoek blijft het opportuun om te blijven stellen dat tijdens de conservering een significant deel van het BZV<sub>5</sub> kan worden omgezet.

Nadat de verdunning van een afvalwatermonster in de BZV-fles is ingezet, heeft de vloeistof in de fles snel een temperatuur van 20 °C bereikt omdat het verdunningswater een temperatuur van 20 °C heeft. Wanneer na deze handeling wordt gewacht met het bepalen van de beginconcentratie zuurstof, kan een gedeeltelijke afbraak plaatsvinden van BZV. De resultaten in figuur 6 bevestigen deze veronderstelling. De periode van de eerste 30 minuten van het experiment betreft een adaptatiefase, na 2 uur incubatie is 1 à 2% van het BZV<sub>5</sub> afgebroken. Het langer laten staan van reeds verdunde monsters bij 20 °C, kan dus resulteren in een significante daling van het BZV<sub>5</sub>.



**Figuur 6:** BZV-verloop in de eerste 120 minuten voor twee afvalwatermonsters.

Wanneer naast een biologische afbraak van organische componenten, het strippen van vluchtige componenten een effect heeft op de BZV<sub>5</sub>-waarde, kan het niet geheel afvullen van een monsterfles hierop van invloed zijn. Op basis van CZV-metingen is aangetoond dat na twee dagen de afname in het CZV van een niet geheel afgevlude fles 10% bedraagt en in een geheel afgevlude fles 5%. De hogere CZV-afbraak kan ook zijn veroorzaakt doordat via het grotere grensooppervlak lucht-water, zuurstof in mindere mate limiterend zal zijn voor biologische afbraak.

#### 7.4.2 Invloed van homogenisering

Bij het experiment naar de invloed van het homogeniseren van het monster via verkleining van deeltjes met een Ultra Turrax, bedroeg de beginconcentratie CZV van het niet-voorbezonden afvalwater 695 mg/l. Na een behandeling van 1 minuut was het CZV afgenomen met 2% en na 4 minuten met 5%. Uit het experiment waar is gekeken naar de invloed van menging (tabel 10) is gebleken dat door voorbehandeling met een Ultra Turrax voor 10 minuten, het BZV<sub>5</sub> is afgenomen met 5 tot 10%.

Omdat een voorbehandeling met een Ultra Turrax is gericht op een verkleining van deeltjes, werd een verhoging van het BZV<sub>5</sub> verwacht vanwege een toename in de afbreekbaarheid. De resultaten laten daarentegen een verlaging zien. De verklaring hiervoor moet worden gezocht in een momentane stripping van vluchtige componenten en biologische afbraak van snel afbreekbaar CZV.

#### 7.4.3 Invloed van ATU

Uit het experiment waarin de remming van ATU op de nitrificatie is onderzocht, is gebleken dat een concentratie van 2 mg ATU/l voldoende bleek te zijn om de nitrificatie te remmen gedurende een periode van vijf dagen. Het gebruikte entmateriaal (effluent) werd echter gekenmerkt door een relatief lage nitrificatiecapaciteit.

Met de onderzochte industriële afvalwaters is niet aangetoond dat ATU een invloed heeft op de afbraak van organische verbindingen. Bij de analyses met en zonder ATU zijn vergelijkbare BZV-waarden gemeten.

De “closed-bottle test” geeft met actief slib of met voorbezonden effluent geeft aan dat ATU niet gemakkelijk afbreekt, de afbraak van ATU gedurende de BZV<sub>5</sub>-analyse kan worden uitgesloten en toevoeging van ATU zal de BZV<sub>5</sub>-waarde niet verhogen.

#### 7.4.4 Invloed van het entmateriaal

De resultaten van het experiment om de invloed te bepalen van verschillende typen entmateriaal op het BZV<sub>5</sub> van huishoudelijk afvalwater, zijn weergegeven in tabel 7. Hierin is te zien dat het BZV<sub>5</sub> met IJsselwater en zonder ent hoger zijn dan de waarden verkregen met de overige enten; de hogere waarde van het BZV<sub>5</sub> zonder ent was overigens niet verwacht. De diverse behandelingen van het effluent en de hoeveelheid effluent als entmateriaal hebben geen significante verschillen veroorzaakt in het resultaat van de BZV<sub>5</sub>-analyse.

Voor de invloed van de hoeveelheid entmateriaal kan de volgende theoretische beschouwing worden gegeven. De verhouding van substraat tot biomassa is aan het begin van een BZV-meting hoog. Met dit uitgangspunt kan theoretisch worden benaderd dat voor een BZV<sub>5</sub>-analyse de initiële concentratie aan micro-organismen een geringe invloed zal hebben op het uiteindelijke resultaat. Dit wordt bevestigd met het experiment waarbij een viervoudige hoeveelheid entmateriaal is gebruikt (tabel 7).

Met gesteriliseerd huishoudelijk afvalwater is het BZV<sub>5</sub> met IJsselwater als ent wederom hoger, eventueel vanwege een hogere bacteriële diversiteit van het rivierwater ten opzichte van het effluent. Opmerkelijk is de BZV<sub>5</sub>-waarde van de analyse zonder ent omdat de ent slechts bestaat uit micro-organismen die in het verdunningswater aanwezig zijn. Desondanks wordt een gelijkwaardige uitkomst verkregen als voor BZV-flessen met ent. Hoogstwaarschijnlijk wordt dit veroorzaakt doordat het inzetten van de BZV-flessen niet onder steriele omstandigheden heeft plaatsgevonden.

**Tabel 7:** Invloed van het type entmateriaal, de behandeling van het entmateriaal en de hoeveelheid entmateriaal op de BZV<sub>5</sub>-meting.

Ent	BZV <sub>5</sub> (mg/l)	
	“Normaal”	Gesteriliseerd
IJsselwater	75	200
Commercieel entmateriaal	66	185
Effluent gefiltreerd (5 ml)	68	
Effluent bezonken (5 ml)	66	186
Effluent bezonken (20 ml)	68	
Geen ent	80	182

In tabel 8 zijn voor de onbehandelde afvalwaterstromen van drie rwzi's de resultaten gepresenteerd van het onderzoek naar de representativiteit van het BZV<sub>5</sub> als ontwerp-parameter bij het zuiveren van huishoudelijk afvalwater. De laagste BZV<sub>5</sub>-waarden zijn gemeten wanneer geen ent werd toegevoegd en het afvalwatermonster zijn eigen ent vormde. Door geen ent te gebruiken is maximaal een 23% lagere waarde gevonden ten opzichte van de analyses waarbij gebruik werd gemaakt van het effluent van de drie rwzi's als entmateriaal. Bij het onderling gebruik van effluent van de betrokken rwzi's als entmateriaal voor de analyse, is een variatie gemeten in het influent-BZV<sub>5</sub> van 2 tot 10%.

**Tabel 8:** Invloed van het type effluent als entmateriaal op de BZV<sub>5</sub>-meting van niet voorbezonden huishoudelijk afvalwater.

Ent \ Monster	rwzi A, influent (mg/l)	Rwzi B, influent (mg/l)	rwzi C, influent (mg/l)
Geen ent	379	262	276
Effluent rwzi A	409	309	313
Effluent rwzi B	429	321	327
Effluent rwzi C	395	297	318

In tabel 9 zijn naast de waarden van het BZV<sub>5</sub> van het onbehandelde influent van rwzi B, de BZV<sub>5</sub>-waarden gegeven van het influent na voorbezinking en van het effluent van het oxidatiebed van rwzi B. Bij het onbehandelde en voorbezonden influent bedraagt de maximale variatie circa 8% bij de onderlinge uitwisseling van effluent als entmateriaal. Bij het effluent van het oxidatiebed is de variatie geringer en bedraagt maximaal 4%.

**Tabel 9:** Invloed van entmateriaal op de BZV<sub>5</sub>-meting van meerdere matrices.

Ent \ Monster	rwzi B, influent (mg/l)	rwzi B, influent na voorbezinking (mg/l)	rwzi B, effluent na oxidatiebed (mg/l)
Geen ent	262	127	50
Effluent rwzi A	309	139	51
Effluent rwzi B	321	133	50
Effluent rwzi C	297	129	49

De resultaten van tabel 7, 8 en 9 geven aan dat er significante verschillen kunnen ontstaan wanneer geen ent (afvalwatermonster vormt zijn eigen ent), rivierwater of verschillende soorten effluent worden gebruikt bij de BZV<sub>5</sub>-analyse van één type afvalwater.

In zijn algemeenheid kan ervan worden uitgegaan dat de micro-organismen aanwezig in het effluent van een rwzi, geadapteerd zijn aan de componenten van het afvalwater dat in deze rwzi wordt behandeld. In microbiologisch onderzoek [5] werd vastgesteld dat de microbiële samenstelling van actief slib en afvalwater significant verschillen. Dit betekent dat de proces- en milieumomstandigheden in een rwzi doorslaggevend zijn voor de samenstelling van de populatie in het actief slib en niet de populatie micro-organismen in het afvalwater. Omdat de proces- en milieumomstandigheden in een BZV-fles anders zijn dan in de huidige generatie actiefslibsystemen, zal tijdens de BZV-meting wederom een aangepaste populatie micro-organismen ontstaan. Alhoewel effluent van de rwzi wordt gebruikt, zal desondanks sprake zijn van een adaptatie aan de heersende omstandigheden bij de BZV-meting. In hoeverre het gebruik van effluent de adaptatiefase kan verkorten is moeilijk te voorspellen, mede omdat in tabel 8 is te zien dat de hoogste BZV<sub>5</sub>-waarde niet per definitie hoeft te worden gevonden bij het gebruik van het effluent van de betrokken rwzi.

Wanneer een grotere diversiteit aan micro-organismen aanwezig is in het entmateriaal, kan een kortere adaptatietijd worden verwacht omdat de kans groter is dat voor de afbraak van bepaalde organische componenten een geschikt organisme aanwezig zal zijn. De diversiteit van het entmateriaal is afhankelijk van de bron van het entmateriaal en daarmee van de samenstelling van de afval(water)stromen die op deze bron worden geloosd. Rivierwater heeft in dit onderzoek de hoogste BZV<sub>5</sub>-waarde opgeleverd (tabel 7) ten opzichte van de overige enten.

De BZV-metingen met het afvalwatermonster als eigen ent leverden consequent een lagere BZV<sub>5</sub> dan met effluent als entmateriaal. Zowel voor influent als effluent is de populatie divers maar de diversiteit aan aërobe organismen zal groter zijn voor het effluent en kan verklaren waarom hiermee consequent hogere waarden worden gevonden.

#### 7.4.5 Invloed van menging

De resultaten van het onderzoek naar de invloed van menging zijn gepresenteerd in tabel 10. Het aandeel gesuspenseerd materiaal dat via filtratie is verwijderd en in het BZV<sub>5</sub> tot uiting is gekomen bedraagt circa 30% van het BZV<sub>5</sub> van het onbehandelde monster. De flessen die eenmaal per dag werden gemengd gaven de hoogste BZV-waarden, de continu gemengde flessen gaven bij het onbehandelde en gefiltreerde afvalwater een lager BZV<sub>5</sub> dan bij de niet gemengde flessen. De mate van menging heeft invloed op de resultaten; de verwachte hogere waarde bij menging wordt echter niet onderbouwd door de resultaten. Aan de hand van dit experiment kunnen geen eenduidige uitspraken worden gedaan over het effect van menging op de BZV<sub>5</sub>-analyse.

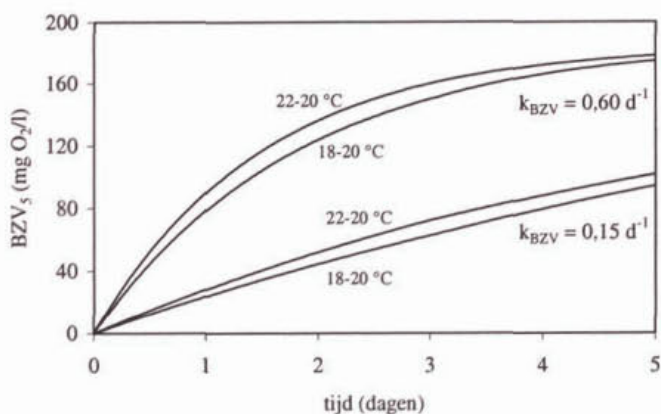
**Tabel 10:** Invloed van menging op de BZV<sub>5</sub>-meting.

Matrix	Onbehandeld afvalwater		Gefiltreerd afvalwater		Met ultraturrax behandeld afvalwater	
Niet gemengd	115 mg/l		81 mg/l		106 mg/l	
Eenmaal per dag gemengd	122 mg/l	+ 6 %	84 mg/l	+ 4 %	110 mg/l	+ 4 %
Continu gemengd	113 mg/l	- 2 %	77 mg/l	- 5 %	108 mg/l	+ 2 %

#### 7.4.6 Invloed van temperatuurprofiel

Bij de aangebrachte temperatuurprofielen (18-20 en 22-20 °C) bedroegen de gemiddelde BZV<sub>5</sub>-waarden 173 en 176 mg O<sub>2</sub>/l. Hieruit kan men concluderen dat de invloed van de temperatuur gering is en niet overeenkomt met de gevonden temperatuurafhankelijkheid van Gray [12]. In figuur 7 zijn BZV-curves gegeven voor de gesimuleerde temperatuurprofielen, bepaald met vergelijking {1} en gebruikmakend van de temperatuurcorrectie van vergelijking {5}, met een waarde voor  $\Theta$  van 1,047. Voor afvalwater met een hoge  $k_{BZV}$ -waarde (0,6 d<sup>-1</sup>) bedraagt het theoretisch verschil in BZV<sub>5</sub> circa 1,5% tussen beide temperatuurprofielen, bij een  $k_{BZV}$  van 0,15 d<sup>-1</sup> bedraagt het verschil circa 6%. Voorbezonken huishoudelijk afvalwater heeft een redelijk hoge  $k_{BZV}$  (0,4 à 0,5 [28]). Dit verklaart het geringe verschil in BZV<sub>5</sub> in het uitgevoerde experiment.

Op basis van de theorie kan worden vastgesteld dat de temperatuurafhankelijkheid van een BZV<sub>5</sub>-meting voor afvalwater lager zal zijn dan gevonden door Gray [12]. Hij geeft terecht aan dat de afbraaksnelheid met 5% zal afnemen; het eindresultaat van de BZV<sub>5</sub>-meting is echter ook afhankelijk van de afbreekbaarheid van de organische componenten in het afvalwater. Bij een hoge mate van afbreekbaarheid ( $k_{BZV} > 0,3$  d<sup>-1</sup>) zal bij een variatie in de temperatuur van  $\pm 1$  °C, de variatie in het BZV<sub>5</sub><sup>20</sup> kleiner zijn dan 2%. Bij een lagere afbreekbaarheid ( $k_{BZV} < 0,3$  d<sup>-1</sup>) kan de variatie per 1 °C oplopen tot circa 6% bij een  $k_{BZV}$  van 0,15 d<sup>-1</sup>. Omdat  $k_{BZV}$ -waarden meestal niet beschikbaar zijn voor verschillende typen afvalwater, dient rekening te worden gehouden met een bepaalde invloed van de temperatuur.



**Figuur 7:** Invloed van een temperatuurprofiel op de BZV-curve.

Dat Gray experimenteel een bevestiging vond van de theoretisch benaderde 5% per 1 °C kan worden verklaard door het feit dat gebruik werd gemaakt van een mengsel van glucose en glutaminezuur. Onderzoek van Flegal et al. [10] laat zien dat met dit substraat rekening moet worden gehouden met een niet te onderschatten adaptatietijd. Dit kan van grote invloed zijn op de uitkomst van een onderzoek naar de invloed van de temperatuur. De procentuele afwijking in het BZV<sub>5</sub> zal groter worden naarmate de adaptatiefase langer wordt.

#### 7.4.7 Invloed van de eindconcentratie zuurstof

In tabel 11 zijn voor twee verdunningen de resultaten gesorteerd uit vier maanden historische gegevens van het ZHEW, waarbij de sortering heeft plaatsgevonden op een zuurstofverbruik van minimaal 80% van één van de twee verdunningen. Als de BZV<sub>5</sub>-metingen bij een hoog en een laag zuurstofverbruik met elkaar worden vergeleken is voor de onderzochte matrices gebleken dat tot een zuurstofverbruik van 95% (tot een eindconcentratie van circa 0,5 mg O<sub>2</sub>/l) nog gesproken kan worden van goede duplobepalingen.

**Tabel 11:** Vergelijking van BZV<sub>5</sub>-waarden bij een hoog en een laag zuurstofverbruik.

matrix	lager O <sub>2</sub> -verbruik (%)	BZV (mg/l)	hoger O <sub>2</sub> -verbruik (%)	BZV (mg/l)	verschil	matrix	lager O <sub>2</sub> -verbruik (%)	BZV (mg/l)	hoger O <sub>2</sub> -verbruik (%)	BZV (mg/l)	verschil
INF	59	105	81	104	-1%	INF	76	279	92	301	8%
TBT	65	42	85	44	5%	INF	75	123	93	116	-6%
VBT	71	229	85	221	-3%	OPP	78	43	93	42	0%
INF	73	338	86	342	1%	INF	61	146	94	156	7%
INF	64	109	87	112	3%	INF	66	171	95	167	-2%
INF	74	365	87	362	-1%	TBT	79	40	95	39	-3%
INF	74	342	87	342	0%	INF	82	357	95	360	1%
OPP	59	16	88	16	-1%	INF	78	260	96	258	-1%
VBT	61	159	88	158	-1%	VBT	79	51	96	49	-4%
VBT	57	150	89	158	5%	INF	84	276	97	260	-6%
INF	67	233	90	250	7%	EFF	86	21	97	16	-24%
OPP	74	26	90	26	0%	OPP	69	19	98	18	-6%
VBT	62	157	92	157	0%	VBT	81	1420	98	1270	-11%
EFF	63	17	92	17	0%						

#### 7.4.8 Negatieve blanco's

In het onderzoek van Zuiveringschap Limburg is aangetoond dat het optreden van negatieve blanco's niet in absolute zin wordt veroorzaakt door een verschil in de luchtdruk aan het begin en eind van de meting. Via de calibratie van de zuurstofmeter wordt namelijk voor dit verschil gecorrigeerd. Bij een historische analyse van de gegevens van de luchtdruk bij de drie betrokken laboratoria van de waterkwaliteitsbeheerders is bevestigd dat variaties in de luchtdruk geen oorzaak kunnen zijn voor het optreden van negatieve blanco's.

Het aantal negatieve blanco's nam in het onderzoek van Zuiveringschap Limburg niet af door een maximale verzadiging met zuurstof te garanderen via het continu beluchten van het verdunningswater tijdens het inzetten van de bepalingen. Het verdubbelen van de hoeveelheid entmateriaal heeft wel geresulteerd in een verlaging van het aantal negatieve blanco's; met de nuancering dat dit resultaat is gevonden met een geringer aantal metingen dan bij de andere onderzochte aspecten.

Tijdens de looptijd van onderhavig project is door de betrokken laboratoria getest of het invetten van de dopjes van de BZV-flessen, om een eventuele zuurstofopname uit de lucht zo veel mogelijk tegen te gaan, effect heeft op het voorkomen van negatieve blanco's. Via deze maatregel is het aantal negatieve blanco's vergaand geminimaliseerd.

#### 7.4.9 Ringtest

De nauwkeurigheid van de metingen van AKZO Nobel was groot bij de procedure waarbij het monster, de ent en het verdunningswater werden gemengd voor het vullen van de flessen. Door deze nauwkeurigheid rees de vraag of de gevonden verschillen relevant zijn voor BZV<sub>5</sub>-bepalingen uitgevoerd in de laboratoria van de waterkwaliteitsbeheerders. De beheerders gebruiken doorgaans een automaat terwijl bij het onderzoek handmatig werd gewerkt. De procedure die normaal gevolgd wordt door de waterkwaliteitsbeheerders kan leiden tot een geringere nauwkeurigheid door bijvoorbeeld het pipetteren van de monsters in de flessen, geringe verschillen in het volume van de flessen en verschillen in de meting van de beginconcentratie zuurstof. De ringtest tussen de waterkwaliteitsbeheerders en AKZO Nobel werd uitgevoerd om de invloed van de werkwijze (automatisch versus handmatig) uit te zoeken. Het BZV<sub>5</sub> van voorbezonden huishoudelijk afvalwater werd door de deelnemers aan de ringtest op dezelfde manier bepaald, met uitzondering van het gebruikte entmateriaal; daarvoor gebruikte ieder laboratorium zijn eigen entmateriaal.

In tabel 12 zijn de resultaten gepresenteerd van de ringtest. De BZV<sub>5</sub>-metingen met ent zijn uitgevoerd in drievoud en de metingen zonder ent in tweevoud. Uit de standaarddeviaties ( $0.7 \leq SD \leq 5.2$ ) blijkt dat de nauwkeurigheid verkregen met de automatische BZV-analyse niet significant verschilt. Hieruit kan men concluderen dat de bij het onderzoek gevonden verschillen relevant zijn voor de praktijk.

**Tabel 12:** Resultaten van de ringtest met een monster voorbezonden afvalwater.

	met enting			zonder enting		
	x (mg/l)	SD (mg/l)	SD (%)	x (mg/l)	SD (mg/l)	SD (%)
Waterschap Veluwe	84,4	2,3	2,7%	82,0	1,2	1,5%
ZHEW	80,2	1,5	1,9%	75,4	5,2	6,9%
Zuiveringschap Limburg	68,9	3,7	5,4%	58,4	0,7	1,2%
AKZO Arnhem	83,9	3,5	4,2%	70,4	2,6	3,7%



De BZV<sub>5</sub>-waarden die zijn verkregen in de metingen zonder enting zijn alle lager dan in de metingen met enting, variërend van 3 tot 16%. Dit bevestigt het beeld dat was verkregen met het onderzoek naar de invloed van het type entmateriaal (§ 7.4.4). Bij de BZV<sub>5</sub>-metingen zonder ent is de onderlinge afwijking tussen de vier laboratoria groter, terwijl de variabele van het type entmateriaal was weggenomen.

Bij de metingen, met en zonder enting waren de BZV<sub>5</sub>-waarden van Zuiveringschap Limburg significant lager dan de overige laboratoria. Deze afwijking kan deels worden verklaard doordat de BZV-flessen, voordat de beginconcentratie zuurstof werd gemeten, na verdunning een aantal uren op de BZV-carrousel hebben gestaan. Daarnaast werd bij het Zuiveringschap Limburg gebruik gemaakt van gefiltreerd influent als entmateriaal. Bij de overige laboratoria werd effluent of een mengsel van influent en effluent als entmateriaal gebruikt. Dit resultaat geeft wederom aan dat wanneer geen gebruik wordt gemaakt van effluent als entmateriaal, een lagere BZV<sub>5</sub>-waarde wordt gevonden.



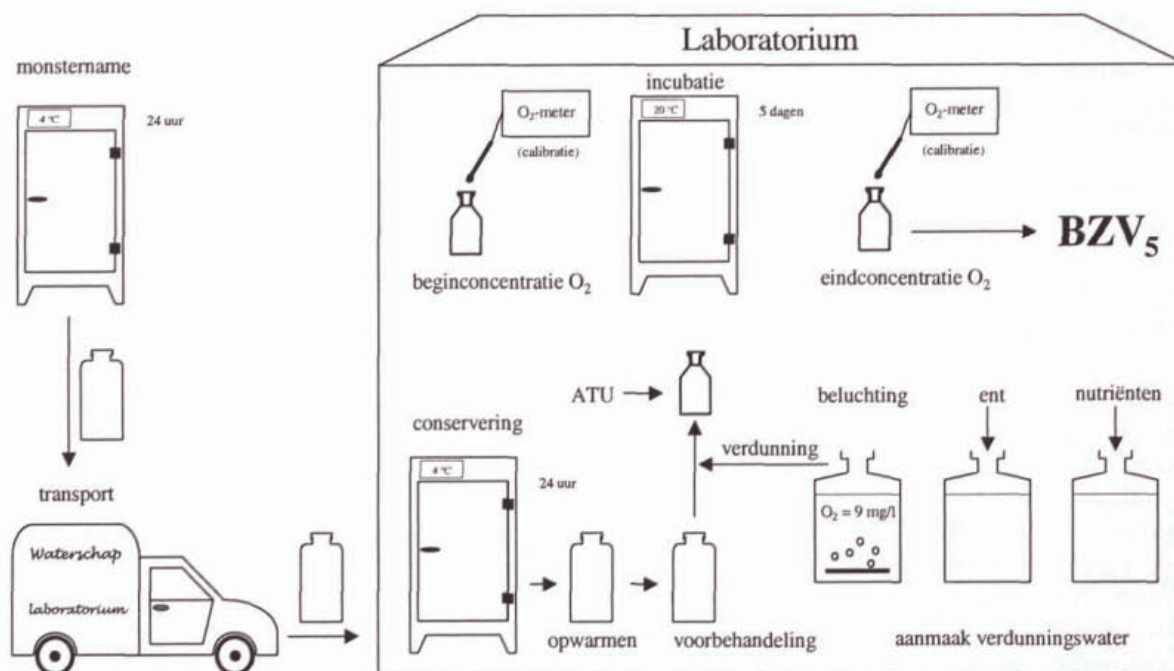
## 8 VERBETERANALYSE

### 8.1 Algemeen

Met onderhavig onderzoek is beoogd om via een knelpuntenanalyse de huidige methode voor het bepalen van het BZV<sub>5</sub> te optimaliseren en het analyseprotocol van de norm NEN-EN 1899-1 te verbeteren voor het bereiken van een hogere nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van de BZV<sub>5</sub>-analyse. De knelpunten zijn geïnventariseerd via een literatuurstudie en een enquête onder tien laboratoria. Een aantal knelpunten is verder onderzocht in een praktijkonderzoek. In dit hoofdstuk wordt op basis van een evaluatie van de knelpuntenanalyse een verbeteranalyse opgesteld.

Bij de evaluatie heeft het verbeteren van de prestatiekenmerken van de BZV<sub>5</sub>-analyse centraal gestaan. Omdat geen diepgaand onderzoek is uitgevoerd naar het effect van eventuele verbeterpunten op de prestatiekenmerken, via bijvoorbeeld een uitgebreid ringonderzoek, heeft de evaluatie met name een beschouwend karakter. In de evaluatie is verder aandacht besteed aan de representativiteit van het BZV<sub>5</sub> en praktische knelpunten die aan het licht zijn gekomen bij de enquête.

Met betrekking tot de nauwkeurigheid van de BZV-analyse wordt door Sherard et al. [26] terecht opgemerkt dat de nauwkeurigheid van "bio-essay"-methoden lager is dan van chemische bepalingen. Het bereiken van een hoge nauwkeurigheid van de BZV<sub>5</sub>-analyse, voor met name afvalwater, is mede afhankelijk van de vele handelingen die een monster na monstername moet ondergaan tot een BZV<sub>5</sub>-waarde is verkregen. Dit laatste kan worden geïllustreerd aan de hand van de levensloop van een BZV<sub>5</sub>-analyse (figuur 8). Daarnaast heeft elke handeling in meer of minder mate invloed op de reproduceerbaarheid.



Figuur 8: Levensloop van een BZV<sub>5</sub>-analyse.

## 8.2 Conservering

De resultaten van het praktijkonderzoek en de theoretische beschouwing (§ 7.2.1) hebben aangetoond dat tijdens monstername, transport, conservering, opwarming monster en inzetten van de BZV-fles een significante afname kan plaatsvinden in het BZV<sub>5</sub>-gehalte van een afvalwatermonster. Doorgaans wordt verondersteld dat wanneer de temperatuur wordt verlaagd tot 4 °C, geen biologische activiteit meer aanwezig zal zijn in het monster. Met deze vastomlijnde veronderstelling moet definitief worden afgerekend omdat bij een temperatuur van 4 °C wel degelijk biologische afbraak plaatsvindt van organische stof. Een gering zuurstofgehalte (< 0,1 mg O<sub>2</sub>/l) is hiervoor reeds voldoende (en hoe luchtdicht is luchtdicht?). Voor een afvalwatermonster met een hoge mate van afbreekbaarheid, kan in een periode van 24 uur 7,5% van het oorspronkelijk BZV<sub>5</sub> zijn omgezet bij een temperatuur van 4 °C. Voor de matrices effluent en oppervlaktewater zal dit gezien de lagere mate van afbreekbaarheid in mindere mate gelden.

In tabel 13 is de mogelijke procentuele afname weergegeven per handeling vanaf monstername tot en met het inzetten van de BZV-fles. De weergegeven percentages betreffen de afname door biologische afbraak. Afname door strippen, adsorptie of neerslagvorming is niet in het percentage meegenomen. Alhoewel de weergegeven percentages per handeling niet bij elkaar mogen worden opgeteld voor het vaststellen van het totale effect van deze handelingen, geeft het wel een indicatie van de mogelijk optredende afwijking in het BZV<sub>5</sub>.

**Tabel 13:** Afname (%) van het BZV<sub>5</sub> van afvalwater bij verschillende handelingen na monstername.

Handeling	Verstreken tijd (uur)	Temperatuur (°C)	Procentuele afname (%)
Monstername	24	4	2 – 7,5
Transport	4	4	± 1
Conservering	24	4	2 – 7,5
Opwarming monster	8	4 tot 20	3 – 10
Inzetten BZV-fles	2	20	± 2

De snelheid waarmee een afvalwatermonster wordt ingezet voor analyse is afhankelijk van de logistiek rond het transport van de plek van monstername naar het laboratorium en de planning van de werkzaamheden in het laboratorium. Ofschoon NEN-EN 1899-1 aangeeft dat het monster zo spoedig mogelijk moet worden ingezet, wordt op basis van literatuur- en praktijkonderzoek geadviseerd om het hoofdstuk over conservering als volgt aan te scherpen.

Bewaar het monster bij een temperatuur van (0 tot 4) °C in een afgevlude en luchtdicht afgesloten fles, direct nadat het monster is verzameld (ook tijdens transport), totdat de analyse wordt uitgevoerd. Stel zo spoedig mogelijk de BZV<sub>n</sub> vast, bij voorkeur binnen 6 h nadat het monster is verzameld. Indien de analyse vanwege omstandigheden pas na 24 h na monstername kan worden ingezet, moet rekening worden gehouden met een significante afname van het BZV<sub>n</sub>-gehalte; dit komt de representativiteit van de analyse niet ten goede.

In het praktijkonderzoek is aangetoond dat tijdens de opwarming van een afvalwatermonster een niet te verwaarlozen afname van het BZV<sub>5</sub>-gehalte kan optreden. Dit suggereert dat het afvalwatermonster zo snel mogelijk op een temperatuur van 20 °C moet zijn gebracht. Om het effect van opwarming na koeling vergaand te minimaliseren kan worden overwogen om het gekoelde afvalwatermonster gelijk te verdunnen met het O<sub>2</sub>-verzadigde verdunningswater en vervolgens direct de beginconcentratie zuurstof te meten. De benodigde verdunningsfactor voor afvalwater is doorgaans zodanig dat de incubatieperiode via deze methode begint met een temperatuur > 19 °C. Bij de meting van de beginconcentratie zuurstof zal de calibratie van de zuurstofelectrode wel afgestemd moeten zijn op deze wijziging in temperatuur. Indien de BZV-fles vanwege plaatsing op een BZV-carrousel moet wachten op automatische bepaling van het zuurstofgehalte, blijft het risico van een afname in het BZV<sub>5</sub>-gehalte via deze methode aanwezig.

De omgang met het inzetten van monsters in het weekend of het voorkomen van terugmeten in het weekend, resulteert in een verlaging van de representativiteit wanneer monsters voor meerdere dagen worden geconserveerd bij een temperatuur van 4 °C. Uit de enquête is naar voren gekomen dat bepaalde laboratoria de monsters tot drie dagen bewaren (vanwege het weekend). Als daarbij wordt betrokken het resultaat dat vijf laboratoria de monsters uitsluitend bewaren bij een temperatuur van 4 °C, kan worden opgemerkt dat de BZV<sub>5</sub>-analyse in deze gevallen een weinig representatief BZV<sub>5</sub>-gehalte zal opleveren voor de matrix afvalwater. Voor de matrices effluent en oppervlaktewater zal dit vanwege de lage afbreekbaarheid minder problemen opleveren.

Eén laboratorium past uitsluitend vriezen toe. Naast een conservering in de koelkast, vriezen vier laboratoria de monsters ook in. In het STOWA-project "Evaluatie van conserveringstechnieken" [29], is aangetoond dat bij diepvriezen (-18 °C) de conserveringstijd voor BZV wordt verlengd. Alhoewel de huidige Nederlandse norm (NEN-EN ISO 5667-3, Nederlands voorwoord) uitgaat van een kortere conserveringstijd (72h) dan mogelijk volgens het STOWA-rapport 2000-26 [29], biedt de huidige norm voor conservering in ieder geval een opportune mogelijkheid om het weekend te overbruggen. In het analysevoorschrift volgens NEN-EN 1899-1 wordt aangegeven dat indien de monsters niet binnen 24 uur kunnen worden geanalyseerd, de monsters mogen worden ingevroren. Het voorschrift zal op dit aspect moeten worden aangescherpt door te spreken over diepvriezen bij -18 °C.

Om het terugmeten in het weekend te voorkomen, vormt de BZV<sub>2+5</sub>-methode (NEN-EN 1899-1) naast de mogelijkheid van invriezen een goed en werkbaar alternatief. De BZV<sub>2+5</sub>-methode is onderzocht in een Europees interlaboratoriumonderzoek met 95 deelnemers waarin het werd vergeleken met de resultaten van een BZV<sub>5</sub>-analyse. Tussen het BZV<sub>5</sub> en BZV<sub>2+5</sub> werden geen significante verschillen waargenomen. Tekortkoming in de uitvoering van het onderzoek was het feit dat een standaard van glucose/glutaminezuur werd gebruikt of watermonsters met een relatief laag gehalte aan BZV (< 60 mg/l). Afvalwatermonsters met een hoge BZV<sub>5</sub>-waarde en hoge mate van afbreekbaarheid werden niet in het onderzoek betrokken. Dit betekent dat als de BZV<sub>5</sub>-resultaten worden vervangen door BZV<sub>2+5</sub>-resultaten, het noodzakelijk is om voor verschillende matrices te verifiëren of de procedure voor de bepaling van BZV<sub>2+5</sub> dezelfde resultaten geeft als de BZV<sub>5</sub>-bepaling.

### 8.3 Homogenisering van het monster

In NEN-EN 1899-1 wordt voor de homogenisering van het monster het volgende opgemerkt:

Homogenisering door deeltjes te verkleinen, bijvoorbeeld met een laboratoriumblender, is niet aan te raden voor routinegebruik, maar overweeg het gebruik ervan indien een monster wordt geanalyseerd dat grote deeltjes bevat en een hoge verdunningsfactor vereist.

Als de monsters zijn ingevroren, moeten ze worden gehomogeniseerd nadat ze zijn ontdooid.

Stedelijk afvalwater wordt doorgaans gekenmerkt door een relatief groot aandeel gesuspendeerd materiaal. Volgens het voorschrift is homogenisering van het monster dus aanvaardbaar voor de matrix afvalwater. In de praktijk past de meerderheid van de laboratoria een Ultra Turrax toe voor het homogeniseren van monsters. Reden is doorgaans dat bij het inzetten van verdunningen minder afwijkingen ontstaan in een meervoudige BZV<sub>5</sub>-bepaling van één monster afvalwater. Het verkrijgen van identieke deelmonsters is over het algemeen niet te realiseren voor monsters met gesuspendeerd materiaal en vormt daarmee één van de meest bepalende factoren in de lage reproduceerbaarheid van de BZV<sub>5</sub>-analyse. Reproduceerbaarheid is voor een laboratorium een belangrijk kengetal voor kwaliteit en vanuit dit oogpunt kan het gebruik van een Ultra Turrax in principe worden gerechtvaardigd.

Reproduceerbaarheid heeft voor de afnemer van de BZV<sub>5</sub>-waarden echter een geringere prioriteit dan de representativiteit. Uit het praktijkonderzoek is gebleken dat de representativiteit afneemt door homogenisering van het monster. Er is een niet te verwaarlozen afname (tot 10%) gemeten in het CZV-gehalte van een monster afvalwater na een korte behandeling met een Ultra Turrax. Enerzijds wordt dit veroorzaakt door het momentaan strippen van vluchtige organische componenten, anderzijds door het inbrengen van zuurstof ten behoeve van biologische afbraak. Indien de verdere behandeling van het monster na homogenisering op zich laat wachten, zal het effect worden vergroot. Een alternatief voor het homogeniseren met een Ultra Turrax is tijdens het praktijkonderzoek niet nader onderzocht.

Een hoge representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse is van groot belang voor de waterkwaliteitsbeheerder. Het BZV<sub>5</sub> van afvalwater is een belangrijke ontwerpparameter voor rwzi's en omdat het BZV<sub>5</sub> kan worden gebruikt als heffingsmaatstaf, worden de inkomsten van heffingen bepaald door de representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse. Vanwege het belang van de representativiteit, wordt geadviseerd om het monster voor de BZV<sub>5</sub>-analyse niet te homogeniseren met een Ultra Turrax. Ook bij ingevroren monsters moet dit bij voorkeur niet worden toegepast. Informatie over de reproduceerbaarheid zal dan moeten worden verkregen via een meervoudige inzet van de BZV<sub>5</sub>-analyse (vier- of vijfvoud). De tekst van NEN-EN 1899-1 zou eventueel als volgt kunnen worden aangepast:

Homogenisering door deeltjes te verkleinen, bijvoorbeeld met een laboratoriumblender, is niet aan te raden voor routinegebruik; het komt de representativiteit van het monster zeker niet ten goede.

Indien een monster wordt geanalyseerd dat grote deeltjes bevat, een hoge verdunningsfactor vereist of het monster was ingevroren, dient de reproduceerbaarheid via een meervoudige BZV<sub>n</sub>-bepaling te worden vastgesteld.

#### 8.4 Toevoeging van ATU

De remming van de nitrificatie tijdens de incubatieperiode van de BZV<sub>5</sub>-analyse met ATU heeft in de literatuur ruim aandacht gekregen. De aanbevelingen in de literatuurreferenties [1,20] worden deels bevestigd door het praktijkonderzoek. De onderzoeksopzet was dusdanig dat rwzi-effluent met een hoge nitrificatiecapaciteit als entmateriaal zou worden gebruikt. Achteraf bleek het effluent te zijn betrokken in een periode die werd gekenmerkt door een relatief lage nitrificatiecapaciteit. Alhoewel de onderzoeksopzet van het praktijkonderzoek niet volledig tot uiting is gekomen, kan op basis van de literatuur het voorstel worden gedaan om voor de benodigde ATU-dosering de norm NEN-EN 1899-1 aan te passen conform de DIN-norm. Dit betekent dat in beginsel wordt uitgegaan van een concentratie van 2 mg/l in de BZV-fles. Aanvullend moet worden gesteld dat bij watermonsters en/of entmateriaal met een hoge nitrificatiecapaciteit een concentratie van 5 mg/l ATU raadzaam is om de nitrificatie blijvend te remmen. Voor rwzi's met een vergaande stikstofverwijdering kan ervan worden uitgegaan dat het effluent van de rwzi een hoge nitrificatiecapaciteit zal bevatten.

In NEN-EN 1899-1 wordt in de paragraaf "Bereiding van beproevingsoplossingen" de volgende opmerking geplaatst:

4. Nitrificatie is niet in alle gevallen te onderdrukken. Een significant verhoogde toevoeging van ATU van meer dan 2 mg/l kan de Winkler-titratie beïnvloeden (zie EN 25813).

Afgaande op de enquêteresultaten wordt de Winkler-titratie bij Nederlandse laboratoria niet tot nauwelijks meer toegepast. Hierdoor kan bovengenoemde opmerking komen te vervallen, zodat het voorstel van 5 mg/l ATU kan worden overwogen bij de aanpassing van NEN-EN 1899-1.

#### 8.5 Type entmateriaal

De richtlijn NEN-EN 1899-1 biedt te veel vrijheid ten aanzien van de keuze van het entmateriaal. Uit de enquête is ook gebleken dat de laboratoria onderling verschillende typen entmateriaal uit de lijst van NEN-EN 1899-1 toepassen. Vooral influent en/of effluent van een willekeurige rwzi worden toegepast als entmateriaal bij een BZV<sub>5</sub>-analyse.

De resultaten van het praktijkonderzoek hebben voor de matrix afvalwater aangetoond dat een variatie van het type entmateriaal invloed heeft op het resultaat van de BZV<sub>5</sub>-analyse. Bij de verbeteranalyse moet voor het type entmateriaal onderscheid worden gemaakt tussen de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid en tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid. De meeste laboratoria hebben het gebruik van een bepaald type entmateriaal gestandaardiseerd bij het bepalen van het BZV<sub>5</sub>. Door het aanpassen van deze standaardisatie zal de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid waarschijnlijk niet worden verbeterd. Daarentegen kan de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid wel degelijk worden verbeterd door in een ringtest uit te gaan van hetzelfde type entmateriaal.

Als de lijst van mogelijke entmaterialen van NEN-EN 1899-1 wordt beschouwd met de resultaten van het praktijkonderzoek (tabel 7 en 8) is het aanbevelingswaardig om de huidige lijst als volgt aan te passen:

- a) Effluent uit een rioolwaterzuiveringsinstallatie (bezinking toepassen indien geënt verdunningswater na 5 dagen een zuurstofverbruik heeft van meer dan 1,5 mg O<sub>2</sub>/l).
- b) Water dat benedenstrooms van de afvoer van het te analyseren water is verzameld, of water dat micro-organismen bevat die zijn aangepast aan het te analyseren water en die in het laboratorium zijn gekweekt (in geval van industrieel effluent dat moeilijk afbreekbare stoffen bevat).
- c) Water uit een rivier of een meer (niet voor de matrix afvalwater).
- d) In de handel verkrijgbaar entmateriaal.

Door de eliminatie van stedelijk afvalwater en rivierwater als entmateriaal voor de matrix afvalwater zal, afgaande op de enquête, de meerderheid van de laboratoria effluent van een rwzi gaan toepassen. Naar verwachting zal de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid hierdoor worden verbeterd maar zeker niet worden geminimaliseerd, omdat nog effluent van een willekeurige rwzi kan worden gebruikt en hierdoor altijd een bepaalde spreiding in de BZV<sub>5</sub>-meetwaarden zal blijven bestaan. De mogelijkheid om entmateriaal te gebruiken dat in de handel verkrijgbaar is blijft gehandhaafd vanwege praktische voordelen. Er zal echter meer vergelijkend onderzoek moeten worden uitgevoerd om het gebruik hiervan te ondersteunen. Voor de matrices effluent en oppervlaktewater voorziet doorgaans de matrix zelf al in het benodigde entmateriaal. Dit geldt vanzelfsprekend niet voor gedesinfecteerd effluent.

Met betrekking tot de representativiteit is in de literatuur regelmatig aandacht besteed aan het BZV<sub>5</sub> in relatie tot de zuurstofhuishouding van oppervlaktewater. Ook voor rwzi's is deze relatie van belang; in de literatuur wordt hier echter minder aandacht aan besteed. Voor de dagelijkse bedrijfsvoering en het ontwerp van rwzi's is het BZV<sub>5</sub> een bepalende parameter. Als afvalwaterparameter wordt de representativiteit van het BZV<sub>5</sub> verbeterd indien voor de bepaling het effluent van de desbetreffende rwzi als entmateriaal wordt gebruikt. Voor de bepaling van het BZV<sub>5</sub> van effluent wordt de representativiteit verhoogd door water van een rivier of een meer als entmateriaal te gebruiken. Laatstgenoemde aanbevelingen kunnen als opmerking worden opgenomen in een aangepaste norm onder de paragraaf "Entwater"; bedoeld voor de bewustwording van het laboratorium over het gebruik van de BZV<sub>5</sub>-waarden per toepassingsgebied. Deze opmerkingen kunnen bovendien een katalysator vormen in de communicatie tussen laboratorium en personeel dat de BZV<sub>5</sub>-waarden nodig heeft voor de dagelijkse werkzaamheden in het waterbeheer.



## 8.6 Menging

Het effect van menging tijdens incubatie is vooral gericht op een verbetering van de representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse. De resultaten die zijn bereikt bij het praktijkonderzoek zijn echter ontoereikend om een gefundeerd voorstel te formuleren voor de verbeteranalyse. *Vergeleken met een incubatie zonder menging, zijn bij eenmaal per dag mengen hogere BZV<sub>5</sub>-waarden gemeten en bij continu mengen lagere waarden. Voor de lagere waarden bij continu mengen, kan geen plausibele verklaring worden gevonden.*

## 8.7 Temperatuur

*Het effect van de temperatuur op het eindresultaat van een BZV<sub>5</sub>-analyse voor afvalwater, wordt sterk bepaald door de afbreekbaarheid van het afvalwatermonster. Indien de temperatuur tijdens incubatie afwijkt van de opgelegde temperatuur van 20°C (een continue afwijking in °C of dynamisch in een temperatuurprofiel) is het effect groter bij een lagere afbreekbaarheid van het afvalwater (oplopend tot 6% per 1°C). Daar de afbreekbaarheid van verschillende typen afvalwater doorgaans niet bekend is, is het aanbevelingswaardig de variatie in temperatuur zo gering mogelijk te houden. De norm NEN-EN 1899-1 schrijft terecht een toelaatbare variatie voor van ± 1°C. Uit de resultaten van de enquête kan worden opgemaakt dat deze richtlijn in de praktijk met meer striktheid moet worden nageleefd.*

In een literatuurreferentie [13] wordt melding gemaakt van het voorkomen van temperatuurverschillen in de BZV-flessen op verschillende posities in de incubator. Hierdoor kan de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid negatief worden beïnvloed. Ook kan het openen van de incubator resulteren in een significante daling of stijging van de temperatuur. Laboratoria zouden het optreden van deze effecten moeten nagaan voor hun eigen situatie om meer inzicht te krijgen in de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid.

Om de geschetste problemen te minimaliseren is het wellicht te overwegen om in het verbeterde NEN-voorschrift de mogelijkheid op te nemen de BZV-flesjes te incuberen in een vloeistofbad. De warmtebuffer van een vloeistofbad is namelijk groter dan van de incubatoren die in de praktijk worden toegepast.

## 8.8 Eindconcentratie zuurstof

Zowel de theoretische beschouwing (§ 4.9) als de resultaten van een gericht onderzoek naar de invloed van de eindconcentratie zuurstof (§ 7.4.7), hebben aangetoond dat de NEN-EN 1899-1 met de richtlijn van 33% van de beginconcentratie onterecht te weinig flexibiliteit biedt bij het inzetten van de verdunningen en het goedkeuren van de meting. Op basis van deze studie wordt voorgesteld de richtlijn ten aanzien van dit aspect te herzien. Verschillende verdunningen moeten waarschijnlijk nog worden ingezet; de BZV<sub>5</sub>-meting kan echter worden goedgekeurd tot een eindconcentratie zuurstof van tenminste 1 mg O<sub>2</sub>/l. Dit voorstel wordt ondersteund door de richtlijnen van de DIN-norm en Standard Methods. Een waarde van 0,5 mg O<sub>2</sub>/l wordt niet voorgesteld vanwege de verhoogde onnauwkeurigheid van de zuurstofelektrode bij deze concentratie.

Alhoewel aan de bovengrens minder aandacht is besteed, kan hiervan worden gesteld dat het de BZV<sub>5</sub>-meting niet zal beïnvloeden. Het is daarom opportuun om hiervoor de richtlijn van Standard Methods over te nemen. Hierin wordt aangegeven dat tenminste een afname in de zuurstofconcentratie van 2 mg O<sub>2</sub>/l moet zijn gemeten.

Voor aanpassing van de norm NEN-EN 1899-1 wordt het volgende voorstel voor de paragraaf over de "Beoordeling van geldig zuurstofverbruik gedurende de proef" gedaan:

De BZV<sub>n</sub> wordt berekend voor de beproevingsoplossingen, waarbij aan de volgende voorwaarde wordt voldaan.

$$1 \leq c_2 \leq (c_1 - 2)$$

waarbij:

- $c_1$  is de concentratie opgeloste zuurstof van één van de beproevingsoplossingen op tijdstip nul in milligram per liter;
- $c_2$  is de concentratie opgeloste zuurstof van dezelfde beproevingsoplossing na n dagen, in milligram per liter.

Bovengenoemde aanpassing voor de eindconcentratie zuurstof bevordert vooral de eenvoud van de praktische uitvoering van een BZV<sub>5</sub>-meting.

## 8.9 Invloed van de verbeteranalyse op de prestatiekenmerken

In deze paragraaf wordt geëvalueerd wat de invloed zal zijn van de geformuleerde verbeteranalyse op een aantal prestatiekenmerken [33]. De prestatiekenmerken die worden beschouwd zijn: de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid, de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid en de representativiteit. Per invloedsfactor wordt via de resultaten van de enquête een uitspraak gedaan of de verbeteranalyse een negatief of positief resultaat zal hebben op het prestatiekenmerk. Het resultaat van deze exercitie is samengevat in tabel 14.

**Tabel 14:** Invloed van de verbeteranalyse op de prestatiekenmerken.

Invloedsfactor	Binnen-laboratorium reproduceerbaarheid	Tussen-laboratorium reproduceerbaarheid	Representativiteit
Conservering - maximale bewaartijd van 6 h - verkorten opwarmtijd	Neutraal Neutraal	Positief Positief	Positief Positief
Homogeniseren - geen gebruik van Ultra Turrax	Negatief	Negatief/Positief	Positief
ATU - 5 mg ATU/l i.p.v. 2 mg ATU/l	Neutraal	Positief	Positief
Entmateriaal - minder keuzemogelijkheden	Neutraal	Positief	Positief
Temperatuur - constant 20 °C tijdens incubatie (tijd- en plaatsfactor)	Positief	Positief	Positief

### *Binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid*

De reproduceerbaarheid geeft een maat voor de spreiding tussen meetwaarden verkregen met dezelfde methode op identiek materiaal onder verschillende omstandigheden. De verschillende omstandigheden voor een binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid hebben betrekking op de uitvoerende analist, gebruikte apparatuur, chemicaliën en standaarden, en omgevingsfactoren als temperatuur en luchtdruk. Informatie kan worden verkregen over bijvoorbeeld de gebruikte verdunningsmethode, de constantheid van het entmateriaal en de calibratiemethode van de zuurstofelectrode.

Doorgaans wordt voor de reproduceerbaarheidsbepaling een praktijkmonster met een verwachte meetwaarde nabij de kritische waarde uit de regelgeving gebruikt. Dit zijn meestal monsters met een laag BZV<sub>5</sub>-gehalte (< 50 mg O<sub>2</sub>/l) die vaak worden gekenmerkt door een lage mate van afbreekbaarheid (effluent en oppervlaktewater). Hierbij wordt tevens gestreefd naar monsters waarbij de invloed van de inhomogeniteit op de waarde van de reproduceerbaarheid verwaarloosbaar is. In plaats van praktijkmonsters kan ook standaardmateriaal worden toegepast (zoals glucose/glutaminezuur). Via deze opzet kan dus op een adequate manier onderzoek worden gedaan naar de gebruikte methode voor de BZV<sub>5</sub>-analyse en het effect van verschillende omstandigheden binnen het laboratorium.

De bovengenoemde bepaling van de reproduceerbaarheid moet worden gezien als een interne kwaliteitstest voor het laboratorium. Indien voor monsters met een hoog gehalte aan gesuspendeerde stoffen (zoals ruw afvalwater) een hoge spreiding wordt gevonden, moet dit in feite worden geaccepteerd. Dit wordt namelijk veroorzaakt door moeilijkheden in de deelbemonstering. Het toepassen van een Ultra Turrax verhoogt in zo'n geval de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid; de representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse wordt echter verminderd. In de verbeteranalyse wordt voorgesteld om het gebruik van een Ultra Turrax niet te adviseren. Laboratoria die volgens een vast protocol gebruik maken van een Ultra Turrax, zullen dus een negatieve invloed zien op de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid voor monsters met een hoog gehalte aan gesuspendeerde stof.

De overige voorstellen in de verbeteranalyse hebben voor de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid een neutraal effect. Wel kan het strikter naleven van de voorgeschreven incubatietemperatuur van  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  de reproduceerbaarheid binnen het laboratorium verhogen. Daarnaast zou geverifieerd kunnen worden in hoeverre een temperatuurvariatie aanwezig is in de BZV-flessen op verschillende posities in de incubator.

### *Tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid*

Via een ringtest onder meerdere laboratoria kan de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid worden vastgesteld. Een identiek monster wordt rondgestuurd en de laboratoria kunnen een aangepaste methode (op basis van NEN-EN 1899-1) voor de BZV<sub>5</sub>-analyse toepassen. Meestal wordt bij de monsterkeuze dezelfde lijn gevolgd als bij het vaststellen van de binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid. Dit kan als een tekortkoming worden gezien omdat bepaalde spreidingen juist tot uiting zullen komen bij het gebruik van een afvalwatermonster van een rwzi (hoog in gesuspendeerde stof, hoge mate van afbreekbaarheid en hoog BZV-gehalte). Gedacht moet worden aan de invloed van het entmateriaal, de verschillende tijden voor het gebruik van de Ultra Turrax en de variërende inzettijden in verband met een handmatige of automatische zuurstofmeting in een BZV-carrousel.

De meeste voorstellen in de verbeteranalyse zouden een positief effect moeten hebben op de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid. Het afraden van het gebruik van een Ultra Turrax kan enerzijds een negatieve invloed hebben vanwege de moeilijkheden met het samenstellen van deelmonsters. Anderzijds kan het een positief effect sorteren omdat de variatie in het gebruik van de Ultra Turrax wordt weggenomen. Het analysevoorschrift geeft voor het gebruik namelijk geen duidelijke richtlijnen.

Het verhogen van de hoeveelheid ATU naar 5 mg/l voorkomt dat bij gebruik van een effluent met een hoge nitrificatiecapaciteit, een spreiding gaat ontstaan vanwege zuurstofverbruik voor nitrificatie. Door de eliminatie van stedelijk afvalwater en rivierwater als entmateriaal voor de matrix afvalwater zal de meerderheid van de laboratoria effluent van een rwzi gaan toepassen. Naar verwachting zal de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid worden verbeterd maar zeker niet worden geminimaliseerd, omdat nog effluent van een willekeurige rwzi kan worden gebruikt en hierdoor altijd een bepaalde spreiding in de BZV<sub>5</sub>-meetwaarden zal blijven bestaan.

### *Representativiteit*

De voorstellen in de verbeteranalyse hebben allemaal een gunstige invloed op de representativiteit van de BZV<sub>5</sub>-analyse. Afgezien van het afraden van de Ultra Turrax, hebben de voorstellen een neutraal tot positief effect op de binnen- en tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid. De voorstellen voor conservering en homogenisering hebben overigens wel consequenties voor de praktische uitvoering van de BZV<sub>5</sub>-analyse. In overleg met de afnemers van BZV<sub>5</sub>-getallen, moeten afspraken worden gemaakt over de noodzaak van representatieve BZV<sub>5</sub>-analyses. Indien die noodzaak bestaat, wordt geadviseerd de geformuleerde verbeteranalyse door te voeren.

## 9 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Via onderhavig onderzoek zijn de knelpunten van de norm NEN-EN 1899-1 "Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik na n dagen (BZV<sub>n</sub>) – Deel 1: Verdunning en enting onder toevoeging van allylthiourem" geïnterpreteerd. Op basis hiervan zijn in een verbeteranalyse voorstellen gedaan ter optimalisatie van de BZV<sub>5</sub>-analyse, met aandacht voor het verbeteren van de prestatiekenmerken binnen-laboratorium- en tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid en representativiteit.

Op basis van het uitgevoerde onderzoek zijn de volgende conclusies opgesteld:

- Via het literatuuronderzoek en de enquête onder laboratoria zijn de volgende knelpunten voor de BZV<sub>5</sub>-analyse nader voren gekomen:
  - invloed van conservering;
  - invloed van homogenisering;
  - invloed van ATU;
  - invloed van het entmateriaal;
  - invloed van menging;
  - invloed van temperatuur;
  - invloed van eindconcentratie zuurstof;
  - negatieve blanco's.
- De geïnterpreteerde knelpunten zijn nader onderzocht in een praktijkonderzoek. Mede gesteund door een theoretische beschouwing en/of raadpleging van de literatuur, is het mogelijk gebleken om voor de meeste knelpunten een verbeteranalyse op te stellen (uitgebreid beschreven in hoofdstuk 8). De resultaten van het onderzoek naar menging waren niet eenduidig, zodat hiervoor geen verbeteranalyse kon worden geformuleerd. Ook voor de negatieve blanco's is geen sluitende verklaring gevonden, alhoewel het invetten van de dopjes een mogelijkheid is om dit knelpunt te reduceren.
- Het knelpunt conservering heeft vooral invloed op de representativiteit van de meting. In de verbeteranalyse wordt geadviseerd om met meer klem te adviseren de monsters zo snel mogelijk in te zetten (binnen 6 h na monsternamen). Indien dit toch niet mogelijk mocht zijn, dient een waarschuwend opmerking te worden geplaatst in het voorschrift dat dit de representativiteit niet ten goede zal komen. Ook de tijd om het monster na conservering op kamertemperatuur te laten komen, moet tot een minimum worden beperkt. Voor het omzeilen van de problemen rond het weekend is het advies de monsters in te vriezen. De monsters dienen dan direct na het weekend te worden ingezet voor analyse.
- Het homogeniseren van een monster met een Ultra Turrax wordt afgeraden. Het gebruik van een Ultra Turrax voor een korte periode resulteert al in een significante afname van het BZV<sub>5</sub>-gehalte. Ook voor monsters met een hoog gehalte aan gesuspendeerde stof en voor monsters die uit de vriezer komen wordt het gebruik van een Ultra Turrax niet geadviseerd. De reproduceerbaarheid van de meting zal dan moeten worden getoetst via een meervoudige bepaling (minimaal in drievoud).
- Het verhogen van de ATU-dosering van 2 naar 5 mg/l biedt meer zekerheid om nitrificatie tijdens de BZV<sub>5</sub>-meting te voorkomen. Deze verhoging resulteert niet in een verminderde afbraak van organische stof.

- De norm NEN-EN 1899-1 biedt te veel vrijheid in de keuze van het entmateriaal. Stedelijk afvalwater dient in ieder geval niet als entmateriaal te worden gebruikt. Voor afvalwater wordt geadviseerd effluent van een rwzi als entmateriaal toe te passen. Indien niet gedesinfecteerd, voorzien de matrices effluent en oppervlaktewater doorgaans zelf al in het benodigde entmateriaal.
- Voor de goedkeuring van de BZV-meting biedt de norm NEN-EN 1899-1 onterecht te weinig flexibiliteit voor de eindconcentratie zuurstof. In de verbeteranalyse wordt voorgesteld de meting nog goed te keuren bij een eindconcentratie van minimaal 1 mg O<sub>2</sub>/l. Dit levert goede resultaten op en minder afkeuringen voor de praktische uitvoering van de BZV<sub>5</sub>-analyse.
- De gepresenteerde verbeteranalyse zal hoogstwaarschijnlijk resulteren in een verbetering van de tussen-laboratorium-reproduceerbaarheid en de representativiteit. De binnen-laboratorium-reproduceerbaarheid zal echter nauwelijks worden beïnvloed; het niet gebruiken van een Ultra Turrax kan zelfs leiden tot een lagere reproduceerbaarheid.
- Een goede communicatie tussen de monsternemer, het laboratorium en de afnemer van de BZV<sub>5</sub>-waarde is van groot belang. Wanneer afspraken worden gemaakt over de noodzakelijkheid van bepaalde prestatiekenmerken van de BZV<sub>5</sub>-analyse, kan hiermee rekening worden gehouden. De gepresenteerde verbeteranalyse biedt daarbij een goed handvat.

### *Ringtest*

Voordat de verbeteranalyse kan leiden tot een aanpassing van het analysevoorschrift NEN-EN 1899-1, dient deze te worden getoetst in de praktijk. Daarom wordt aanbevolen om onder de laboratoria van de waterkwaliteitsbeheerders een ringtest te houden waarin de elementen van de verbeteranalyse worden meegenomen. Voor de uitvoering van deze ringtest wordt geadviseerd om ook een afvalwatermonster van een rwzi in het onderzoek te betrekken. Vanwege de relatief hoge mate van afbreekbaarheid en het relatief hoge gehalte aan gesuspendeerde stoffen, kunnen spreidingen die worden veroorzaakt door de inhomogeniteit van het monster beter worden verklaard.

### *Voorstellen voor aanscherping van NEN 1899-1*

Samenvattend worden de volgende voorstellen gedaan om NEN 1899-1 aan te scherpen ter optimalisatie van de BZV<sub>5</sub>-analyse:

- na monstername dient de BZV<sub>5</sub>-analyse zo snel mogelijk te worden ingezet. Indien conservering vereist is, dient dit te geschieden door invriezing (< -18 °C);
- monsters mogen niet worden gehomogeniseerd met behulp van een Ultra Turrax;
- de toelaatbare ATU-dosering dient te worden verhoogd naar 5 mg/l;
- voor de matrix afvalwater dient de keuze van het entmateriaal te worden beperkt tot effluent van een rwzi. Indien niet gedesinfecteerd, voorzien de matrices effluent en oppervlaktewater zelf al in het benodigde entmateriaal;
- de toelaatbare minimale eindconcentratie zuurstof dient te worden verlaagd naar 1 mg O<sub>2</sub>/l.

## 10 LITERATURREFERENTIES

- [1] Abendt, R.-W., Fischermeier, M. (1983), Untersuchungen zur Nitrifikationshemmung bei der BSB-bestimmung im Hinblick auf die Abwasserverwaltungsvorschrift, *Korrespondenz Abwasser*, Jahrgang 30, No. 9, pp. 601-606.
- [2] Arthur, R.M. (1974), Let's upgrade the BOD test, *Water & Sewage Works*, June, pp. 100-102.
- [3] Barth, E.F. (1981), To inhibit or not to inhibit: that is the question, *Journal WPCF*, Vol. 53, No. 11, pp. 1651-1652.
- [4] Bird, B.G., (1981), The effect of nitrification in the BOD test, *Wat. Pollut. Control*, pp. 378-389.
- [5] Curtis, T.P., Craine, N.G., Milner, M.G. (1998), The comparison of bacterial diversity in wastewater and mixed liquor in activated sludge, Proceedings of the Fourth Kollekolle Seminar on Activated Sludge Modelling, Copenhagen, Denmark.
- [6] Dague, R.E. (1981), Inhibition of nitrogenous BOD and treatment plant performance evaluation, *Journal WPCF*, Vol. 53, No. 12, pp. 1738- 1741.
- [7] Damiecki, R. (1980), Der Einfluß der Nitrifikationshemmung auf die BSB<sub>5</sub>-Analyse, *Korrespondenz Abwasser*, Jahrgang 27, No. 12, pp. 832-833.
- [8] DIN 38409 Teil 51. (1987), Bestimmung de Biochemischen Sauerstoffbedarfs in n Tagen nach dem Verdünnungsprinzip (Verdünnungs-BSB-n) (H51).
- [9] Fitzmaurice, G.D., Gray, N.F. (1989), Evaluation of manufactured inocula for use in the BOD test, *Water Research*, Vol. 23, No. 5, pp. 655-657.
- [10] Flegal, T.M., Schroeder, E.D. (1976), Temperature effects on BOD stoichiometrie and oxygen uptake rate, *Journal WPCF*, Vol. 48, No. 12, pp. 2700-2707.
- [11] Ginkel, C.G. van, Stroo, C.A. (1992), Simple Method to Prolong the Closed Bottle Test for the Determination of the Inherent Biodegradability, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 24, pp. 319-327.
- [12] Gray, N.F., (1989), The effect of small changes in incubation temperature on the five day biochemical oxygen demand test, *Environmental Technology Letters*, Vol. 10, pp. 253-258.
- [13] Gray, N.F., (1989), BOD incubators and temperature variability, *Environmental Technology Letters*, Vol. 10, pp. 259-268.
- [14] Henze, M., Grady, C.P.L., Gujer, W., Marais, G. v. R., Matsuo, T. (1986), Activated Sludge Model No. 1, IAWPRC Scientific and Technological reports, No. 1, IWA, Londen, ISSN 1010-707X.

- [15] LeBlanc, P.J. (1974), Review of rapid BOD test methods, *Journal WPCF*, Vol. 46, No. 9, pp. 2202-2208.
- [16] Metcalf & Eddy (1991), *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse*, Third Edition, McGraw-Hill, Inc.
- [17] Montgomery, H.A.C., Borne, B.J. (1966), The inhibition of nitrification in the BOD test, *Journal Proc. Inst. Sew. Purif.*, Vol. 65, No. 4, pp. 357-368.
- [18] NEN-EN 1899-1 (1998), Water - Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik na n dagen (BZV<sub>n</sub>) - Deel 1: Verdunning en enting onder toevoeging van allylthioureum.
- [19] NEN 6634 (1991), Water - Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik na n dagen (BZV<sub>n</sub>) - Verdunningsmethode met enting.
- [20] Raff, J. (1981), BSB-Messungen mit Nitrifikationsunterdrückung durch Allylthioharnstoff (ATH), *GWF-Wasser/Abwasser*, Jahrgang 122, No. 7, pp. 301-303.
- [21] Raff, J. (1985), BSB-Messungen mit Nitrifikationsunterdrückung durch 2-Chlor-6-(Trichlormethyl)-pyridin, *GWF-Wasser/Abwasser*, Jahrgang 126, No. 8, pp. 408-411.
- [22] Reimann, K. (1973), Untersuchungen zur Nitrifikation und Nitrifikationsgeschwindigkeit, *Wasser und Abwasserforschung*, Jahrgang 6, No. 2, pp. 49-62.
- [23] Riiheläinen, T., Starck, B. (1990), Nitrification and its suppression in the BOD-test, *Vatten*, Vol. 46, No. 2, pp. 115-120.
- [24] Roeleveld, P.J., Kruit, J. (1998), Richtlinien für die Charakterisierung von Abwasser in den Niederlanden, *Korrespondenz Abwasser*, Jahrgang 45, No. 3, pp. 465-468.
- [25] Schöneborn, C. (1989), Die Praxis der BSB-Bestimmung nach DIN 38409 - Teil 51, *Korrespondenz Abwasser*, Jahrgang 36, No. 4, pp. 424-431.
- [26] Sherrard, J.H., Friedman, A.A., Rand, M.C. (1979), BOD<sub>5</sub>: are there alternatives available?, *Journal WPCF*, Vol. 51, No. 7, 1799-1804.
- [27] *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1981), 17<sup>th</sup> Ed., American Public Health Association., Washington D.C.
- [28] STOWA (1999), Influentkarakterisering van ruw en voorbehandeld afvalwater; de invloed van voorbezinking en voorprecipitatie, rapport 99-13.
- [29] STOWA (2000), Evaluatie van conserveringstechnieken, rapport 2000-26.
- [30] Stralen, M. van, Kersting, K. (1977), De BOD<sub>5</sub><sup>20</sup>-test, een onbruikbare maatstaf voor de bepaling van de kwaliteit van oppervlaktewater, *H<sub>2</sub>O*, Vol. 10, No. 14, pp. 329-331.
- [31] Tyers, R.G., Shaw, R. (1989), Refinements to the BOD test, *Journal IWEM*, No. 3, pp. 366-374.



- [32] Tyler, L.P., Hargrave, E.C. (1965), Preserving sewage seed for BOD analysis, *Water and Sewage Works*, , , pp. 181-184.
- [33] Wiel, H.J. van de, Rooij, M.A.F.P. van, Janssens, H. (1994), Prestatiekenmerken voor meetmethoden, RIVM, Rapport nr. 219101004.
- [34] Wilderer, P., Engelmann, G., Schmenger, H. (1977), Kritik am BSB<sub>5</sub> als Verschmutzungsparameter, *GWF-Wasser/Abwasser*, Jahrgang 118, Vol. 8, pp. 357-364.
- [35] Wolf, P. (1983), Lohnt sich die Diskussion über die Hemmung der Nitrifikation bei der BSB<sub>5</sub>-Bestimmung noch ?, *Korrespondenz Abwasser*, Jahrgang 30, No. 9, pp. 600-601.
- [36] Wood, L.B., Morris, H. (1966), Modifications to the BOD test, *Journal Proc. Inst. Sew. Purif.*, Vol. 65, No. 4, pp. 350-356.
- [37] Young, J.C. (1973), Chemical methods for nitrification control, *Journal WPCF*, Vol. 45, pp. 637-646.
- [38] Young, J.C., McDermott, G.N., Jenkins, D. (1981), Alterations in the BOD procedure for the 15th edition of "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", *Journal WPCF*, Vol. 53, No. 7, pp. 1253-1259.
- [39] Young, J.C. (1983), Comparison of three forms of 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine as a nitrification inhibitor in BOD tests, *Journal WPCF*, Vol. 55, No. 4, pp. 415-416.



