

Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB)

Vorwort

Gerade die Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs ist immer ein Grund für Diskussionen hinsichtlich der Methodik und ihrer Anwendbarkeit. Die respirometrische Methode steht der Verdünnungsmethode gegenüber und Normmethoden den Selbstüberwachungsmethoden.

Zunächst ein kurzer Blick in Normentexte, sowohl national wie international als auch gestern und heute.

Die *DIN 38409 H 51* beschrieb die Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs in n Tagen nach dem Verdünnungsprinzip! Und die *DIN 38409 H 52* die respirometrische BSB-Methode? Das ist nicht korrekt. Der Teil 52 beschrieb die Bestimmung der Sauerstoffzehrung, die Bewertung als BSB war aber eine zulässige Interpretation, wie der folgende Auszug der *DIN 38409 H 52* zeigt.

„...Bei bestimmten Wasserproben können, wie im einzelnen nachzuprüfen ist, die Bedingungen so geartet sein, daß ausschließlich die abbaubaren organischen Inhaltsstoffe die Sauerstoffaufnahme begrenzen; wenn die Inkubationstemperatur $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ betrug, kann die Sauerstoffzehrung in einem solchen Fall als Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB_n) interpretiert werden....“

Nach *DIN 38409 H 52* wurde mit einer Normmethode die Sauerstoffzehrung bestimmt und der Wert als BSB interpretiert. Bezüglich des BSBs entsprach die Messung einer Eigenkontrollmessung. Diese ist nach den Eigenkontrollverordnungen der jeweiligen Bundesländer für die meisten Kläranlagenlabors die Methode der Wahl.

Blickt man in die Vereinigten Staaten, sind in den *Standard Methods* die Verdünnungsmethode als *5210 B 5-Day BOD Test* und die respirometrische als *5210 D Respirometric Method (PROPOSED)* aufgenommen. Der respirometrische BSB ist hier eigenständig und nicht mehr über die Zehrung aufgeführt, allerdings als Vorschlagsmethode. Viele in der Praxis auftauchende Fragen werden umfangreich erläutert und geklärt, so auch die immer wiederkehrende Frage nach der Vergleichbarkeit der beiden Methoden.

(nicht autorisierte Übersetzung)

„Für kommunales Abwasser zeigt sich, daß zwischen den genannten Verfahren eine Vergleichbarkeit mit dem Faktor 1 schon nach 2-3 Tagen der respirometrischen Messung gegeben sein kann...“

Ähnlich verhält sich die Situation nun in Deutschland. Die *DIN 38409 H 51* wurde durch Euronorm *DIN EN 1899-1* ersetzt, die der internationalen ISO 5815 entspricht. Sie bezieht sich wieder auf den Verdünnungs-BSB, der nun eine etwas andere Probenvorbereitung und Berechnung hat. Die europäische Norm *EN 1899-2* hat ebenfalls den Status einer Deutschen Norm und ist der Ersatz für *DIN 38409 H 52*. Sie beschreibt das Verfahren für unverdünnte Proben, deren BSB allerdings nur zwischen 0,5 und 6 mg/L liegen darf. Die Sauerstoffkonzentration wird hierbei mit einem Sensor oder durch iodometrische Titration bestimmt.

Und der respirometrische BSB? Der wurde in die 46. Lieferung der Deutschen Einheitsverfahren als *Blaudruck H55*, d.h. ebenfalls als Vorschlag ähnlich den USA,

aufgenommen und zwar als eigenständige Methode, nicht mehr über den Umweg der Zehrung.

Der respirometrisch bestimmte BSB ist die klassische Eigenkontrollmethode zur BSB Bestimmung. Daneben hat sich nun eine neue Methode entwickelt, die auf photometrischer Basis beruht. Diese Methode ist gleichfalls eine Eigenkontrollmethode und besitzt ihre Vorteile hauptsächlich bei Anwendern, die nur wenige Bestimmungen durchführen und bereits ein Photometer besitzen.

Im folgenden sollen nun diese Methoden zur Bestimmung des BSB vorgestellt werden.

Biologischer Hintergrund aller BSB_n Bestimmungen

Der wesentliche Unterschied der BSB_n Bestimmung zu anderen Messungen wie pH, Leitfähigkeit, Sauerstoff, CSB, Nitrat usw. ist die Tatsache, daß hier biologische Systeme untersucht werden und keine chemischen oder physikalischen Eigenschaften. Der biochemische Sauerstoffbedarf resultiert aus den Atmungsprozessen von Mikroorganismen und

Mikroorganismen sind Lebewesen!

Zunächst ein drastischer Vergleich: Ähnlich wie wir Menschen benötigen auch Bakterien gewisse Lebensbedingungen. So wie wir uns am Nordpol oder bei Nahrungsentzug nicht wohl fühlen oder sterben, stellen auch Bakterien gewisse Anforderungen an ihre Umgebung. Diese können bei Mikroorganismen ziemlich unterschiedlich und extrem sein, weil sie sehr anpassungsfähig sind.

Bakterien, mit denen auf einer kommunalen Abwasserreinigungsanlage zu rechnen ist, benötigen einen pH-Bereich rund um den Neutralpunkt von pH 7, eine ausgewogene Nährstoffversorgung, die durch eine ausreichende Schadstofffracht von Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor gegeben ist. Auf Temperaturschwankungen reagieren sie mit verminderter Abbauleistung.

Vor diesem Hintergrund ist zu verstehen, warum Betreiber von biologischen Abwasserreinigungsanlagen bemüht sind ihre „Biologie“ vor schädlichen Fremdeinflüssen zu bewahren.

Diese Zusammenhänge betreffen aber nicht nur die Abwasserreinigungsanlage direkt, sondern fließen auch in die BSB_n Bestimmung ein.

Eine BSB_n Bestimmung ist nur mit angepaßter Biologie, die nicht durch die Probe geschädigt, gehemmt oder abgetötet werden darf, möglich.

Es muß gewährleistet sein, daß die Mikroorganismen das zu prüfende Wasser vertragen. Aus diesem Grunde ist der Einsatz von Mikroorganismen, die das zu prüfende Wasser „kennen“, also adaptiert sind, immer die beste Lösung.

**Wässer, oder auch Prüfstoffe, die hemmende, desinfizierende oder gar toxische Wirkstoffe aufweisen, beeinträchtigen die Mikrobiologie.
Wässer, die solche Stoffe enthalten, haben keinen BSB_n.**

Meßergebnisse, die hier erzielt werden, lassen lediglich eine Aussage über die Giftigkeit (Toxizität) der eingesetzten Stoffe zu.

Respirometrische BSB_n -Bestimmung

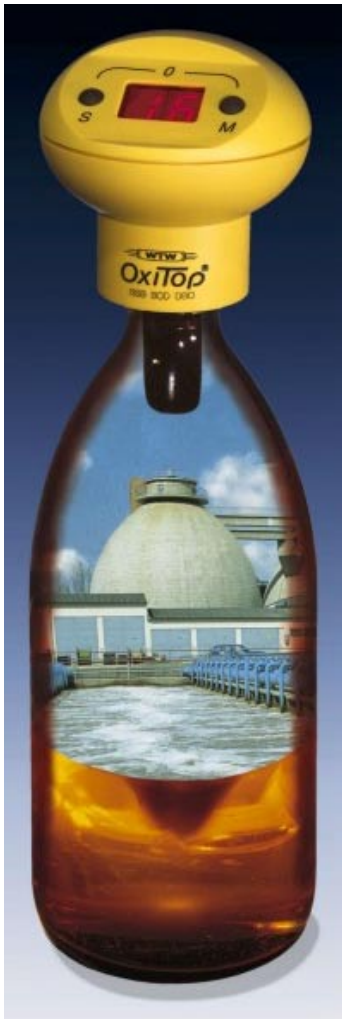
Bei der Bestimmung des BSBs handelt es sich um die Ermittlung des Abbaus organischer Stoffe durch Mikroorganismen.

Der Hauptanwendungsbereich der respirometrischen BSB_n -Bestimmung liegt in der Abwasseranalytik auf Kläranlagen. Die respirometrische Messung in der Flasche entspricht den Vorgängen in einer Kläranlage, nur im verkleinerten Maßstab. Daneben ist die Analyse anwendbar auf verschiedene wäßrige Medien, z.B. auf fließende oder stehende Oberflächengewässer und auf natürliche sowie künstliche Wässer.

Der Meßzeitraum kann durchaus unterschiedlich sein. Für die Einordnung und Beurteilung der Abbauleistung einer Kläranlage ist es mit Ausnahme einiger skandinavischer Länder üblich, den BSB₅ anzugeben. Hierbei beträgt die Analysendauer 5 Tage. Während dieser Zeit ist die Meßlösung bei 20°C zu inkubieren, d.h. die Probenflasche wird für die gesamte Meßdauer auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ in einem Inkubator thermostatisiert.

In einigen skandinavischen Ländern wird der BSB₇ bestimmt. Bei einer siebentägigen Inkubation wird eine Messung, die am Dienstag gestartet wird, auch am Dienstag fertig; bei einem BSB₅ jedoch am Sonntag. Und wer möchte gerne am Sonntag in die Kläranlage gehen, um die Meßwerte abzulesen! Zu Zeiten der Quecksilbermanometer war der BSB₇ durchaus ein Vorteil, da Messungen praktisch an jedem Tag angesetzt werden konnten. Bei Verwendung des OxiTop[®]-Systems ist dies nun ebenfalls für den BSB₅ gegeben, weil ein Speichern der Meßwerte automatisch durchgeführt wird. Die Meßwerte, auch die von Sonn- und Feiertagen, können ebensogut Tage später ausgelesen werden. Ein weiterer Vorteil des OxiTop[®] ist zudem die quecksilberfreie Druckmessung. Viele Gesetze und Verordnungen fordern nämlich, den Einsatz von gesundheitsgefährdenden Chemikalien und Stoffen zu vermeiden!

Grundlagen



Im Vergleich zu den sonstigen bekannten Methoden kommt dieses Verfahren den natürlichen Bedingungen des biologischen Abbaus am nächsten.

Der Eingriff in die Probelösung ist minimal.

Im Grunde ist die respirometrische Messung mit dem OxiTop®-System nichts anderes als eine kleine Kläranlage, abgefüllt in einer Flasche und unter Luftabschluß betrieben.

Der gesamte zur Zehrung benötigte Sauerstoff stammt aus der Meßflasche. Hierzu steht nicht nur der gelöste Sauerstoff, sondern auch Sauerstoff der Gasphase (Luft über der Meßlösung) zur Verfügung. Die Sauerstoffpartialdrücke, d.h. die Anteile des Sauerstoffs in der wässrigen und in der gasförmigen Phase, stehen im Gleichgewicht. Durch stetes kräftiges Rühren ist ein guter Gasaustausch zwischen den beiden Phasen gegeben.

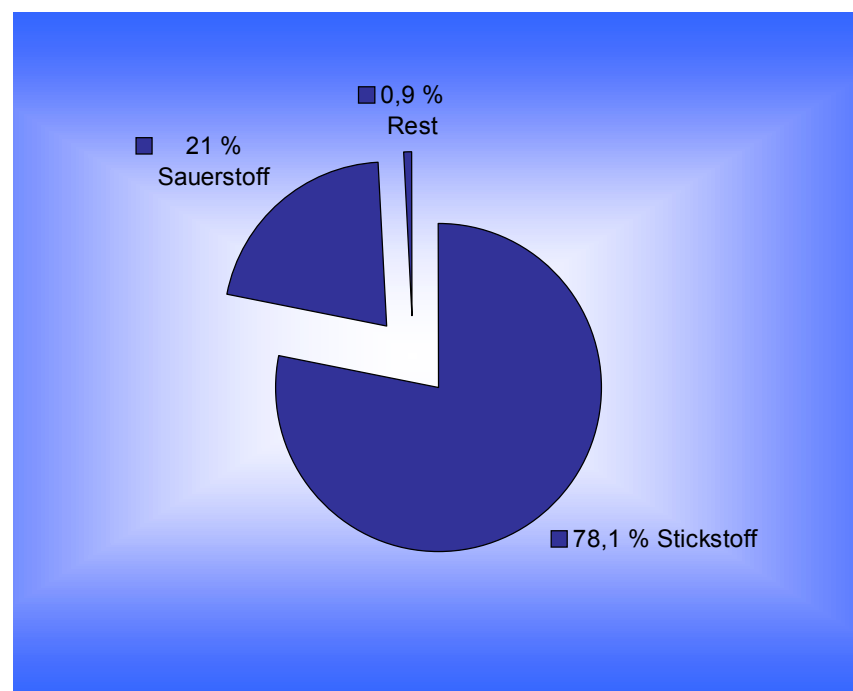
Die Luft ist zusammengesetzt aus:

- 78,1 % Stickstoff,
- 21 % Sauerstoff,
- 0,9% Kohlendioxid und Edelgase.

Genau zu diesen Anteilen ist ein einzelnes Gas wie Sauerstoff am Gesamtluftdruck beteiligt.

$$1013 \text{ hPa} \times 0,21 = 213 \text{ hPa}$$

Der Sauerstoffpartialdruck beträgt bei einem Luftdruck von 1013 hPa also 213 hPa.

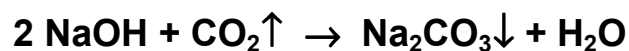


Meßprinzip

Ebenso wie wir benötigen viele Mikroorganismen zur Energiegewinnung Sauerstoff. Dieser biochemische Sauerstoffbedarf soll durch die Messung bestimmt werden. Bakterien atmen Sauerstoff ein und Kohlendioxid aus.



Für die Messung besteht nun die Möglichkeit den BSB entweder direkt über Sauerstoff oder indirekt über Kohlendioxid zu bestimmen, da ein Molekül Sauerstoff in ein Molekül Kohlendioxid umgewandelt wird. Respirometrische Methoden gehen über Kohlendioxid und messen dabei die Druckänderung. Aber woher kommt nun diese Druckänderung? Ein Mol Sauerstoff, also $6,022 \cdot 10^{23}$ Moleküle, hat ein Volumen von 22,4 Litern. Ein Mol Kohlendioxid, ebenfalls $6,022 \cdot 10^{23}$ Moleküle, hat auch ein Volumen von 22,4 Litern. Wenn nun Sauerstoff zu Kohlendioxid veratmet wird, ergibt sich keine direkte Änderung des Drucks. An dieser Stelle setzt die Rolle des Natriumhydroxids im Flaschenhals ein. Natriumhydroxid und Kohlendioxid reagieren chemisch zu Natriumcarbonat.



Damit wird das gebildete Kohlendioxid aus der Gasphase entfernt und durch die Veratmung von Sauerstoff entsteht ein meßbarer Unterdruck.

Die respirometrische Messung ist eine Druckmessung!

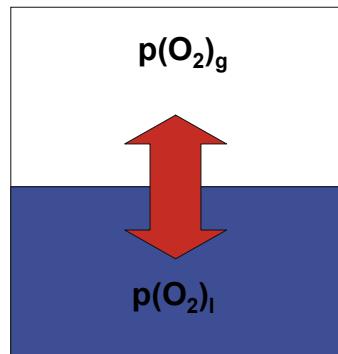
Der gemessene Unterdruck wird in den BSB-Wert mit folgender Formel umgerechnet.

$$\text{BSB} = \frac{M(\text{O}_2)}{R \cdot T_m} \cdot \left(\frac{V_{\text{ges}} - V_{\text{fl}}}{V_{\text{fl}}} + \alpha \frac{T_m}{T_0} \right) \cdot \Delta p(\text{O}_2)$$

| | |
|------------------------|--|
| $M(\text{O}_2)$ | Molekulargewicht Sauerstoff (32000mg/mol) |
| R | Gaskonstante (83,144 L·hPa/(mol·K)) |
| T_0 | Temperatur (273,15 K) |
| T_m | Meßtemperatur (293,15 K) beim BSB ₅ |
| V_{ges} | Flaschenvolumen [mL] |
| V_{fl} | Probenvolumen [mL] |
| α | Bunsenscher Absorptionskoeffizient (0,03103) |
| $\Delta p(\text{O}_2)$ | Differenz des Sauerstoffpartialdruckes [hPa] |

Der Vollständigkeit halber sei angefügt, daß die Formel aus dem Idealen Gasgesetz unter den Bedingungen einer zusätzlichen flüssigen Phase hergeleitet wurde.

Verbrauchen Mikroorganismen in der wäßrigen Phase Sauerstoff, wird Sauerstoff aus der Gasphase nachgeführt, da sich die Partialdrücke vorhandener Gase dauernd angleichen.



Für die respirometrische Messung ist der Sauerstoffpartialdruck von Bedeutung. Der Sauerstoffpartialdruck in der wäßrigen Phase ist gleich dem Sauerstoffpartialdruck innerhalb der Gasphase.

$$p(\text{O}_2)_l = p(\text{O}_2)_g$$

Um diesen Austausch zu beschleunigen und Sauerstoffmangel in der Meßprobe zu unterbinden, wird das Meßgut während der gesamten Meßdauer kräftig durchmischt.

Kurzanleitung für eine Messung mit dem OxiTop[®]-System

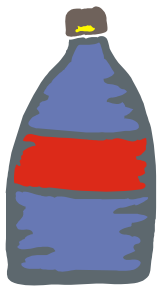
1. Meßbereich der zu untersuchenden Probe schätzen.
2. Vor dem Auffüllen des Überlaufmeßkolbens alle zusätzlichen Lösungen zugeben
3. Bei Bedarf Nitrifikationshemmstoff zugeben.
4. Wenn nötig die Probe ansimpfen (Achtung Blindwertbestimmung!).
5. Wenn nötig Nährstoff-, Mineralien- und Pufferlösungen zugeben (Achtung Blindwertbestimmung!).
6. Das gewählte Volumen der homogenisierten Probe mit Hilfe des Überlaufmeßkolbens entnehmen.
7. Mittels eines Trichters die Meßlösung in die Meßflasche überführen.
8. Ein Magnetrührstäbchen in die Flasche geben.
9. 2 Natriumhydroxid-Plätzchen in den Gummiköcher geben.
10. Gummiköcher in die Flasche einsetzen. (Proben, die mit Natriumhydroxid in Berührung gekommen sind, sind für die Messung nicht mehr einzusetzen.)
11. OxiTop[®]-Meßkopf handfest aufschrauben. Der Gummiköcher sorgt für die notwendige Dichtheit des Systems. (Kein Dichtfett benutzen!)
12. Messung am OxiTop[®] Kopf oder beim OxiTop[®]-C am Controller starten.
13. Meßflaschen für fünf Tage bei 20°C in den Inkubator stellen.
14. Auslesen der Ergebnisse nach fünf Tagen

Bestandteile des respirometrischen Meßsystems



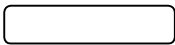
Überlaufmeßkolben

Die notwendigen, aber meist ungeraden Volumina für die Messung können damit leicht abgefüllt werden. Der zu erwartende Meßbereich der Probe bestimmt das einzusetzende Volumen. Die beiden am häufigsten benötigten Volumina sind 164mL und 432mL. Die eingesetzten Volumina sind so gewählt, daß die Faktoren zur Berechnung des BSB₅ geradzahlig sind.



Meßflasche

Es handelt sich um Braunglasflaschen mit Gewinde, deren Fassungsvermögen 510 mL beträgt. Braunglas verhindert eine mögliche Algenbildung. Um die Meßflasche dicht zu verschließen, reicht es, den OxiTop[®]-Meßkopf handfest zuzudrehen.



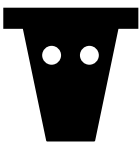
Magnetrührstäbchen

Die mitgelieferten und für die Flaschen ausgelegten Magnetrührstäbchen sind so beschaffen, daß sie die Probe optimal durchmischen. Kleinere, aber auch größere Rührstäbchen, oder auch solche anderer Form sorgen nicht unbedingt für ein komplettes Durchmischen der Probe.



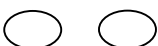
Nitrifikationshemmstoff

Die sogenannten Nitrifikanten (typischerweise Nitrosomonas und Nitrobacter) verbrauchen bei der Umwandlung des Ammoniums über Nitrit zu Nitrat ebenfalls Sauerstoff. Dieser Verbrauch zählt nicht zum BSB_n-Wert. Deshalb fügt man der Meßlösung einen Hemmstoff zu, der die Umwandlung von Ammonium zu Nitrat verhindert.



Gummiköcher

Der Gummiköcher erfüllt zwei Funktionen: er sorgt für den dichten Verschuß der Flasche beim Aufschrauben des OxiTop[®]-Meßkopfes und nimmt den Kohlendioxid-Absorber (Natriumhydroxid-Plätzchen) auf. **Der Gummiköcher darf dabei nicht gefettet werden. Bestimmte Dichtfette zerstören sogar den Kunststoff des Meßkopfes.**



Natriumhydroxid-Plätzchen

Natriumhydroxid-Plätzchen dienen als Kohlendioxidabsorber. Je Messung sind 1-3 Plätzchen NaOH einzusetzen. **Durch die Reaktion mit Kohlendioxid, bei der Wasser entsteht, und aufgrund der hygroskopischen (wasserziehenden) Eigenschaften von NaOH sind die Plätzchen nach der Messung feucht bzw. aufgelöst.**

OxiTop[®]-Meßköpfe

OxiTop[®]-Meßkopf zur manuellen Bedienung für die BSB₅-Messung



5 Meßwerte für 5 Tage

OxiTop[®]-Control Meßkopf zur detaillierten Betrachtung der Sauerstoffabbaukurve



x Meßwerte für y Tage

Rührplattform



Die Rührplattform gibt es in zwei Größen: mit sechs oder zwölf integrierten Rührstellen, auf denen separate elektromagnetische Wechselfelder erzeugt werden. Reißende oder durchrutschende Gummiantriebsriemen sind damit beim induktiven Rührsystem kein Thema mehr. Außerdem werden verrutschte oder „hängengebliebene“ Magnetührstäbchen wieder in die Flaschenmitte gezogen. Fehlmessungen durch mangelnden Sauerstoffaustausch zwischen wässriger Phase und Gasphase sind ausgeschlossen. Die Rührplattformen können in einer passenden Thermobox, in einem normalen Thermoschrank oder in einem thermostatisierten Raum betrieben werden.

Thermoboxen,- schränke

gewährleisten die notwendige Temperaturregelung auf $20,0 \pm 0,5 \text{ °C}$. Die Stromversorgung für die Rührplattformen ist in den Thermostaten installiert.



Thermoschrank TS



Thermobox

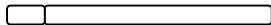
Diagrammbogen für BSB₅-Meßgeräte

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|---------|--|------|------|------|-------|---------|
| Zeichen od. Farbe | | rot | grün | gelb | blau | braun | schwarz |
| Einfüllvolumen | | | | | | | |
| Faktor | | | | | | | |
| Entnahmestelle | | | | | | | |
| Bemerkung zur Probe | | | | | | | |
| Datum | Uhrzeit | Ablesung (Abl.) x Multiplikationsfaktor (F) | | | | | |
| | Abl. | | | | | | |
| | x F | | | | | | |
| | Abl. | | | | | | |
| | x F | | | | | | |
| | Abl. | | | | | | |
| | x F | | | | | | |
| | Abl. | | | | | | |
| | x F | | | | | | |
| Mittelwertbildung der Endwerte gleicher Proben | | | | | | | |
| BSB ₅ | | | | | | | |
| Anlage : | Name : | Datum : | | | | | |

| BSB ₅ Meßbereich | Einfüllvolumen | Multiplikationsfaktor (F) |
|-----------------------------|----------------|---------------------------|
| 0 - 40 | 432 ml | 1 |
| 0 - 80 | 365 ml | 2 |
| 0 - 200 | 250 ml | 5 |
| 0 - 400 | 164 ml | 10 |
| 0 - 800 | 97 ml | 20 |
| 0 - 2000 | 43,5 ml | 50 |
| 0 - 4000 | 22,7 ml | 100 |

| Uhrzeit | 6 12 18 | 6 12 18 | 6 12 18 | 6 12 18 | 6 12 18 | 6 12 18 |
|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Tag | Meßbeginn | 1.Tag | 2.Tag | 3.Tag | 4.Tag | 5.Tag |

Auswertebogen
 In diesen Bogen werden die Einzelwerte einer manuellen Messung eingetragen und ausgewertet. (Dabei sind fünf Werte in fünf Tagen für die BSB₅-Bestimmung durchaus übersichtlich und ausreichend.)



Magnetrührstabentferner

Es handelt sich um einen beschichteten Stab, an dessen Ende ein Magnet integriert ist. Mit Hilfe dieses Magneten ist nach Beendigung der Messung das Magnetrührstäbchen einfach zu entfernen.



Markierungsringe

Die Markierungsringe dienen der besseren Zuordnung der Meßflaschen zur Probe. Sie sind mit Zahlen versehen und werden vor dem Aufschrauben des Meßkopfes über den Flaschenhals gezogen. (Beim OxiTop®-Control kann durch die automatische Probenverwaltung auf die Verwendung von Markierungsringen verzichtet werden.)

Welche Punkte sind bei jeder BSB_n Messung zu beachten?

Probenahme



Beginnt die Analyse innerhalb von 2 Stunden nach der Probenahme einer Stichprobe braucht die Probe nicht gekühlt aufbewahrt werden. Andernfalls muß die Probe unmittelbar nach ihrer Entnahme auf 4°C gekühlt werden.



Die Zeit bis zur Analyse darf 6 Stunden nicht übersteigen. Ist dies nicht möglich, müssen Dauer und Temperatur der Lagerung notiert werden. Die Lagerung darf längstens 24 Stunden dauern. Die Dauer einer Mischprobenahme ist auf 24 Stunden begrenzt. Während der Probenahme einer Mischprobe ist die Probe bei 4°C zu kühlen. Die Lagerung der Mischprobe ist analog zur Stichprobe.

Die Probenahme erfolgt mit einem sauberen trockenen Gefäß in ein sauberes und trockenes Gefäß. Ein Vorspülen des Probenahmegefäßes mit der Probelösung findet nicht statt. Das Volumen bei der Probenahme beträgt mindestens einen Liter. Die Probe sollte möglichst nicht eingefroren werden. Tiefgefrorene Proben resultieren in niedrigeren Meßwerten (bis 10%). Der Grund hierfür liegt wieder in der Tatsache begründet, daß ein biologischer Vorgang untersucht wird: Eis hat ein größeres Volumen als Wasser (deshalb schwimmen auch Eisberge!). Dadurch können bei tiefgefrorenen Zellen die Zellwände platzen und dementsprechend die Mikroorganismen geschädigt werden. Der BSB-Wert sinkt dadurch zwangsläufig.

Mischen und homogenisieren



Die Probe ist zu homogenisieren. Der Grund hierfür ist einleuchtend, wenn man sich eine abgesetzte Probe vorstellt. Der Bodensatz hätte dementsprechend einen zu hohen BSB, der Überstand einen zu niedrigen. Bleibt die Frage nach der Art und Weise des Homogenisierens. Die Verwendung eines Aufschlaggeräts ist nur dann zu empfehlen, wenn die Feststoffpartikel sehr grob sind. Durch das Aufschlagen werden Flocken zerstört und die Mikroorganismen können geschädigt werden. Schonender ist ein mechanisches Rühren bzw. ein Magnetrührer mit einem Rührfisch.

Beim Homogenisieren mit Hilfe eines Aufschlaggerätes bei 20000 U/min muß sich der Anwender die Auswirkung dieses Vorgangs bewußt machen. Leichtflüchtige Stoffe können auf diese Weise ausgetrieben werden und Schlammflocken werden zerstört. Haben diese Auswirkungen keinen Einfluß auf die Aussage des Ergebnisses, ist das Homogenisieren mit einem Aufschlaggerät anwendbar.

Die Entnahme des für die Messung erforderlichen Volumens sollte unter Rühren mit einem oder in einen Überlaufmeßkolben geschehen. Die Feststoffpartikelchen müssen gleichmäßig in der Probe verteilt sein. Dabei ist es von Vorteil, wenn während des Einmessens nur so stark gerührt wird, daß kein Absetzen der Feststoffe stattfindet.

Die Probe in der BSB-Flasche muß eine identische Zusammensetzung wie die Originalprobe besitzen.

Wenn Meßzylinder verwendet werden, besteht die Gefahr, daß sich beim Einmessen der Probe Feststoffpartikelchen absetzen

Pipetten sollte man ebenfalls nicht verwendet. Durch die dünne Spitze können Flocken angesaugt werden, die sich in der Öffnung festsetzen und dort wie ein Filter wirken. Die Messung einer derartigen Probe würde zwangsläufig zu Unterbefunden führen.

Ein Punkt, der in diesem Zusammenhang ebenfalls angesprochen werden muß, ist die Filtration. Bis auf wenige Ausnahmen im Bereich der Teichkläranlagen, die von Algenwachstum betroffen sein können, findet keine Filtration der Proben statt.

BSB Proben werden in der Regel nicht filtriert!

Durch ein Filtrieren der Probe würden ungelöste Bestandteile, die natürlich auch einen BSB besitzen, entfernt. Die Messung würde zu Minderbefunden führen.

Temperieren



Die Probe und das eventuell einzusetzende Verdünnungswasser müssen vor der Verdünnung und vor dem Umfüllen in die Meßflasche auf die gewünschte Temperatur $\pm 1^\circ\text{C}$ gebracht werden. Jede Probe, die irgendwann eine Temperatur $>50^\circ\text{C}$ hatte, muß mit einer ausreichenden Zahl Bakterien angeimpft werden. Die Temperatur während einer BSB_n -Messung sollte über den gesamten Meßzeitraum auf $\pm 1^\circ\text{C}$ konstant gehalten werden.

Das OxiTop[®] verfügt über eine eingebaute AutoTemp-Funktion. Es reicht aus, die Probe vor der Entnahme der Meßprobe auf $15 - 21^\circ\text{C}$ zu temperieren. Auf diesen Punkt wird an späterer Stelle noch separat eingegangen.

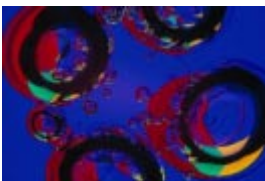
Sauerstoffkonzentration



Die Anfangskonzentration des Sauerstoffs in der Meßlösung wird unmittelbar vor dem Meßstart eingestellt. Dies geschieht am besten und einfachsten durch Schütteln der Probe oder durch Belüften mit sauberer gefilterter Druckluft. Die Meßprobe muß sauerstoffgesättigt sein, damit während der Messung, also während der nächsten fünf Tage, die Sauerstoffkonzentration nicht der begrenzende Faktor wird. Ansonsten geht den Bakterien im wahrsten Sinne des Wortes die Luft aus und ihre Abbauleistung fällt. Falls im Laufe der Messung nicht mehr ausreichend Sauerstoff vorhanden ist, muß das Meßergebnis verworfen werden. Der aerobe Abbauprozess, der untersucht werden soll, findet nicht mehr statt.

Für die Anwendung in der Abwasseranalytik hat sich das Sauerstoffsättigen durch ca. 15-minütiges Schütteln der Probe als sinnvoll herausgestellt. Dieses Verfahren setzt die Sauerstoffkonzentration sehr einfach und schnell bis zur Sättigung herauf. Die Flasche, in der die Probe genommen wurde, darf bei diesem Vorgang nicht mehr ganz gefüllt sein. Dadurch ist gewährleistet, daß die Probe mit ausreichend Luft in Berührung kommt und daß die Probe gleichzeitig schonend homogenisiert wird. Viele Abwasserproben sind durch ständigen Luftkontakt (offene Gerinne) allerdings schon von Haus aus sauerstoffgesättigt.

Nitrifikationshemmstoff

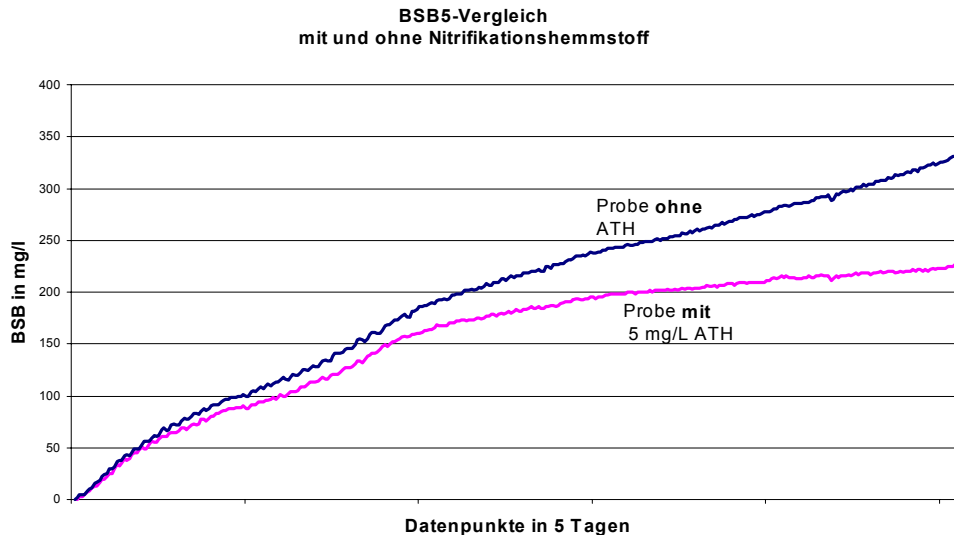


Die Oxidation des Stickstoffs von Ammonium zu Nitrat durch bestimmte Bakterien ist die Nitrifikation. Bei diesem biologischen Prozeß wird ebenfalls Sauerstoff gebunden, wie auch leicht an den Formeln für Ammonium (NH_4^+) und Nitrat (NO_3^-) erkennbar ist. Der hierzu benötigte Sauerstoff ist kein Bestandteil des BSB_n!

Unterdrücken kann man diese parallele biochemische Reaktion durch die Zugabe von Nitrifikationshemmstoff. Dabei handelt es sich in der Regel um Allylthioharnstoff (ATH) oder um 2-Chloro-6-(trichloromethyl)-pyridin (TCMP). Der Nitrifikationshemmstoff blockiert bzw. vergiftet gezielt die Bakterien, die für den Abbau des Ammoniums verantwortlich sind, ohne aber Mikroorganismen, die Kohlenstoffverbindungen abbauen (BSB!), zu schädigen.

Bislang galt die Faustregel, daß Nitrifikationshemmstoff nur bei Ablaufmessungen verwendet wird. Es empfiehlt sich aber auch bei Zulaufmessungen eine Nitrifikation durch entsprechende Zugabe sicher ausschließen zu können, denn es kann durchaus vorkommen, daß Nitrifikanten im Abwasser des Kläranlagenzulaufs vorhanden sind.

Welche Auswirkung das Zugeben oder Weglassen des Nitrifikationshemmstoffs haben kann, zeigt die unten abgebildete Auswertung einer realen Probe aus dem Ablauf einer Vorklärung.



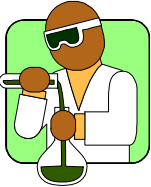
Deutlich wird hier der Einfluß des Nitrifikationshemmstoffs. Er unterdrückt das Miterfassen der Nitrifikationsprozesse.

Der besondere Tip und zur Wiederholung:

Treten unplausible BSB-Ergebnisse auf, empfiehlt es sich den Nitrifikationshemmstoff zu prüfen. Unplausible Ergebnisse heißt zu hohe BSB Werte, z.B. in der Größenordnung des CSB oder sogar höher. Der BSB kann den CSB aber nicht übersteigen, da der chemische Sauerstoffbedarf den biochemischen Sauerstoffbedarf mit einschließt. Zur Verwendung des Nitrifikationshemmstoffs sollte man mehrere Punkte beachten:

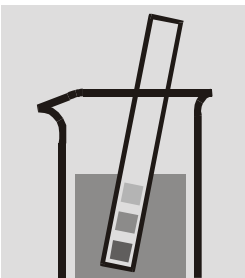
- Die Konzentration des Allylthioharnstoffs in der Probe soll 5 mg/L betragen
- Werden käuflich erhältliche ATH-Lösungen verwendet, ist die Dosierung zu beachten. Der WTW NTH-600 hat eine Konzentration von 5 g/L. Dementsprechend gibt man 20 Tropfen pro Liter Probe zu.
- Auch ATH-Lösungen haben ein Haltbarkeitsdatum. Lösungen, die zu alt sind, haben ihre Wirkung meist verloren.
- Der ATH sollte dunkel (deshalb besteht die NTH 600 Flasche aus schwarzem, lichtundurchlässigem Kunststoff) und wenn möglich kühl gelagert werden.

Welche Punkte sind eventuell bei einer Messung zu beachten?



Häusliche Abwässer können im Regelfall ohne wesentliche Vorbehandlung für die Messungen verwendet werden. **Zu beachten sind aber immer die im vorigen Abschnitt angesprochenen Punkte!** Anders sieht es z.B. bei Industrieabwasser oder hochbelastetem Abwasser aus. Damit das Ergebnis nicht verfälscht wird, müssen in Abhängigkeit der Probe einige mögliche Störeinflüsse beachtet und gegebenenfalls beseitigt werden. Hierzu sei auch auf die entsprechenden WTW-Applikationsberichte verwiesen.

Neutralisation



Die Probe sollte einen neutralen pH-Wert zwischen 6.6 und 7.2 aufweisen.

Das Einstellen des pH-Wertes kann mittels Schwefelsäure oder Natronlauge erfolgen (Anhang R7 und R8).

Mikroorganismen sind stets an einen bestimmten Lebensraum angepaßt. Zum Überleben brauchen sie ein Milieu, das ihrer Spezies entspricht. Unabdingbar hierfür ist ein angepaßter pH-Bereich innerhalb der Probe. In der biologischen Abwasserreinigung entspricht dies einem pH-Bereich zwischen 6.6 und 7.2.

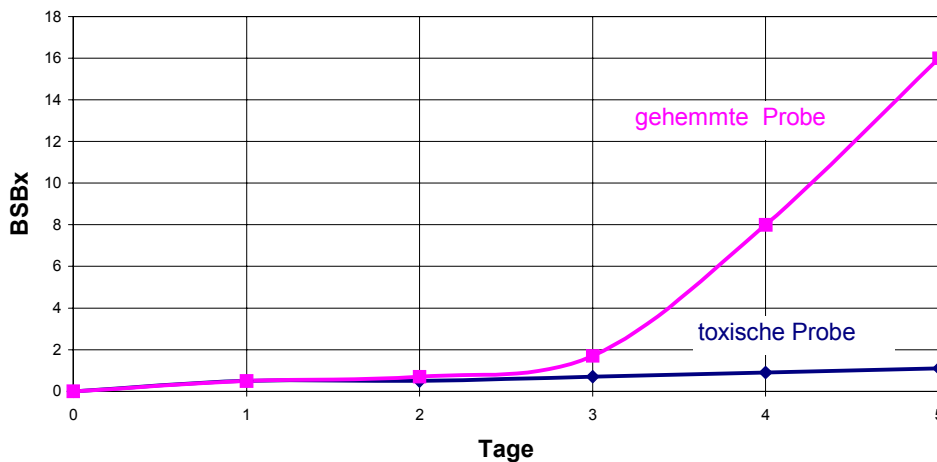
Hemmende und toxische Inhaltsstoffe



Enthält eine Probe hemmende und/oder toxische Stoffe wie Phenole, Schwermetalle, Cyanverbindungen in hohen Konzentrationen, müssen die Proben speziell betrachtet und bearbeitet werden.

Die Sauerstoffabbaukurven bei gehemmten und/oder toxisch belasteten Proben sind stark verzögert. In einigen Fällen ist nur in den ersten Tagen so gut wie kein Sauerstoffabbau zu beobachten, in anderen Fällen ist der Abbau über den gesamten Prüfzeitraum vermindert.

Abbaukurve bei gehemmten und/oder toxischen Inhaltsstoffen



Mikroorganismen reagieren unterschiedlich heftig auf Schadstoffkonzentrationen. Deren Wirkung kann durch Verdünnung der Probe vermindert oder sogar aufgehoben werden. Hierzu sind verschiedene Verdünnungen anzusetzen. Ergeben zwei aufeinander folgende Verdünnungen den gleichen BSB-Wert, ist die Wirkung des toxischen Stoffes aufgehoben (Blindwertbestimmung nicht vergessen).

Gehemmte, wie auch desinfizierte Proben haben keine Sauerstoffzehrung. Durch entsprechende Maßnahmen wird ein BSB_n -Wert generiert. Darüber hinaus kann lediglich eine Aussage über die Toxizität und die Abbaubarkeit getroffen werden.



Die Konzentration der hemmenden oder toxischen Substanzen kann mit den entsprechenden photometrischen Testsätzen ermittelt werden.

Chlor oder andere bakterientötende Wirkstoffe

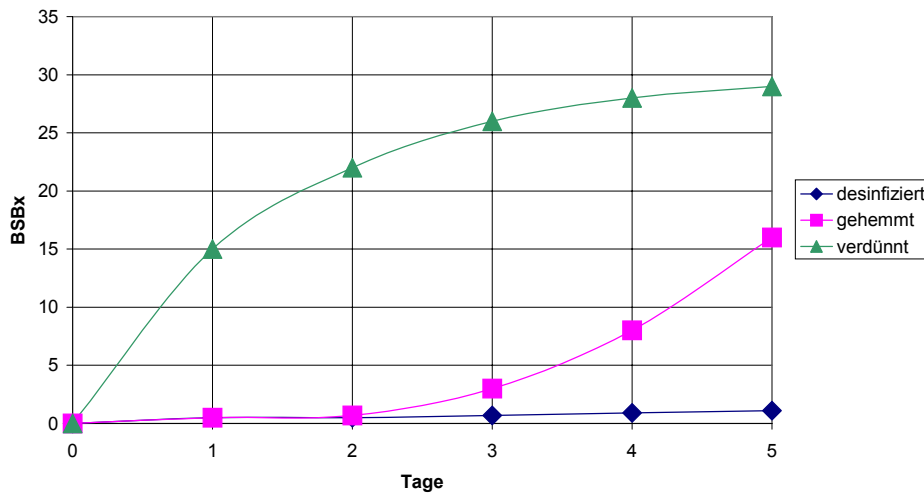


Proben, die Chlor oder andere bakterientötende Wirkstoffe enthalten, sollten vermieden werden, z.B. durch die Probenahme vor einem Chlorierungsprozeß. Vorhandenes Chlor kann durch etwa einstündiges Ausblasen mit sauberer gefilterter Druckluft oder durch 1-2 stündiges Stehenlassen an Licht entfernt werden. Reichen diese Maßnahmen nicht aus, ist der Chlorgehalt zu bestimmen, auf die Probe umzurechnen und der Probe eine adäquate Menge Natriumsulfit-Lösung zuzugeben.

Chlor oder andere desinfizierende Stoffe werden eingesetzt, um Bakterien zu töten. Diese Wirkung bleibt auch im Abwasser erhalten. Mit einer BSB_n -Messung kann dann lediglich eine Aussage über die Toxizität getroffen werden, z.B. um eine Entscheidungsgrundlage für die Verdünnungsverhältnisse zu erhalten, in welchem das belastete Wasser der Abwasserreinigungsanlage zugeführt werden kann. Feststellen

kann man so unter anderem, ob ein hergestelltes Desinfektionsmittel seine Aufgabe erfüllt, oder wie lange eine Substanz Bestand hat, wenn sie biologischen Abbauprozessen ausgesetzt ist. Nur am Rande erwähnt seien Messungen der biologischen Abbaubarkeit, eine zusätzliche Applikation des OxiTop[®]-Meßsystems. Außerdem kann man auf diese Weise für genau umrissene Problemstellungen adaptierte Mikrobiologie züchten.

Abbaukurven von desinfizierten, gehemten und verdünnten Proben



Proben, die Chlor oder andere bakterientötende Stoffe enthalten, haben keine Sauerstoffzehrung. Durch Verdünnung und anschließendes Animpfen mit Bakterien kann hier dennoch ein BSB_n -Wert gemessen werden.

Probenverdünnung

Die Probenverdünnung wird dann notwendig, wenn wie soeben angesprochen, die Konzentration von toxischen oder hemmenden Substanzen erniedrigt werden muß, oder wenn der BSB-Wert der Probe über der Meßbereichsobergrenze liegt (einige 1000 mg/L BSB). Die Herstellung des Verdünnungswassers muß dabei unter bestimmten Gesichtspunkten, die im folgenden aufgeführt sind, geschehen. **Im wesentlichen kann man zum Ansatz des Verdünnungswassers auch auf die gesetzlichen Normen und Verordnungen zurückgreifen (z.B. DIN EN 1899-1, DIN 38409 H 51 oder Standard Methods 5210 D).** In jedem Fall muß auch der BSB des Verdünnungswassers bestimmt werden (vgl. Applikationsberichte). Der zu erwartende BSB_n -Wert bestimmt das notwendige Probevolumen. Dem Verdünnungswasser sind in der Regel Pufferlösungen, Nährstoffe, Mineralien und Nitrifikationshemmstoff zugesetzt. Ebenso auch Animpfmateriale, welches aus intakter und adaptierter Mikrobiologie besteht. Die folgenden Angaben für die verwendeten Reagenzien und deren Konzentrationen beziehen sich auf die *Standard Methods 5210 D*. Hiervon abweichende Zusammensetzungen sind je nach speziellem Bedarf durchaus denkbar.

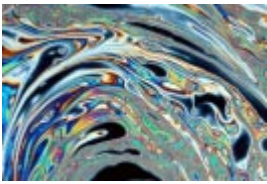
Wasser



Zur Probenverdünnung kann Wasser unterschiedlicher, aber geeigneter Herkunft verwendet werden, z.B. Flußwasser ohne organische Anteile, Trinkwasser oder destilliertes Wasser (Anhang A) mit Zusätzen an verschiedenen Salzen und Nährstoffen. **Trinkwasser muß chlorfrei sein bzw. durch ausreichendes Belüften mit Druckluft chlorfrei gemacht werden.**

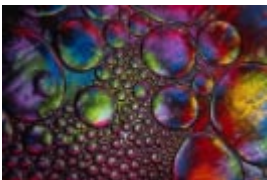
Reines destilliertes Wasser ohne Elektrolytzusätze (vgl. Verdünnungs-BSB) schädigt die Zelle aufgrund osmotischer Vorgänge. Im Inneren der Zelle befindet sich ein hoher Gehalt an Elektrolyten, d.h. an gelösten Stoffen. Weil destilliertes Wasser keinen Elektrolytgehalt hat und dieses System nach einem Konzentrationsausgleich strebt, diffundiert ständig Wasser durch die Zellwand ins Innere der Zelle. Die Zelle bläht sich auf wie ein Luftballon und platzt irgendwann.

Nährstoffe und Pufferlösungen



Nährstoffe, wie Stickstoff (N) und Phosphor (P) müssen in ausreichender Menge vorhanden sein. Hierbei hält man sich an das C:N:P-Verhältnis 100:5:1 oder an das TOC(\Rightarrow total organic carbon):N:P-Verhältnis 30:5:1. Es kann z.B. notwendig sein, eine entsprechende Menge Ammoniumchlorid-Lösung (Anhang R2) zuzusetzen.

Ist das C:N:P-Verhältnis gestört, wirkt der unterrepräsentierte Stoff limitierend. Auch in einer Abwasserreinigungsanlage macht es sich drastisch bemerkbar, wenn das C:N:P-Verhältnis stark gestört ist. Das Auftreten von Schwimm- oder Blähschlamm ist begünstigt; das Schlammalter verändert sich; die gesamte Abbauleistung der Anlage sinkt!!!



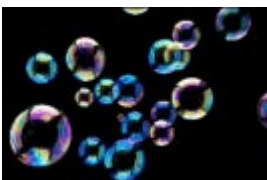
Der Phosphorbedarf kann durch Phosphatpufferlösung (Anhang R1) gedeckt werden. Pro 50 mg/L CSB der verdünnten Probe wird 1 mL Phosphat-Pufferlösung zugegeben.



Achtung: Die Toxizität von Proben mit Metallsalzen kann durch Phosphatpufferlösungen verringert werden, weil Phosphatkomplexe die Konzentration der Metallionen erniedrigen können.

Der Einsatz von Phosphatpufferlösung sollte bei hemmenden oder toxischen Proben mit Vorsicht geschehen. Da in der großtechnischen Abwasserreinigung keine Phosphatpufferlösungen zugegeben werden, kann es zu Fehleinschätzungen über die tatsächliche biologische Abbaubarkeit der Wasserprobe kommen.

Mineralien und Spurenelemente



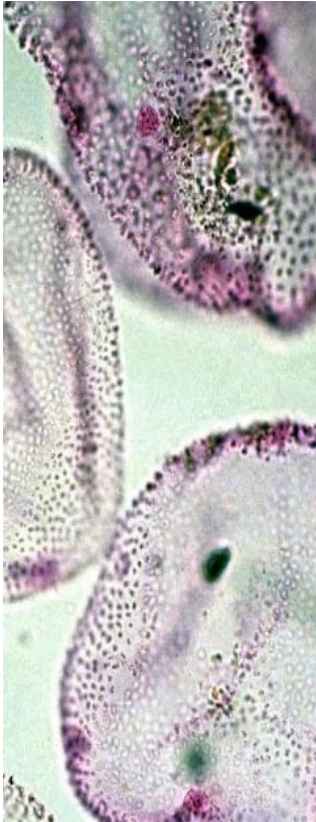
Sind ausreichende Mineralstoffmengen in der Probelösung nicht vorhanden, setzt man auf einen Liter Verdünnung je 2 mL einer Calcium-, Magnesium-, Eisen- und Spurenelemente-Lösung (Anhang R3, R4, R5 und R12) zu.

Sind keine oder zu wenige Mineralien und Spurenelemente in der Probe vorhanden, müssen diese zugegeben werden. Denn genau wie bei den Nährstoffen hemmt der unterrepräsentierte Stoff einen kompletten Abbau der eingetragenen Stoffe.

Solche Limitierungen führen zu Meßwertverfälschungen. Sie täuschen die Nichtabbaubarkeit einer Probe vor, obwohl die Abbaubarkeit bei einer ausreichenden Menge an Mineralien und Spurenelementen gegeben wäre. Auch hier läßt sich

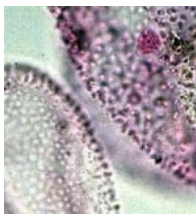
wiederm ein Vergleich zum Menschen ziehen, für den ein Mangel an Spurenelementen zu den unterschiedlichsten Mangelerkrankungen führt.

Animpfmaterial



Einige Proben enthalten nicht die notwendige Anzahl an Mikroorganismen (zum Beispiel Industrieabwässer, desinfiziertes Wasser, hochtemperiertes Abwasser oder Wässer mit extremen pH-Werten und anderes). Durch Animpfen der Proben ist für die Anwesenheit genügender, einsatzfähiger Mikroorganismen gesorgt (Anhang R15). Vorzugsweise ist adaptiertes Animpfmaterial, wie der Zulauf der biologischen Reinigungsstufe einer Abwasserreinigungsanlage einzusetzen. er erhalten. Mit einer BSBn-Messung kann dann unter normalen Umständen von Mikroorganismen aus häuslichem Abwasser nicht abgebaut werden. Solche Proben sind mit adaptierter Mikrobiologie anzupfen. Möglich ist auch der Einsatz eines aktivierten Schlammes, einer käuflichen Animpfmischung oder Mikroorganismen aus Bodeneluat, um die benötigte Mikrobiologie zu erhalten. Ist diese nicht zu bekommen, ist ein eigenes adaptiertes Animpfmaterial zu züchten, indem Mikroorganismen mit dem Problemstoff zunächst in geringer Konzentration zusammengebracht werden. Nach und nach wird die Konzentration des Problemstoffes gesteigert. Der BSB-Wert wird immer wieder gemessen. Steigt die Abbaurate mit zunehmender Adaptionszeit auf ein stabiles Niveau, spricht dies für eine erfolgreiche Adaption des Animpfmaterials.

Es hat sich gezeigt, daß zum Animpfen eines Testabwassers am besten Abwasser aus dem abgesetzten Zulauf zur biologischen Reinigungsstufe einer Kläranlage geeignet ist. Adaptiertes Animpfmaterial erhält man am einfachsten aus der Kläranlage, die das Testabwasser normalerweise reinigt.



Haushaltsabwasser

Bei Proben aus Haushaltsabwässern benötigt man in der Regel keine Animpfung mit Bakterien. Sie sind direkt als Meßlösung einzusetzen.

Meist sind in kommunalen Abwässern ausreichende Nährstoffe, Mineralien und Spurenelemente zum optimalen Abbau der Kohlenstoffverbindungen vorhanden. Andernfalls muß der Kläranlagenbetreiber über geeignete Maßnahmen wie z.B. eine Dosierung einzelner Stoffe in ausreichender Menge nachdenken.



Organisch hochbelastete Abwässer

Bei Proben aus der Lebensmittelindustrie handelt es sich häufig um organisch hochbelastete Abwässer. Das Animpfen spielt hier in den meisten Fällen keine Rolle. Viel wichtiger ist die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen.

Bei dieser Art Abwässer sind häufig die Nährstoffe die limitierenden Stoffe.

Messung

Abschätzen des zu erwartenden BSB-Werts

Um den richtigen Meßbereich für eine Bestimmung zu wählen, schätzt man den BSB_n - Wert vor der Analyse ab. Der Sauerstoffgehalt in der Flasche darf auf keinen Fall der limitierende Faktor sein. Beschränkend für eine BSB-Messung ist der Gehalt an biologisch abbaubaren Kohlenstoffen, der bestimmt werden soll! Man begegnet dem, indem man für eine Probe mit hohem BSB-Wert wenig Probenvolumen in die Flasche gibt und dementsprechend eine große Menge Sauerstoff in der Gasphase zur Verfügung hat. Für Proben mit niedrigem BSB kann man eine große Probenmenge nehmen, um die Auflösung zu erhöhen. Der Sauerstoffgehalt der kleinen Gasphase reicht aus.



Zum Abschätzen des Meßbereiches muß der ungefähre BSB-Wert der Probe bekannt sein.

Gibt es keine Erfahrungswerte, gilt annähernd

$BSB\text{-Wert} = \frac{1}{2} \times CSB\text{-Wert}$.

Dieser Faktor kann bei hoher organischer Belastung auch bis nahe 1 steigen.

Anhand des Schätzwertes ist das benötigte Probenvolumen nach folgender Tabelle zu wählen.

Befindet sich der Schätzwert außerhalb der angegebenen Meßbereiche oder soll ein größeres Volumen eingesetzt werden, ist die Probe zu verdünnen.

| Erwarteter BSB-Wert [mg/L] | Einzusetzende Probenmenge [mL] | Faktor (*) |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------|
| 0 – 40 | 432 | 1 |
| 0 – 80 | 365 | 2 |
| 0 – 200 | 250 | 5 |
| 0 – 400 | 164 | 10 |
| 0 – 800 | 97 | 20 |
| 0 – 2000 | 43,5 | 50 |
| 0 – 4000 | 22,7 | 100 |

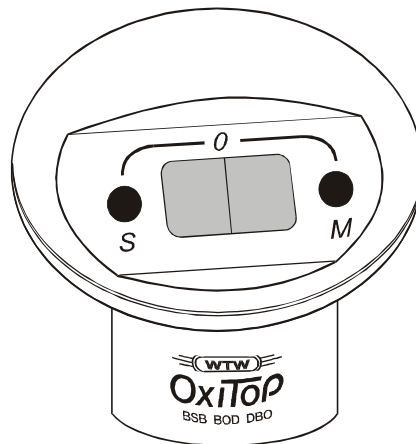
(*) Beim OxiTop®-Control Meßsystem müssen diese Faktoren nicht berücksichtigt werden, da das Ergebnis in mg/L BSB bereits vom Controller direkt ausgegeben wird.

AutoTemp-Funktion

Der Wasserdampfpartialdruck und der Partialdruck der trockenen Luft sind temperaturabhängig.

Dieser komplizierte Sachverhalt wirkt sich einfach und auch verständlich folgendermaßen aus:

Proben mit einer Temperatur unter 20°C dehnen sich beim Erwärmen aus. In einer geschlossenen Flasche mit einer zusätzlichen Gasphase muß damit der Druck ansteigen. Das Abkühlen von Proben über 20°C führt zu einer entsprechenden Volumenkontraktion und damit zu einem Unterdruck. Quecksilberrespirometer bleiben deshalb eine Stunde geöffnet, und die Probe muß auf 19-21°C vorthermostatisiert sein. Bei den OxiTop®-Systemen mit AutoTemp-Funktion übernimmt der Meßkopf die Kontrolle der Temperaturanpassung. **Beim OxiTop® mit AutoTemp-Funktion ist ein sofortiges Verschließen der Meßflasche und Starten der Messung möglich, wenn die Probentemperatur zwischen 15 und 21°C beträgt.**



Funktionsweise:

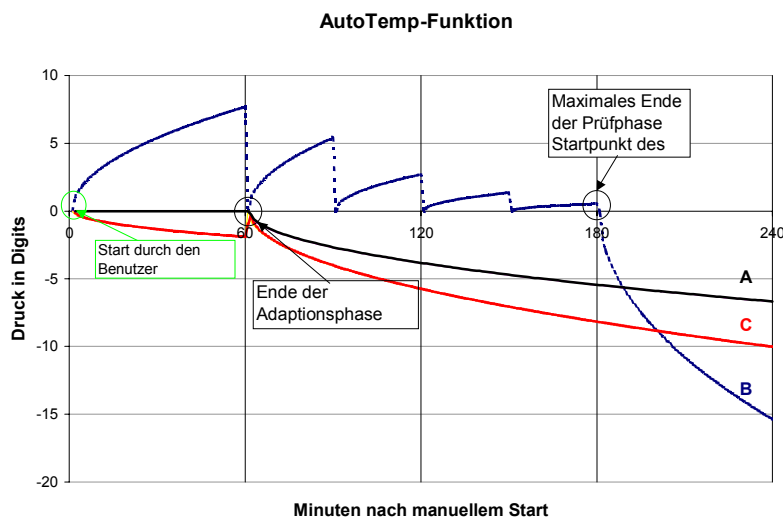
Die von WTW patentrechtlich geschützte AutoTemp-Funktion setzt sich aus der Adaptions- und der Prüfphase zusammen. Sie wird nach dem Start automatisch aktiviert:

Die Adaptionsphase ist eine Phase ohne Bewertung des Druckverlaufs (60 min). Die Mikrobiologie kann sich adaptieren und kleinere Temperaturabweichungen $\pm 1^\circ\text{C}$ können ausgeglichen werden. Außerdem kann sich das Wasserdampfsättigungsgleichgewicht einstellen. Nach Ablauf der Adaptionsphase wird das Meßsystem in jedem Falle genullt.

In der folgenden Prüfphase kann der verbleibende Rest einer Temperaturabweichung bei zu niedriger Temperatur der Probe kompensiert werden.

Nach einem gewissen Zeitintervall, das von der Gesamtmeßdauer abhängt und für die BSB₅ Messung bei 30 Minuten liegt, findet eine erneute Druckmessung statt. Ist der Druck gefallen, hat die Probe eine Temperatur von 20°C und der BSB-Prozeß wird meßbar. Das OxiTop® beginnt die Messung und verwendet dies als ersten Wert. Ist der Druck jedoch angestiegen, war die Probe noch nicht thermostatisiert ($< 20^\circ\text{C}$) und das System wird erneut auf „Null“ gesetzt. Dies wiederholt sich, bis die Druckmessung einen konstanten Druck oder eine Druckabnahme registriert.

Graphisch stellt sich dies folgendermaßen dar:



Kurve A:

Die Probe ist temperiert (19-21°C). **Optimaler Bereich.**

Kurve B:

Die Anpassung dauert sehr lange. Die eingesetzte Meßlösung ist zu kalt

($\leq 15^\circ\text{C}$) **(Fehlmesung!)**.

Kurve C:

Die eingesetzte Probe ist zu warm. ($\geq 21^\circ\text{C}$). Der Druckabfall resultiert aus der Überlagerung von „BSB“ und Volumenkontraktion **(Fehlmesung!)**

Für die Messung darf die Startphase nicht länger als 3% der eigentlichen Meßdauer betragen. Aus diesem Grund startet das OxiTop[®]-System für die BSB₅-Bestimmung spätestens nach drei Stunden. Deshalb darf die eingefüllte Meßprobe nicht weniger als 15°C haben, da sonst die Zeit für eine Temperaturanpassung nicht ausreichend ist.

Der besondere Tip und zur Wiederholung:

Das OxiTop[®]-System kann zwischen Unterdruck aus der BSB-Messung und Überdruck aus der Temperaturerhöhung unterscheiden. Aber nicht zwischen Unterdruck resultierend aus den BSB-Prozessen und Unterdruck aus der Temperaturerniedrigung! Deshalb darf die Probe nicht wärmer als 21 °C sein. Ein Grad Celsius Temperaturanpassung kann während der Adaptionphase ohne Probleme bewältigt werden.

Wenn die Meßprobe mehr als 21°C hat, führt das zu einem Überbefund des BSB-Werts!

Falls die Probe unter 15°C hat, ist die maximal zulässige Startphase zeitlich nicht mehr ausreichend. Die Messung muß gestartet werden, der BSB-Wert ist mit einem Minderbefund behaftet.

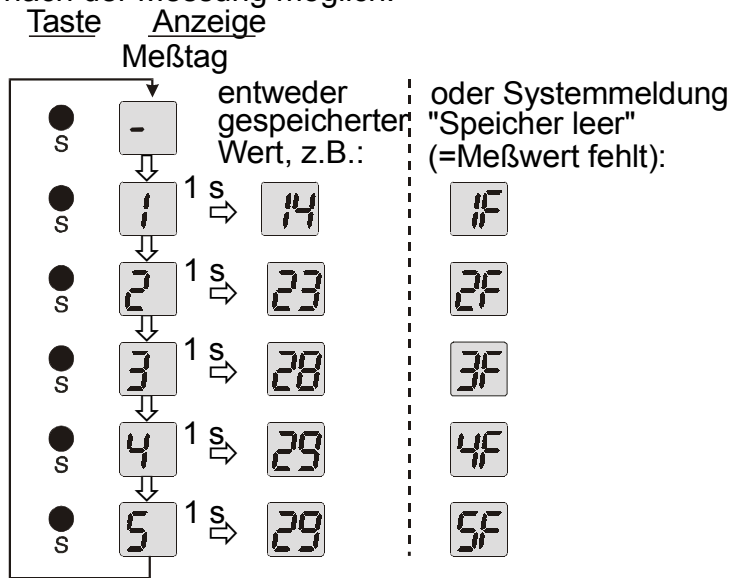
Auswertung der Messung

OxiTop®-System

(Hinweis: Das OxiTop®-Control System wird im Anschluß behandelt)

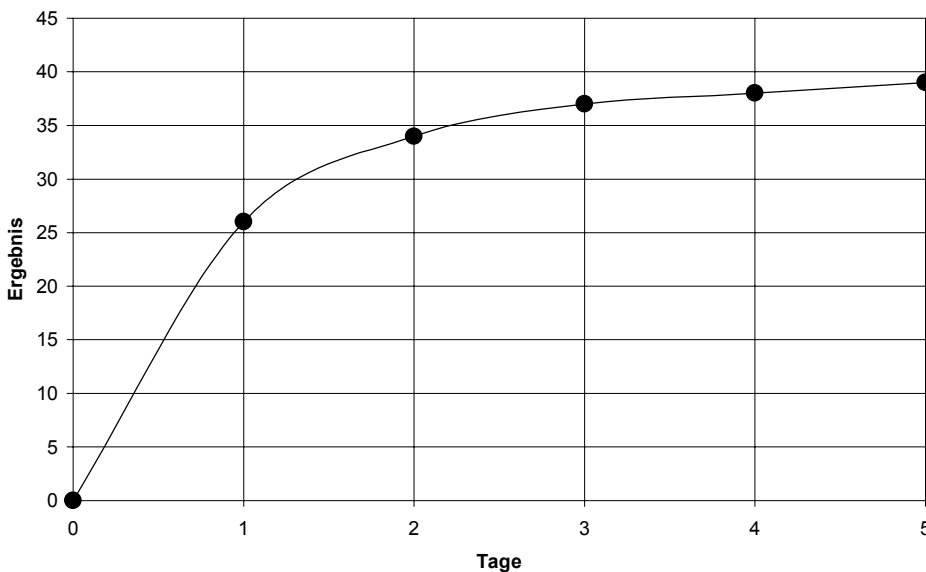
Automatische Meßwertspeicherung

Ausgehend vom Startzeitpunkt der Messung, speichert das OxiTop® automatisch alle 24 Stunden einen Wert. Die einzelnen Meßwerte sind durch das Betätigen der Drucktaste „S“ abzurufen. Hierbei erscheint zunächst die Nummer des Meßwerts, die dem Tag entspricht (1-5), und anschließend der gespeicherte Wert. Dies ist sowohl während als auch nach der Messung möglich.



Die Werte bleiben bis zu einem Neustart des Meßkopfes gespeichert. Auf diese Weise ist die tägliche Aufzeichnung der Werte, vor allem am Wochenende, überflüssig.

BSB-Kurve aus Einzelmessungen



Messergebnisse

Bei der BSB₅-Bestimmung mit dem OxiTop[®]-Meßsystem wird alle 24 Stunden ein Wert gespeichert. Die Anzeige ist in Digit. Die Umrechnung in tatsächliche BSB-Werte erfolgt durch Multiplikation mit Faktoren und damit unter Berücksichtigung der Füllvolumina. Nach 5 Tagen sind 5 Werte gespeichert. Eingetragen in einen Auswertbogen oder auf Millimeterpapier geben sie die Sauerstoffabbaukurve der Probe wieder. Der fünfte Wert ist der gesuchte BSB₅-Wert.

Die grafische Auswertung hat den Vorteil, die Art der Zehrung leichter erkennen zu können. Es ist häufig schon aus den fünf täglichen Werten ersichtlich, ob z.B. eine Hemmung oder Nitrifikation bei der Messung der Probe vorlag.

Der notwendige Faktor errechnet sich entsprechend der BSB-Formel:

$$BSB = \frac{M(O_2)}{R \cdot T_m} \cdot \left(\frac{V_{ges} - V_{fl}}{V_{fl}} + \alpha \frac{T_m}{T_0} \right) \cdot \Delta p(O_2)$$

| | |
|---------------------|---|
| M(O ₂) | Molekulargewicht Sauerstoff (32000mg/mol) |
| R | Gaskonstante (83,144 L·mbar/mol·K) |
| T ₀ | Referenztemperatur (273,15 K) |
| T _m | Meßtemperatur (293,15 K) |
| V _{ges} | Flaschenvolumen (Nennvolumen) [mL] |
| V _{fl} | Probenvolumen [mL] |
| α | Bunsenscher Absorptionskoeffizient (0,03103) |
| Δp(O ₂) | Differenz des Sauerstoffpartialdruckes [hPa] |

Um mit geradzahligem Multiplikationsfaktoren rechnen zu können, wurden die Ausgangsvolumina an die oben erwähnte Formel angepaßt. Das ist einzig und allein der Grund für die doch recht ungewöhnlichen Volumina von 432 mL, 365 mL, usw.

An dieser Stelle sollte man nochmals das Meßprinzip ansprechen. Das OxiTop[®] mißt die Druckdifferenz und berechnet entsprechend obiger Formel den BSB.

Damit müssen die experimentellen Verhältnisse den Voraussetzungen der Formel entsprechen!

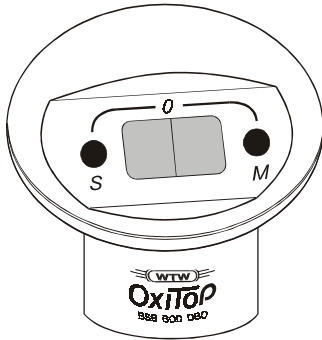
Das heißt, das Flaschenvolumen muß 510 mL betragen, ein zulässiges Füllvolumen (432 mL, 365 mL, 250 mL...) muß verwendet werden und die Meßtemperatur muß 20°C sein.

Falls dies nicht der Fall ist, wird zwangsläufig ein falscher BSB-Wert berechnet.

Für Anwendungen, die über Routinebestimmungen hinaus gehen, gibt es beim OC 110-Controller den Modus „BSB-Spezial“. In diesem Modus sind diese Parameter als Variablen belegt und man kann unterschiedliche Werte explizit eingeben, z. B. eine Messung bei 27°C in einer 1000 mL Flasche mit 277 mL Füllvolumen. Der Controller rechnet dann mit eben diesen Werten.

Manuelle Meßwertabfrage

Um die Art und Weise der Zehrung, mögliche Hemmungen oder Nitrifikation besser und auch schneller erkennen zu können, empfiehlt es sich, gerade am Anfang einer Messung häufiger Einzelmeßwerte zu bestimmen. Zu jedem Zeitpunkt während der Messung ist der aktuelle Meßwert durch das Betätigen der Drucktaste „M“ abrufbar.



Messung starten:

● und ● gleichzeitig drücken:
S M

-- 2 s → 00 Löschen
gespeicherter
Werte

Aktueller Meßwert:

● 1 s drücken: z.B. 38
M

Gespeicherte Meßwerte:

● 1 s drücken
S (s. Abschnitt "Messung")

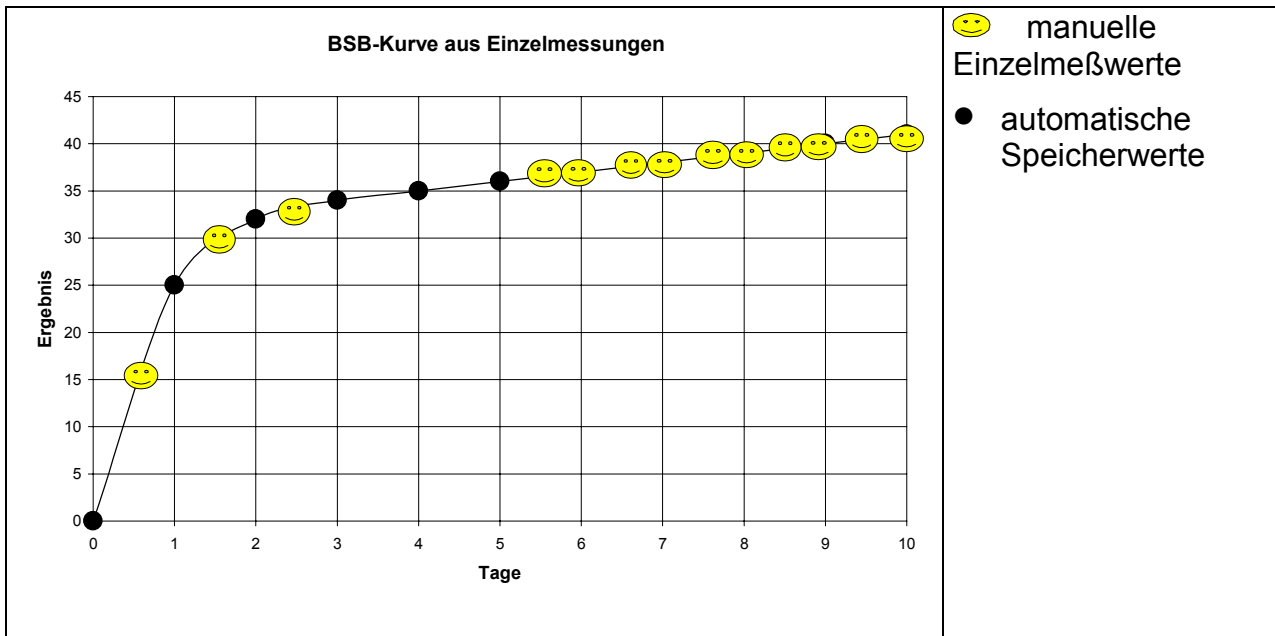
Dieser Wert gibt die Information über den momentanen Status der Messung. Das Display schaltet sich danach selbsttätig wieder aus.

Es kann jederzeit ein weiterer Meßwert aufgenommen werden, z.B. nach 7 Tagen oder nach 28 Tagen. Die einzige Grenze ist durch den Sauerstoffgehalt innerhalb des Meßsystems gesetzt. Ist der Sauerstoff verbraucht, ist der maximale Unterdruck erreicht. Geschieht dies während einer Messung, ist der Meßbereich falsch gewählt und die Messung muß wiederholt werden.



Meßbereichs-
überschreitung

Der OxiTop®-Meßkopf zeigt „overflow“.



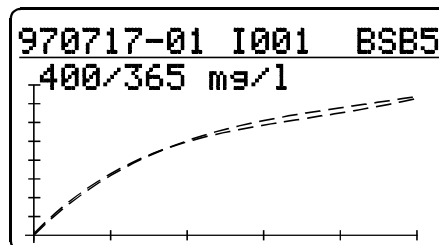
Der OxiTop®-Meßkopf mißt bis zum Neustart der Messung weiter.

OxiTop® Control - System

Beim OxiTop®-Control System werden abhängig von der Gesamtmeßdauer (0,5 Stunden bis 99 Tage) 180 bis 360 Meßwerte aufgezeichnet. Beim BSB₅ sind es z.B. 360 einzelne Meßwerte. Dadurch ist ein detailliertes Betrachten der Meßkurve möglich. Dieses Meßsystem läßt auch Mittelwertbestimmungen von Parallelproben mit statistischer Auswertung zu. Das OxiTop®-Control System eignet sich aufgrund unterschiedlicher Meß- und Einstellmöglichkeiten neben der klassischen BSB₅ Messung auch für Forschungsaufgaben sowie Abbautests, um nur zwei Beispiele zu nennen.



Der OxiTop®-Controller kommuniziert mit den OxiTop®-Control Meßköpfen über eine Infrarotschnittstelle. Die gesamte Probenverwaltung mit Datenspeicherung und graphischer Auswertung übernimmt der Controller. Über die RS 232 Schnittstelle können die gespeicherten Daten mit dem Programm „Achat OC“ komfortabel auf einen PC übertragen werden.



Grafische Darstellung einer Parallelbestimmung des BSB₅ am Controller.

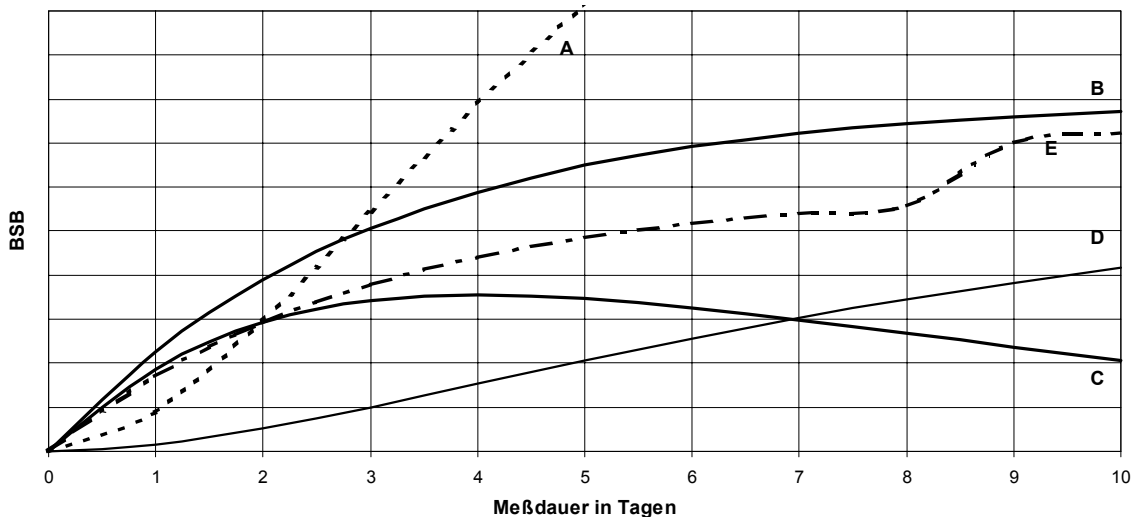


Der herrschende Druck im Flascheninneren (Meßgröße!) wird durch Temperaturschwankungen des Inkubators beeinflusst. Jedes Öffnen der Thermostattür bedeutet eine Temperaturschwankung. Um dies zu umgehen, gibt es Thermostatschränke mit Glastüren. Da die Datenübertragung zwischen Meßkopf und Controller durch Infrarotstrahlen erfolgt, ist dies auch bei geschlossener Glastüre möglich.

Der Einfluß von Außen bleibt somit minimal.

Beispiele für BSB-Kurven

In der nachfolgenden Grafik sind einige Beispiele von charakteristischen BSB-Kurven abgebildet.



- Kurve A Der BSB_n -Wert ist zu hoch, der Sauerstoffgehalt in der Flasche reicht nicht aus. Die Probe muß verdünnt oder ein anderer Meßbereich gewählt werden.
- Kurve B **Normaler Verlauf einer BSB_n -Kurve.**
- Kurve C Das System liefert keine korrekten Ergebnisse für die BSB_n -Berechnung. Mögliche Ursachen: keine angemessene Impfung mit Mikroorganismen, Undichtigkeiten, keine oder zu geringe Dosierung von NaOH-Plätzchen, usw.
- Kurve D Die Bakterien konnten sich an die gegebenen Umweltbedingungen nicht oder nur schlecht anpassen, oder die Animpfung, d.h. die Zugabe von Mikroorganismen, war ungenügend.
- Kurve E Es findet z.B. unerwünschte Nitrifikation statt.

Kontrollmessungen

Kontrollmessungen dienen der Überprüfung der Messung bzw. der verwendeten Geräte. Für die respirometrische BSB-Messung mit dem OxiTop[®]-Meßsystem sind drei Arten der Überprüfung möglich.

Standard-Lösung nach *Standard Methods 5210 D*

Die Überprüfung der Messung kann mit einer Glukose/Glutaminsäure-Lösung (Anhang R10) durchgeführt werden. Der theoretische BSB₅-Wert dieser Lösung liegt bei 307 mg/L. Biologisch abgebaut werden zwischen 75% und 94% des theoretischen BSB-Wertes. **Die Glukose/Glutaminsäure-Lösung muß unbedingt angeimpft werden, da sonst keine Mikroorganismen in der Verdünnung vorhanden sind.** Das ist der Grund, weshalb diese Art der Überprüfung am aufwendigsten ist. **Die Standardlösung muß mit beimpften Verdünnungswasser angesetzt werden und der BSB-Wert des beimpften Verdünnungswassers separat bestimmt werden, um dessen Anteil kompensieren zu können.** Die Messung im kurzen Überblick:

Das benötigte Meßvolumen für die Standardmessung beträgt 164 mL. Das Animpfmateriale, alle Mineralien, Nährstoffe und Spurenelemente werden mit dem Verdünnungswasser in ausreichender Menge zugesetzt.

Um die Sauerstoffzehrung des Verdünnungswassers zu berücksichtigen, sind als Kontrollmessung 432 mL der Verdünnungslösung parallel anzusetzen. Der BSB₅-Wert des Verdünnungswassers darf 2 mg/L nicht übersteigen.

Das Ergebnis berechnet sich dann nach folgender Formel

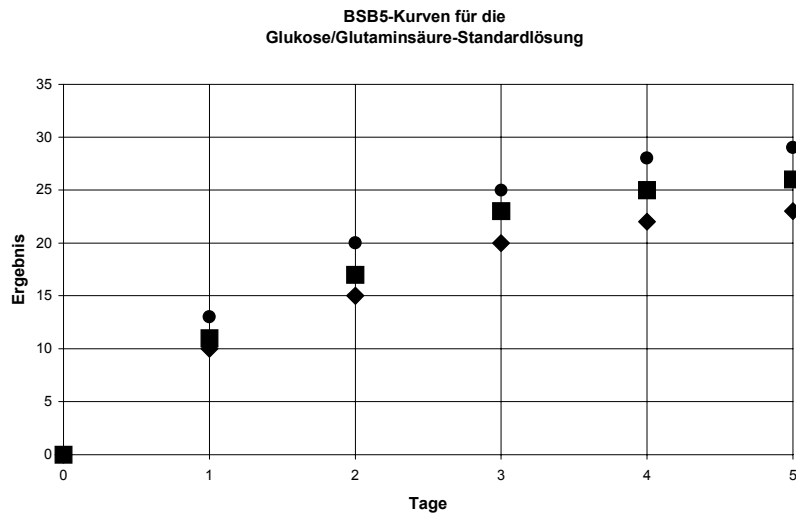
$$BSB_n = \left[A - B \cdot \frac{V_t - V_e}{V_t} \right] \cdot \frac{V_t}{V_e}$$

mit:

- A** Meßwert der verdünnten Standardlösung nach n-Tagen [mg/L]
- B** Meßwert des beimpften Verdünnungswassers nach n-Tagen [mg/L]
- V_e** Probenvolumen [mL], das für die Herstellung der betreffenden Analysenlösung eingesetzt wurde
- V_t** Gesamtvolumen [mL] dieser Analysenlösung

Anmerkung: Diese Berechnungsformel unterscheidet sich etwas von der in den *Standard Methods* angegebenen Formel, da das OxiTop[®]-System bereits ein Konzentrationsergebnis [mg/L] liefert. In der Originalformel wird aber mit der Sauerstoffaufnahme in Masseinheiten gerechnet [mg].

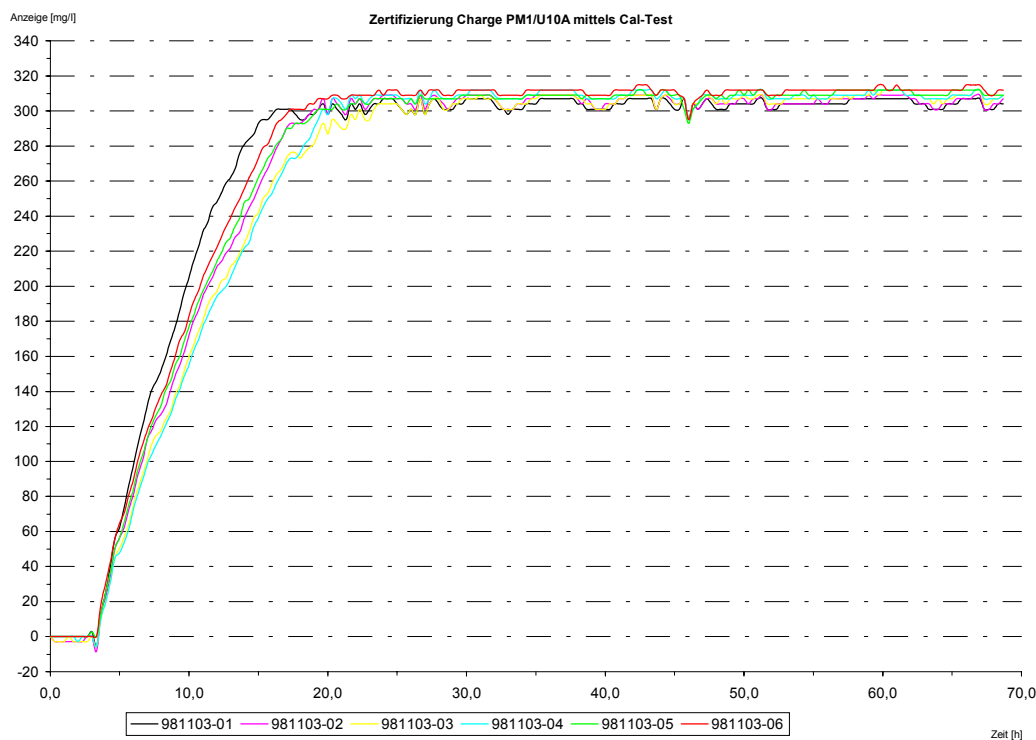
Das Ergebnis der Messung der Standardlösung mit Glukose/Glutaminsäurestandard sollte 260 ± 30 mg/L betragen.



Der Vorteil dieser Überprüfung liegt in der Tatsache begründet, daß hierbei nicht nur die verwendeten Meßgeräte überprüft werden, sondern auch die Leistungsfähigkeit der eingesetzten Biologie.

Kalibriertablette OxiTop® PM

Die Kalibriertablette OxiTop® PM besteht aus einer genau definierten Menge an Chemikalien, welche mit gelöstem Sauerstoff reagieren und damit Sauerstoff aus der Gasphase und der flüssigen Phase entziehen. Das Resultat ist ein Unterdruck der quasi einem BSB entspricht und der zur Überprüfung des OxiTop®-Systems verwendet wird. Der angegebene Sollwert muß erreicht und auch über fünf Tage gehalten werden. Hierdurch ist es möglich, das gesamte OxiTop®-System auf Funktionsfähigkeit und Dichtheit zu prüfen.



Mit der Kalibriertablette kann die Leistungsfähigkeit der Biologie nicht überprüft werden, aber die Funktionsfähigkeit der gesamten Meßapparatur. Zudem ist der experimentelle Aufwand im Vergleich zur Überprüfung mit der Glukose/Glutaminsäure-Standardlösung extrem gering, wie die folgende Anleitung deutlich macht.

Anleitung zur Prüfung mit dem OxiTop® PM (Kalibriertablette)

1. Den Thermostatschrank auf (20 ± 0,5)°C einstellen und die Rührplattform anschließen.
2. Mit Hilfe eines Überlaufmeßkolbens 164 mL destilliertes Wasser und einen Magnetrührstab in eine BSB-Flasche einfüllen.
3. Flasche auf der Rührplattform im Thermoschrank plazieren und den Rührer einschalten.
4. Zu prüfenden Meßkopf starten und einzeln in den Thermostatschrank legen.
Die Sauerstoffzehrung der Kalibriertablette verläuft ungewohnt schnell. Aus diesem Grunde muß die AutoTemp-Funktion umgangen werden.
5. Meßköpfe und Flasche 4 - 4,5 Stunden im Thermoschrank temperieren.
Während dieser Temperierzeit läuft das AutoTemp-Zeitintervall ab und beeinflusst die nachfolgende Messung nicht mehr!
6. Nach der Temperierzeit je Flasche eine Kalibriertablette zugeben.
7. Den Gummiköcher ohne Absorbens (z.B.NaOH) als Dichtring einsetzen.
Es handelt sich um eine chemische Reaktion, bei der kein Kohlendioxid frei wird, weshalb auch kein NaOH benötigt wird!
8. Den OxiTop®-Meßkopf sofort aufschrauben und handfest verschließen. Auf keinen Fall die Messung erneut starten, da sonst das AutoTemp-Intervall wiederum beginnen würde!
9. Die Messung läuft unter Rühren während der nächsten fünf Tage im Thermoschrank.
10. Den Meßwert mit dem zu erwartenden Sollwert (ist der Packung zu entnehmen) vergleichen und in das beigelegte Protokoll eintragen.

Stimmt der gemessene Wert mit dem angegebenen Sollwert auf der Packung überein, ist sichergestellt, daß das gesamte OxiTop®-System funktionsfähig und damit einsatzbereit ist.

Wertetabelle / Values table

| Meßsystem Measuring system | Probennummer Sample number | Produktbezeichnung und Charge Product designation and lot | Startdatum Date of start | 1. Tag 1 st day | 2. Tag 2 nd day | 3. Tag 3 rd day | 4. Tag 4 th day | 5. Tag 5 th day | Bemerkung Remark | Chargenprüfwert Lot test value |
|-------------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

Trägt man alle Prüfwerte in diese Tabelle ein, kann man über einen langen Zeitraum hinweg ein Meßsystem beobachten. Nur auf diese Weise können Langzeitveränderungen überhaupt entdeckt werden.

Prüfmittel OxiTop® PT (Prüfung des Meßkopfes)

Das Prüfmittel OxiTop® PT besteht aus einer Vorrichtung, mit deren Hilfe es möglich ist, einen definierten Unterdruck herzustellen. Dieser Unterdruck ist abhängig von der Höhe über Meeresspiegel N.N. (Umgebungsluftdruck) auf der die Überprüfung durchgeführt wird, denn der Luftdruck am Toten Meer ist höher als am Mount Everest.


Der Anwendungsbereich ist die schnelle Prüfung des OxiTop®- und OxiTop® Control-Systems auf Richtigkeit der Druckmessung.

Eine Langzeit-Prüfung der Dichtigkeit des Systems Flasche - OxiTop® bzw. OxiTop®-C ist hiermit nicht möglich.

Prüfung des OxiTop®-Systems

Nur Originalgummiköcher des OxiTop®-PT verwenden! Sonst sind Meßfehler möglich.

Gummiköcher in das Prüfmittel OxiTop®-PT einsetzen.
Kolben der Spritze auf den 5. Skalenstrich (0,5mL) stellen.
Das OxiTop® darf hierbei noch nicht auf das Prüfmittel aufgeschraubt sein.
OxiTop® auf das Prüfmittel dicht aufschrauben.
Tasten "S" und "M" gleichzeitig 2 Sekunden drücken.

OxiTop® muß  anzeigen.
Kolben bis zum 20. Skalenstrich (2mL) herausziehen.
Taste "M" drücken und Meßwert ablesen.
Höhe über Meeresspiegel ermitteln und den zugehörigen Prüfwert aus der Tabelle entnehmen.

Ablesebeispiel:

Ort: WTW Weilheim / Höhe über Meeresspiegel:
565 Meter / nächster Höhenwert in der Tabelle: 600 Meter
Prüfwert: 36 Digit
Abweichung (Meßwert - Prüfwert) bestimmen
Die Abweichung darf maximal +/-3 Digit betragen.
Die üblichen Schwankungen des Luftdruckes sind berücksichtigt.

Prüfung des Systems OxiTop®-Control:

Siehe Bedienungsanleitung System OxiTop®-Control,
Kapitel GLP/TOOLS – Check - Pneum. Test.

| Höhe über Meeresspiegel (NN) [m] | Mittlerer Luftdruck [hPa / mbar] | Prüfwert [Digit] |
|-------------------------------------|--|------------------------------|
| <i>Altitude above sea level [m]</i> | <i>Average air pressure [hPa / mbar]</i> | <i>Control value [Digit]</i> |
| -300 | 1 050 | 41 |
| -200 | 1 037 | 40 |
| -100 | 1 025 | 40 |
| 0 | 1 013 | 39 |
| 100 | 1 001 | 39 |
| 200 | 989 | 38 |
| 300 | 977 | 38 |
| 400 | 966 | 37 |
| 500 | 954 | 37 |
| 600 | 943 | 36 |
| 700 | 932 | 36 |
| 800 | 921 | 36 |
| 900 | 909 | 35 |
| 1000 | 898 | 35 |
| 1100 | 888 | 34 |
| 1200 | 877 | 34 |
| 1300 | 866 | 33 |
| 1400 | 856 | 33 |
| 1500 | 845 | 33 |
| 1600 | 835 | 32 |
| 1700 | 825 | 32 |
| 1800 | 815 | 31 |
| 1900 | 805 | 31 |
| 2000 | 795 | 31 |
| 2100 | 785 | 30 |
| 2200 | 775 | 30 |
| 2300 | 766 | 30 |
| 2400 | 756 | 29 |
| 2500 | 747 | 29 |

Reinigung und Wartung

Reinigung

Die Meßflaschen, Magnetrührstäbchen und Gummiköcher sind nach jeder Benutzung zu reinigen. Vom Einsatz von Spülmitteln ist eher abzuraten. Spülmittelrückstände in der Flasche oder am Magnetrührstäbchen führen zu Fehlmessungen, da sie die Biologie beeinflussen können. In jedem Fall liefern Spülmittelrückstände in der Flasche einen Beitrag zum BSB-Wert!



Als geeignet hat sich die mechanische Reinigung mit einer Bürste und das Spülen mit verdünnter Salzsäure herausgestellt. (Sicherheitshinweise beachten.) Anschließend ist darauf zu achten, daß die Säurereste vollständig entfernt sind. (z.B. durch Messen des pH-Wertes.)

Der OxiTop[®]-Meßkopf kommt bei der Messung nicht mit der Meßlösung in Berührung und braucht daher keine regelmäßige Reinigung. Eventuelle Spritzer auf dem Gehäuse können mit einem Lappen entfernt werden.

Wartung

Das OxiTop[®]-System arbeitet im Batteriebetrieb. Erscheint die Anzeige „LO“ im Display sind die Lithium-Batterien auszutauschen. Je seltener Daten abgefragt werden, um so weniger Energie der Batterie wird verbraucht und um so länger ist deren Lebensdauer!



Speicher leer
(Meßwert fehlt)



Meßbereichs-
unterschreitung



Batterien wechseln
(ca. alle 3 Jahre)



Meßbereichs-
überschreitung



BSB_n-Bestimmung nach DIN EN 1899-1 (ISO 5815), DIN EN 1899-2 und Standard Methods 5210 B

Mit der BSB-Bestimmung entsprechend der Euronorm DIN EN 1899-1 (identisch mit ISO 5815) können Wasserproben von 3 mg/L bis 6000 mg/L BSB untersucht werden. Das ist zugleich auch der Grund, weshalb überhaupt verdünnt werden muß. Sauerstoffgesättigtes Wasser hat eine Sauerstoffkonzentration von ca. 9 mg/L. Wenn die Probe nun einen BSB_n von 5000 mg/L hat, ist leicht vorstellbar, daß der Sauerstoffgehalt in der Meßflasche nicht ausreicht.



Dadurch zeigt sich bereits eine Forderung des zu verwendenden Verdünnungswassers, es muß sauerstoffgesättigt sein. Mit der Verdünnung wird die Konzentration an Sauerstoffzehrern soweit erniedrigt, daß eine Messung möglich ist. Also soweit, daß 9 mg/L gelöster Sauerstoff in der Flasche ausreichend sind. Damit wird auch deutlich, warum sich die Verdünnung nach dem zu erwartenden BSB richten muß. Die Standard Methods 5210 B (5-Day BOD Test) beschreiben ebenfalls den sogenannten Verdünnungs-BSB. Die Unterschiede zur Euronorm sind unwesentlich.

Eine BSB_n-Methode, die ohne Verdünnung auskommt und bei der der Sauerstoffgehalt ebenfalls mittels amperometrischem Sensor oder iodometrischer Titration bestimmt wird, beschreibt die DIN EN 1899-2. Hierbei liegt der zulässige BSB allerdings zwischen 0,5 und 6 mg/L. Die Sauerstoffkonzentration in der Flasche ist damit ausreichend, falls die Probe gesättigt ist, und eine Verdünnung ist nicht notwendig. Im folgenden soll nun auf die wesentlichen Punkte bei der Bestimmung des BSB_n eingegangen werden.

Verdünnungsmethode (DIN EN 1899-1, ISO 5815, Standard Methods 5210 B)



Analog der respirometrischen Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs wird bei der Verdünnungsmethode der mit der biologischen Aktivität verbundene Verbrauch an Sauerstoff gemessen. Die Differenz der Sauerstoffkonzentration zu Beginn der Inkubation und nach der n-tägigen Inkubation unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsverhältnisse sowie des Blindwerts des Verdünnungswassers stellt den BSB_n dar.

Grundlagen

Die Messung läuft in diesem Fall nicht über den Druck sondern direkt über die Bestimmung des gelösten Sauerstoffs, der normgerecht nach DIN EN 1899-1 mit einem amperometrischen Sensor oder einer iodometrischen Titration bestimmt wird. Beim respirometrischen BSB wird der Sauerstoff auch aus dem Gasraum über der Probe bezogen. Für die Verdünnungsmethode ist ein Einfluß einer gasförmigen Phase auszuschließen, weil analog der beim respirometrischen BSB angeführten Gleichung $p(O_2)_f = p(O_2)_g$, die Konzentration des gelösten Sauerstoffs verändert würde. Die Konsequenz hieraus ist sehr einfach. **Karlsruher- oder Winklerflaschen müssen stets vollständig gefüllt sein! In der Flasche dürfen sich keine Gasblasen befinden!** Der Atmungsprozeß bleibt hiervon natürlich unberührt. Sauerstoff wird eingeatmet und Kohlendioxid ausgeatmet. Beide Gase bleiben aber gelöst.

Kurzanleitung für eine Messung

1. Meßbereich der zu untersuchenden Probe schätzen
2. Herstellung des Verdünnungswassers mit den geforderten Elektrolytzusätzen
3. Belüften des Verdünnungswassers
4. Zusatz des Impfmaterials (idealerweise mit adaptierter Biologie)
5. Herstellung der Analysenlösungen entsprechend dem zu erwartenden BSB_n unter Zusatz von Nitrifikationshemmstoff
6. Es empfiehlt sich mehrere Verdünnungen in einer geometrischen Reihe anzusetzen, die die Verdünnung mit dem erwarteten BSB einschließt
7. Ansatz einer Blindwertbestimmung des beimpften Verdünnungswassers, dem ebenfalls Nitrifikationshemmstoff zugesetzt ist
8. Einfüllen der Analysenlösungen sowie der Blindwertlösungen in Karlsruher- oder Winklerflaschen (alternativ Wheaton-Bottles) als Doppelbestimmungen (zwei analoge Serien)
9. Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in einer der Serien
10. Verschließen der Flaschen mit Stopfen, so daß keine Luftblasen eingeschlossen sind
11. Inkubieren der Proben für n-Tage bei 20°C
12. Nach der Inkubation Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in allen Analysenlösungen und in den Blindwertlösungen
13. Berechnung der BSB_n -Werte und Mittelwertbildung

Bestandteile des Meßsystems zur Bestimmung des Verdünnungs-BSBs



Karlsruher oder Winklerflaschen (eventl. Wheaton-Bottles)

Die trichterförmige Aufweitung des Flaschenhalses erlaubt ein Eintauchen des Sauerstoffsensors, ohne daß die Meßprobe überläuft. Die vom Sensor verdrängte Probe sammelt sich im Flaschenhals und läuft nach dem Entfernen des Sensors in die Flasche zurück.

Sauerstoffsensoren

Für die Messung des Gelöstsauerstoffs werden amperometrische Sensoren verwendet (vgl. Sauerstoff-Fibel). Wichtig hierbei ist, daß ständig Probe an die Membran geführt wird. Die speziell für die BSB-Messung entwickelten Sensoren StirrOx[®] G sind am Schaft mit einer Art Propeller versehen, der diese Aufgabe erfüllt. Werden Sensoren, wie CelloX[®] 325 oder TriOxmatic[®] 300 verwendet, empfiehlt sich die Verwendung des Rühraufsatzes RZ 300. Dieser wird direkt auf die Sonde gesteckt, hat den gleichen Durchmesser und paßt deshalb exakt durch den Flaschenhals der Karlsruher oder Winklerflaschen. Zu beachten ist hierbei, daß ein Oxi-Stirrer 300 als Rühruntersatz verwendet wird, weil der RZ 300 mit einem elektromagnetischen Wechselfeld bewegt wird. Normale Magnetrührer hingegen besitzen einen rotierenden Gegenmagneten.



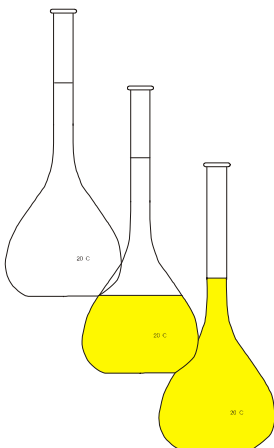
Nitrifikationshemmstoff

Analog der respirometrischen BSB-Bestimmung müssen auch hier die Prozesse der Nitrifikationsbakterien unterdrückt werden. Der Meßlösung wird Nitrifikationshemmstoff zugegeben, der die Umwandlung von Ammonium über Nitrit zu Nitrat unterdrückt.



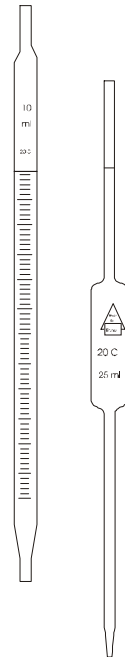
Inkubator

Analog der respirometrischen Messung müssen die Proben bei 20 ± 1 °C für die n-Tage der BSB-Bestimmung gelagert werden. Zu beachten ist in diesem Fall, daß der Inkubatorschrank keine Glastüre besitzt, da die Probenflaschen aus weißem Glas bestehen und so Probenveränderungen durch das Licht möglich wären. Erinnerung sei nur an Algenwachstum. Ansonsten besteht aber kein Unterschied in der Lagerung der Probenflaschen.



Meßkolben und Pipetten

Zur Herstellung der entsprechenden Verdünnungslösungen dienen geeichte Meßkolben und Pipetten. Bei der Verwendung von Pipetten sollte man in jedem Fall darauf achten, daß keine Flocken bzw. größeren Partikelchen beim Ansaugen die Pipettenspitze verstopfen. Dieser Effekt würde dann zu einer Art Mikrofiltration führen und die entsprechende Meßprobe einen Unterbefund aufweisen. Diese Gefahr besteht verstärkt dann, wenn die pipettierten Volumina sehr klein werden. Um in der Betriebsanalytik diesen Effekt zu vermeiden werden Überlaufmeßkolben verwendet.



Messung

Verdünnungswasser

Bei der Herstellung des für die Messung benötigten Verdünnungswassers muß zunächst unterschieden werden zwischen dem Verdünnungswasser und dem beimpften Verdünnungswasser.

Grundlage ist die Verwendung von destilliertem Wasser (Anhang A). Das überrascht auf den ersten Blick, denn, wie bereits mehrfach angesprochen, schädigt dest. Wasser Bakterien durch osmotische Vorgänge. Außerdem ist in der nicht mehr gültigen DIN 38409 Teil 51, Trinkwasser vorgeschrieben und dest. Wasser ausdrücklich verboten. Hintergrund dabei ist folgender. In der alten Norm werden nur wenige zusätzliche Chemikalien (lediglich Harnstoff und Pentanatriumtriphosphat) zugesetzt. In der aktuellen Standardmethode jedoch sind dies eine Vielzahl, so daß aus dem dest. Wasser eine Art „standardisiertes Trinkwasser“ entsteht. Durch den Elektrolytzusatz findet bei den Bakterien keine schädigende Osmose mehr statt.

500 mL dest. Wasser werden je 1 mL der Phosphat-Pufferlösung (Anhang V1), der Magnesiumsulfat-heptahydrat (Anhang V2), der Calciumchlorid (Anhang V3) und der Eisen(III)-chlorid-hexahydratlösung (Anhang V4) zugesetzt. Anschließend wird auf 1000 mL aufgefüllt und mindestens eine Stunde mit einer geeigneten Apparatur belüftet. Um Sauerstoffübersättigung zu vermeiden, das belüftete Verdünnungswasser eine Stunde offen stehen lassen und innerhalb von 24 h verwenden.

Die Euronorm DIN EN 1899-1 läßt nun als Impfmaterien folgende Möglichkeiten zu:

- Kommunales Abwasser
- Oberflächenwasser
- Abgesetzter Ablauf einer Kläranlage
- Flußwasser, das im Vorfluter flußabwärts entnommen wurde
- Im Handel erhältliches Impfmaterien

Der Anwender muß sich im Klaren darüber sein, daß je nach verwendetem Impfmaterien mehr oder weniger Bakterien vorhanden sind, die auch mehr oder weniger angepaßt sind. Damit ist auch der BSB-Wert vom Impfmaterien abhängig. Die *Standard Methods 5210 B* empfehlen deshalb wegen der angepaßten Biologie das Abwasser der Anlage, die das Abwasser auch reinigt. Die besten Ergebnisse erhält man in der Regel, wenn abgesetztes Wasser aus dem Ablauf der Vorklärung verwendet wird.

Nochmaliger Hinweis:

Unterschiedliche Impfmaterien können zu unterschiedlichen BSB-Ergebnissen führen. Die zahlenmäßig größten BSB-Werte erreicht man in der Regel mit Impfwasser aus dem Zulauf zur biologischen Reinigungsstufe der Anlage, die das Abwasser der Probe reinigt. Werden andere Impfwasser verwendet, sind die Werte aufgrund weniger angepaßter Biologie im Regelfall niedriger, da die Abbauleistung geringer ist.

Je nach Herkunft werden dem Verdünnungswasser 5 bis 20 mL Impfwasser je Liter zugefügt. Das beimpfte Verdünnungswasser sollte erst unmittelbar vor der Messung angesetzt werden (und dann nur für diesen Labortag verwendet werden).

Bei der zu untersuchenden Meßprobe sollte darauf geachtet werden, daß sie einen pH-Wert zwischen 6 und 8 hat (eventl. mit verdünnter Salzsäure oder Natriumhydroxidlösung einstellen) und daß kein freies bzw. gebundenes Chlor (eventl. mit Natriumsulfidlösung entfernen) vorhanden ist.

Bezüglich Probenahme und Homogenisierung sei auf die respirometrische Messung verwiesen. Die hierbei angeführten Punkte gelten analog.

Die typischen Verdünnungen, die angesetzt werden, hängen ganz vom zu erwartenden BSB-Wert ab. Proben mit hohem BSB müssen stark verdünnt werden, damit der Sauerstoff in den Karlsruher oder Winklerflaschen ausreicht. Proben mit geringem BSB müssen weniger stark verdünnt werden. Die DIN EN 1899-1 empfiehlt folgende Verdünnungsverhältnisse, wobei der Verdünnungsfaktor den Quotienten aus Volumen der verdünnten Probe durch Volumen der Analysenprobe bezeichnet:

| Erwarteter BSB [mg/L] | Verdünnungsfaktor | Beispiele für Wässer |
|-----------------------|-------------------|--|
| 3 – 6 | 1,1 – 2 | Flußwasser |
| 4 – 12 | 2 | Flußwasser, biologisch gereinigtes kommunales Abwasser |
| 10 – 30 | 5 | Flußwasser, biologisch gereinigtes kommunales Abwasser |
| 20 – 60 | 10 | Biologisch gereinigtes kommunales Abwasser |
| 40 – 120 | 20 | Geklärttes kommunales Abwasser oder leicht verschmutztes Industrieabwasser |
| 100 – 300 | 50 | Geklärttes kommunales Abwasser oder leicht verschmutztes Industrieabwasser, kommunales Rohabwasser |
| 200 – 600 | 100 | Geklärttes kommunales Abwasser oder leicht verschmutztes Industrieabwasser, kommunales Rohabwasser |
| 400 – 1200 | 200 | Stark verschmutztes Industrieabwasser, kommunales Rohabwasser |
| 1000 – 3000 | 500 | Stark verschmutztes Industrieabwasser |
| 2000 – 6000 | 1000 | Stark verschmutztes Industrieabwasser |

Bei der Herstellung der Analysenlösungen ist nun folgendes zu beachten:

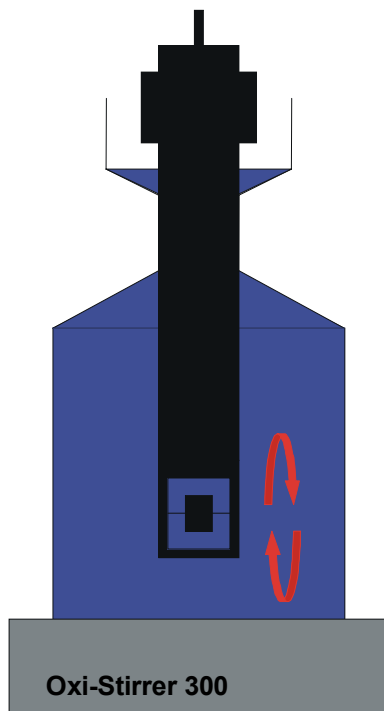
Die Probe sollte eine Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ haben und wird im Verdünnungsgefäß vorgelegt. Anschließend wird die Nitrifikationshemmstofflösung zugegeben und mit dem beimpften Verdünnungswasser entsprechend obiger Tabelle bis zur Eichmarke aufgefüllt. Vorsichtig mischen, um einen Einschluß von Luftblasen zu vermeiden, und dann in die Karlsruher- bzw. Winklerflaschen umfüllen.

Da der exakt richtige Verdünnungsgrad schwer zu erreichen ist, empfiehlt es sich eine Verdünnungsreihe anzusetzen, die den zu erwartenden Wert in der Mitte hat. Als Faustregel kann hierzu gelten, daß bei unbekanntem Proben fünf und bei bekannten Proben drei unterschiedliche Verdünnungen in Doppelbestimmung angesetzt werden sollten.

Zusätzlich darf auf keinen Fall die Blindwertbestimmung des beimpften Verdünnungswassers vergessen werden. Dem Verdünnungswasser wird nur noch ATH zugesetzt, um die Nitrifikation zu unterdrücken.

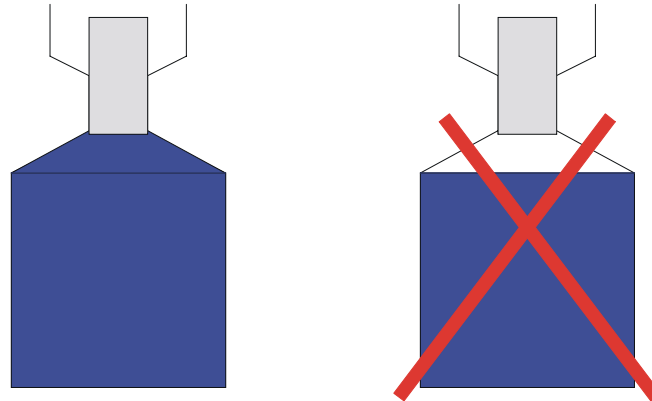
Anmerkung: DIN EN 1899-1 verlangt nur bei der Sauerstoffbestimmung mit der iodometrischen Titration eine Doppelbestimmung, weil die erste Serie nach der Anfangskonzentrationsbestimmung verworfen wird und lediglich die zweite Serie inkubiert wird.

Sauerstoffkonzentrationsbestimmung



Die unterschiedlichen Probelösungen werden anschließend in Karlsruher beziehungsweise Winklerflaschen überführt. Das hat vorsichtig zu geschehen, um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden. Am besten an der Wandung ablaufen lassen, ähnlich dem Einschenken eines Bieres. Die Lösung sollte dann den unteren Trichterrand erreichen. Nun führt man den Sensor in die Flasche ein. Die verdrängte Probe sammelt sich im Trichter der Flasche. Nach der Aufnahme des Meßwerts (Anströmung des Sensors bei der Messung nicht vergessen!) wird der Sensor herausgezogen, die Probe läuft zurück und der Stopfen wird aufgesetzt und zwar derart, daß sich keine Luft mehr in der Probenflasche befindet!

Sämtliche Proben müssen luftblasenfrei befüllt sein!



Die Probenfläschchen werden anschließend für n-Tage \pm 4h bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Die Dunkelheit ist in diesem Falle besonders wichtig, da die Karlsruher bzw. Winklerflaschen (oder Wheaton bottles) meist aus weißem Glas bestehen. Bei einem Inkubator mit Glastüre kann es zu Algenwachstum in den Flaschen kommen. Nach der Inkubation wird die Sauerstoffkonzentration in den Flaschen erneut bestimmt. **Hierzu muß unmittelbar nach dem Herausziehen des Stopfens mit der Messung begonnen werden. Wenn die Flaschen geöffnet sind, kann Sauerstoff aus der Umgebung eindiffundieren und das Ergebnis verfälschen. Der eingetauchte Sensor wirkt bei der Messung wie ein Stopfen, wodurch dieser Effekt bei der Messung unterdrückt wird.**

Auswertung der Messung

Während in DIN 38409 Teil 51 der Wert des BSB aus einer graphischen Auftragung der Sauerstoffwerte gegen die Verdünnungen bestimmt wurde beziehungsweise aus der entsprechenden linearen Regression, wird nach DIN EN 1899-1 der BSB für jede Probenflasche bestimmt und anschließend eine Mittelwertbildung durchgeführt. Der BSB berechnet sich für jede Probe nach folgender Formel (Die Berechnung nach Standard Methods 5210 B erfolgt analog):

$$BSB_n = \left[(c_1 - c_2) - \frac{V_t - V_e}{V_t} \cdot (c_3 - c_4) \right] \cdot \frac{V_t}{V_e}$$

mit:

- c₁** Konzentration an gelöstem Sauerstoff [mg/L] in einer Analysenlösung zur Zeit Null
- c₂** Konzentration an gelöstem Sauerstoff [mg/L] in der gleichen Analysenlösung nach n Tagen
- c₃** Konzentration an gelöstem Sauerstoff [mg/L] der Blindwertlösung zur Zeit Null
- c₄** Konzentration an gelöstem Sauerstoff [mg/L] der Blindwertlösung nach n Tagen
- V_e** Probenvolumen [mL], das für die Herstellung der betreffenden Analysenlösung eingesetzt wurde
- V_t** Gesamtvolumen [mL] dieser Analysenlösung

Kontrollmessungen

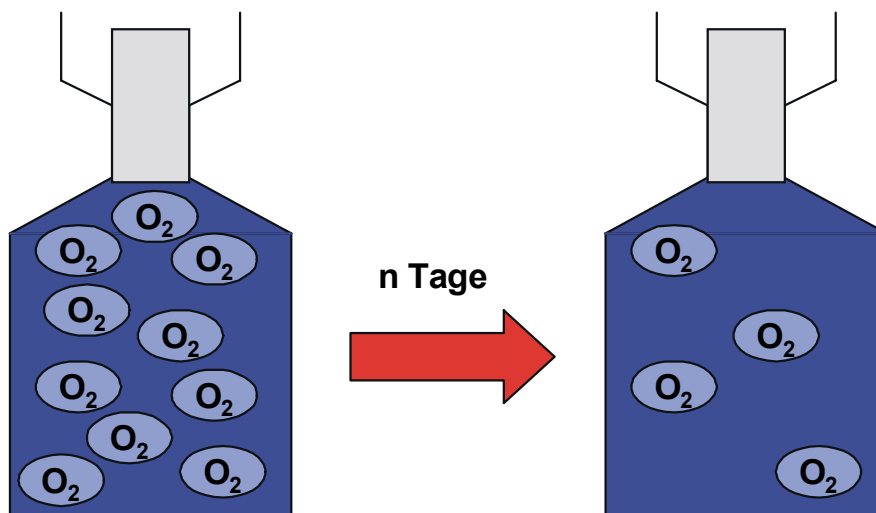
Die Euronorm DIN EN 1899-1 und die Standard Methods 5210 B empfehlen zur Überprüfung des beimpften Verdünnungswassers, des Impfwassers sowie der Technik des Analytikers eine Kontrolluntersuchung in jeder Probenserie. Diese Prüfung wird wiederum mit Glucose-Glutaminsäure-Standardlösung durchgeführt.

20 mL der Glucose-Glutaminsäure-Standardlösung (Anhang V5) werden mit der ATH-Lösung versetzt und mit beimpftem Verdünnungswasser auf 1 Liter aufgefüllt. Die weitere Vorgehensweise entspricht der üblichen Messung. Die hierdurch erhaltenen BSB-Werte sollten für den Fall der BSB₅-Messung bei 210 ± 40 mg/L und beim BSB₇ bei 225 ± 40 mg/L liegen.

Verfahren für unverdünnte Proben (DIN EN 1899-2)

Grundlagen

Die Euronorm DIN EN 1899-2 ist für Proben geeignet, deren BSB im Bereich zwischen 0,5 und 6 mg/L liegt. Die Konzentration von sauerstoffgesättigtem Wasser beträgt ca. 9 mg/L. Damit ist der vorhandene Sauerstoff in der Probe für derart niedrige BSB-Werte ausreichend. Das Prinzip ist in diesem Fall denkbar einfach. Die Originalprobe wird in eine Karlsruher oder Winklerflasche abgefüllt, die Sauerstoffkonzentration gemessen, n-Tage bei 20°C inkubiert, und wiederum die Sauerstoffkonzentration gemessen. Die Differenz entspricht dann dem BSB_n .



Auf eine spezielle Erläuterung der Kurzanleitung sowie der verwendeten Geräte kann an dieser Stelle verzichtet werden, da dies analog zur bereits beschriebenen Verdünnungsmethode ist. Bei der DIN EN 1899-2 handelt es sich quasi um eine Bestimmung nach dem Verdünnungsprinzip nur eben ohne Verdünnung. Die Hinweise zur Probenahme und Homogenisation sollten ebenfalls beachtet werden.

Messung

Die zu untersuchende Wasserprobe muß auf 20°C thermostatisiert und sauerstoffgesättigt sein. DIN EN 1899-2 empfiehlt eventuell zu belüften und die Probe dann 15 min offen stehen zu lassen, um auch eine Übersättigung zu vermeiden. Anschließend wird in Winkler bzw. Karlsruherflaschen umgefüllt, wobei keine Luftblasen eingeschlossen werden dürfen. Um die Nitrifikation zu unterdrücken, ist entsprechend der DIN EN 1899-2 die Zugabe von ATH möglich. Nach der Sauerstoffkonzentrationsbestimmung werden die Analysenproben bei 20°C für fünf oder sieben Tage inkubiert. **Die Inkubation muß unter Lichtabschluß geschehen, um Einflüsse durch Algenwachstum zu vermeiden.** Nach der Inkubation wird erneut eine Sauerstoffkonzentrationsbestimmung durchgeführt, die den benötigten Endwert liefert. Die Sauerstoffbestimmung wird analog DIN EN 1899-1 mit der Sauerstoffsonde bzw. der iodometrischen Titration durchgeführt. Dabei sollten die im vorigen Abschnitt beschriebenen Hinweise beachtet werden.

Auswertung der Messung

Die Berechnung des gesuchten Wertes für den Biochemischen Sauerstoffbedarf gestaltet sich sehr einfach, denn er stellt die Differenz der Anfangs- und Endbestimmung der Sauerstoffkonzentration dar.

$$BSB_n = (c_1 - c_2)$$

mit:

- c₁** Konzentration an gelöstem Sauerstoff [mg/L] in einer Analysenlösung zur Zeit Null
- c₂** Konzentration an gelöstem Sauerstoff [mg/L] in der gleichen Analysenlösung nach n Tagen

Anmerkung: Wenn man in der Formel zur Berechnung des Verdünnungs-BSB Probenvolumen **V_e** gleich Gesamtvolumen **V_t** setzt, erhält man die obige Formel. Das ist logisch, da keine Verdünnung stattgefunden hat.

Ein Punkt sei noch angefügt. Die Probe muß für diese Bestimmung ausreichend Bakterien besitzen. Ein toxisches Industrieabwasser darf hiermit verständlicherweise nicht untersucht werden.

BSB_n-Küvettest

Die Bestimmung des Biochemischen-Sauerstoff-Bedarfs mit Küvettestensätzen lehnt sich stark an den Verdünnungs-BSB nach DIN EN 1899-1 an. Das verwendete Verdünnungswasser entspricht praktisch den Forderungen der Normmethode, nicht aber die Art und Weise der Bestimmung der Sauerstoffkonzentration. Der Verdünnungs-BSB nach DIN EN 1899-1 verlangt explizit die Verwendung entweder der iodometrischen Titration oder der amperometrischen Sauerstoffsonde.

Beim BSB-Küvettest wird die Konzentrationsbestimmung aber photometrisch durchgeführt. Der Küvettest ist damit eine Eigenkontrollmethode und keine normgerechte Methode, auch wenn dies von diversen Anbietern manchmal so dargestellt wird.

Die Bestimmung mit dem Küvettestsatz 00687 läuft nun folgendermaßen ab. Die verdünnte Probe und das Verdünnungswasser müssen vor und nach der Inkubation auf ihren Sauerstoffgehalt untersucht werden. Ein Teil wird für die Anfangsbestimmung verwendet und dann verworfen, der Rest wird in den entsprechenden Gefäßen bei 20°C für 5 (bzw. n)-Tage inkubiert und dann für die Endkonzentrationsbestimmung verwendet.

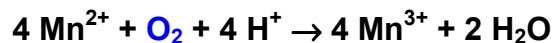
Für das BSB Meßergebnis sind damit insgesamt vier photometrische Bestimmungen notwendig.

Grundlagen

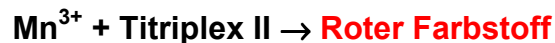
Hintergrund der Photometrie ist eine chemische Reaktion, die den zu bestimmenden Stoff in eine farbige Verbindung überführt, deren Intensität dann mit einem Photometer bestimmt wird. Die Farbintensität entspricht der gesuchten Konzentration. Alle benötigten Reagenzien sind dem Testsatz beigelegt.

Für die Sauerstoffbestimmung läuft folgende chemische Reaktion ab:

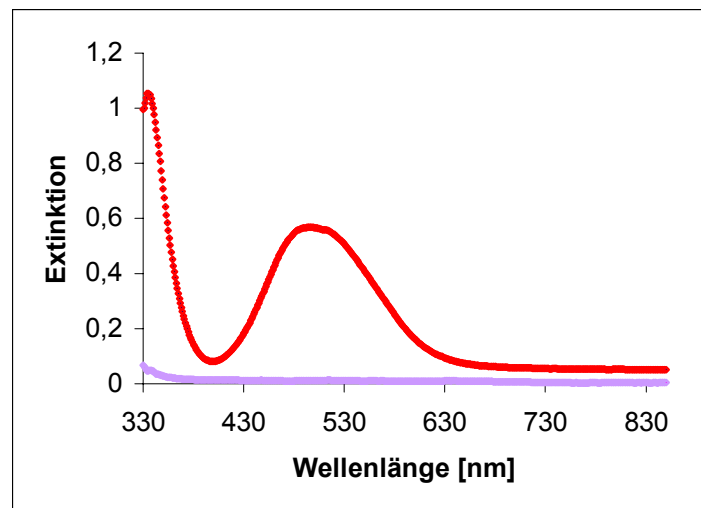
Der in der Probe vorhandene Sauerstoff oxidiert Mangan



Das entstandene Mangan(III) bildet mit Titriplex II einen rotgefärbten Komplex



Ein rotgefärbter Farbstoff absorbiert hauptsächlich Licht in einem Wellenlängenbereich von 500 nm. Aus diesem Grund wird für die photometrische Messung Licht mit einer Wellenlänge von 500 nm bzw. 525 nm verwendet, je nach Photometertyp. Ist nun viel Sauerstoff in der Probe, hat sich eine entsprechend große Menge der roten Komplexverbindung gebildet und die Färbung ist sehr intensiv. Liegt wenig Sauerstoff in der Probe vor, erscheint die gebildete Färbung sehr blaß, bzw. farblos. In den folgenden Spektren ist der erste Fall durch die dunkelrote Kurve, der zweite Fall durch die blaßrote Kurve repräsentiert. Im Bereich 500 nm wird einmal viel Licht



absorbiert (hoher Extinktionswert) und einmal sehr wenig absorbiert (sehr niedriger Extinktionswert). Der Extinktionswert ist die Meßgröße für die Lichtaufnahme.

Aus diesen gemessenen Extinktionswerten berechnet das Photometer mittels abgespeicherter Kalibrierkurven die Sauerstoffkonzentrationen, aus denen dann der BSB-Wert berechnet werden kann.

Kurzanleitung für eine Messung

1. Meßbereich der zu untersuchenden Proben schätzen
2. Herstellung der beimpften Nährsalzlösung mit abgesetztem Abwasser, idealerweise aus dem Ablauf Vorklärung, dem Inhalt des Fläschchens mit BSB-Nährsalzgemisch und belüftetem Trinkwasser
3. Verdünnung der Proben entsprechend der Verdünnungstabelle
4. Zwei Sauerstoff-Reaktionsflaschen bis zum Überlaufen blasenfrei mit verdünnter Probe füllen
5. Zwei Sauerstoff-Reaktionsflaschen bis zum Überlaufen blasenfrei mit Verdünnungswasser füllen
6. Mit jeweils einer der Flaschen aus 4. und 5. eine Sauerstoffkonzentrationsbestimmung durchführen
7. Die anderen Flaschen n-Tage bei 20°C inkubieren.
8. Nach der Inkubation Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in den Reaktionsflaschen.
9. Berechnung des BSB-Werts nach der angegebenen Formel aus den gemessenen Sauerstoffkonzentrationen und dem Verdünnungsverhältnis.

Bestandteile des Meßsystems zur Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs mit dem BSB-Küvettest



Der 00687 BSB-Küvettest wird zur Sauerstoffkonzentrationsbestimmung verwendet. Er enthält alle für die Farbbildungsreaktion notwendigen Reagenzien und die Glaskügelchen, die zum Mischen dienen. Die Glasküvetten sind mit Barcode versehen, um die eigentliche photometrische Bestimmung zu vereinfachen.



Das BSB-Nährsalzgemisch ist ein sogenanntes Lyophilisat. Lyophilisat bedeutet, daß es zur Konservierung gefriergetrocknet wurde. Es enthält die für die Bakterien notwendigen Nährsalze. Außerdem enthält es den Nitrifikationshemmstoff, also Allylthioharnstoff (ATH), um die Nitrifikationsprozesse zu unterdrücken. Eine zusätzliche ATH Zugabe wird damit überflüssig.



Die Sauerstoff-Reaktionsflaschen erfüllen zwei Aufgaben. Zum einen werden sie für die Farbbildungsreaktion eingesetzt, zum anderen sind sie die Probengefäße während der Inkubation. Ein wesentlicher Punkt ist im Falle der BSB-Messung ein blasenfreies Befüllen der Gefäße sowohl für die Inkubation als auch für die Reaktion. Um dies zu gewährleisten, sind die Stopfen angeschrägt.



Das Photometer ist das eigentliche Meßgerät. Durch kodierte Küvetten und einer speziellen Optik braucht man nur noch die Küvette in das Photometer einzusetzen und erhält sofort das Ergebnis der Sauerstoffkonzentrationsmessung. Filterwechsel, Methoden- oder Faktoreingaben sind bei den neuen Geräten überflüssig.



Für Inkubatoren und Pipetten, Meßkolben usw. gilt das bereits in den vorigen Kapiteln angesprochene. An dieser Stelle sei hierauf verwiesen.

Trotzdem nochmals der Hinweis auf die Inkubation im Dunkeln für Gefäße aus weißem Glas.



Die Messung

Verdünnungswasser

Durch die Verdünnung wird der Biochemische Sauerstoffbedarf soweit herabgesetzt, daß der in der verdünnten Lösung vorhandene Sauerstoff ausreicht. Für den BSB-Küvettentest werden folgende Verdünnungen empfohlen:

| BSB [mg/L] | 12-50 | 50-100 | 100-500 | 500-1000 | 1000-3000 |
|-----------------------------------|-------|--------|---------|----------|-----------|
| Probe + Nährsalzlösung | 1+9 | 1+19 | 1+99 | 1+199 | 1+499 |
| Verdünnungsfaktor | 10 | 20 | 100 | 200 | 500 |

Die angeimpfte Nährsalzlösung wird dabei in folgender Weise hergestellt:

20 mL abgesetztes Abwasser, das idealerweise aus dem Zulauf zur biologischen Reinigungsstufe der Anlage stammt, die das Abwasser behandelt, wird als Impfmateriale verwendet. Hintergrund ist wieder die angepaßte Biologie für diese Probe. Falls dies nicht möglich ist, sollte auf häusliches Abwasser zurückgegriffen werden.

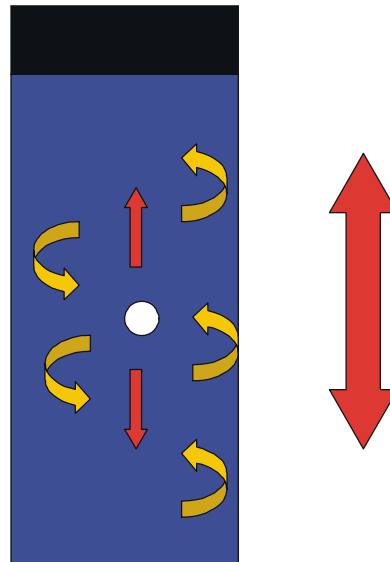
Der gesamte Inhalt des Fläschchens mit dem Nährsalzgemisch wird in 1L chlorfreiem Trinkwasser gelöst. Um Sauerstoffsättigung zu erreichen wird das Trinkwasser vorher in einem offenen Becherglas stehengelassen und mehrfach mit einem Glasstab umgerührt bis ca. 20°C erreicht sind. Anschließend kann man von einer sauerstoffgesättigten Lösung ausgehen (ca. 9 mg/L Sauerstoff). Beim Nährsalzgemisch handelt es sich um ein sogenanntes Lyophilisat. Lyophilisat bedeutet, daß die entsprechenden Substanzen zur Konservierung gefriergetrocknet sind. Es stellt dann das Verdünnungswasser dar und enthält alle für die Bakterien notwendigen Nähr- und Mineralstoffe.

Anschließend werden die 20 mL Impfabwasser mit dem Verdünnungswasser auf 1L aufgefüllt und man erhält das gewünschte beimpfte Verdünnungswasser, mit dem die Verdünnungen entsprechend der obigen Tabelle hergestellt werden können.

Photometrische Messung und Inkubation

Der folgende Arbeitsablauf ist für die Blindproben und die verdünnten Proben sowie für die Anfangsmessungen und die Endmessungen vollkommen identisch. Bei den Endmessungen findet die Zugabe der farbbildenden Reagenzien lediglich nach der Inkubation statt.

Der erste Schritt ist die Zugabe von 1-2 Glasperlen in die leeren Reaktionsflaschen. Die Glasperlen haben die Aufgabe die Probe und die später zuzugebenden Reagenzien zu durchmischen. Glasperlen sind deshalb notwendig, weil keine Luftblasen in den Gefäßen vorhanden sein dürfen. Beim Schütteln würde sich sonst der Sauerstoffgehalt in der Meßprobe, der bestimmt werden soll, ändern. Ohne Luft führt das Schütteln aber zu keiner Durchmischung. Für diese Durchmischung in den vollständig gefüllten Gefäßen sorgen dann beim Schütteln die Glaskugeln.



Nachdem die Glaskugel in das Reaktionsfläschchen gegeben wurde, wird die verdünnte Probe bzw. die Blindlösung zugegeben. Der angeschrägte Stopfen sorgt für ein vollständiges luftblasenfreies Befüllen.

Die Ansätze, die für die Endkonzentrationsbestimmungen vorgesehen sind, werden in den Inkubator gestellt.

Die anderen Reaktionsflaschen werden wieder geöffnet und je 5 Tropfen des Reagenz BSB1-K und 10 Tropfen des Reagenz BSB-2K zugegeben. Anschließend wird wieder verschlossen (luftblasenfrei) und geschüttelt.

(Die Reagenzien sollten nach dem Öffnen der Fläschchen möglichst bald zugegeben werden, da die Messung sonst durch Luftsauerstoff verfälscht werden kann. Beim Zugeben der Reagenzien läuft logischerweise etwas über, wenn das Gefäß wieder verschlossen wird. Aus diesem Grund sollte die Unterlage nicht unbedingt der mit wichtigen Papieren versehene Schreibtisch sein.)

Schließlich werden noch je 10 Tropfen des BSB Reagenz BSB-3K zugegeben, wieder luftblasenfrei verschlossen und geschüttelt.

Anschließend wird sofort in die Rundküvette, die für die Messung bestimmt ist, umgefüllt und der Sauerstoffkonzentrationswert mit dem Photometer bestimmt. Dies muß wirklich sofort sein, weil der gebildete Farbstoff nur kurze Zeit stabil ist und bei zu langer Wartezeit zu einem Unterbefund führen würde. Die Glaskugel darf hierbei ruhig

in die Meßküvette fallen, sie liegt unterhalb des Lichtstrahls im Photometer und stört die Bestimmung nicht.

Nach 5 bzw. 7 Tagen (Bitte auch die Uhrzeit beachten! Wenn am Abend begonnen wird sind fünf Tage erst am Abend und nicht schon am Morgen des fünften Tages vorbei!) kann die photometrische Bestimmung der Sauerstoffendkonzentrationen durchgeführt werden. Man öffnet die Reaktionsfläschchen, gibt BSB-1K zu, und so weiter. Damit sind nun alle vier Werte bekannt, die für die Berechnung benötigt werden.

$$BSB_n = [(c_1 - c_2) - (c_3 - c_4)] \cdot \frac{V_t}{V_e} = (A - B) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

mit:

- c₁** Meßwert [mg/L] der Meßprobe vor der Inkubation
- c₂** Meßwert [mg/L] der Meßprobe nach n Tagen
- c₃** Meßwert [mg/L] der Blindprobe vor der Inkubation
- c₄** Meßwert [mg/L] der Blindprobe nach n Tagen
- V_e** Probenvolumen [mL], das für die Herstellung der betreffenden Analysenlösung eingesetzt wurde
- V_t** Gesamtvolumen [mL] dieser Analysenlösung

bzw.

- A** = (c₁ - c₂) unkorrigierter BSB_n der Meßprobe [mg/L]
- B** = (c₃ - c₄) BSB_n der Blindprobe [mg/L]

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen. In diesem Fall müssen für die Berechnung des BSB_n der Originalprobe jeweils die Mittelwerte von A und B verwendet werden.

Anmerkung: Obige Formel unterscheidet sich von der Formel zur Berechnung des Verdünnungs-BSBs (DIN EN 1899-1 bzw. Standard Methods 5210 B) durch den Wegfall des Faktors (V_t - V_e)/V_t beim Anteil der Blindprobe. Im Rahmen der möglichen Meßgenauigkeit ist diese Vereinfachung zulässig und durchaus sinnvoll. Der Faktor kann entsprechend der gewählten Verdünnung lediglich Werte zwischen 0,9 und 0,998 annehmen.

Anhang

Liste der in den Standard Methods und den Euronorm-Vorschriften verwendeten Chemikalien und Lösungen

(A) **Destilliertes Wasser (Standard Methods 5210 D):**

Benutzen Sie ausschließlich qualitativ hochwertiges destilliertes Wasser aus einer Reinzinn oder Glasdestille. Deionisiertes Wasser kann eingesetzt werden, ist aber oft bakteriologisch belastet. Das Wasser muß weniger als 0,01 mg/L Schwermetalle enthalten und muß frei sein von Chlor, Chloraminen, organischem Material, Säuren oder Laugen. Alle Reagenzien werden mit diesem Wasser angesetzt. Wenn zu Spezialtestzwecken anderes Wasser eingesetzt wird, sind Beschaffenheit und Qualitätseigenschaften klar zu beschreiben.

Respirometrische Methode (Standard Methods 5210 D) (nicht autorisierte Übersetzung)

(R1) **Phosphatpuffer-Lösung (1,5 molar):**

207 g Natriumdihydrogenphosphat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in Wasser lösen, mit 6N KOH-Lösung (R6) auf pH 7,2 neutralisieren und auf 1l auffüllen.

(R2) **Ammoniumchlorid-Lösung (0,71 molar):**

38,2 g Ammoniumchlorid NH_4Cl in Wasser lösen, mit 6N KOH-Lösung (R6) auf pH 7,0 neutralisieren und auf einen Liter auffüllen. 1 mL entspricht 10 mg Stickstoff N.

(R3) **Calciumchlorid-Lösung (0,25 molar):**

27,7 g Calciumchlorid CaCl_2 in Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen. 1 mL entspricht 10 mg Calcium Ca.

(R4) **Magnesiumsulfat-Lösung (0,41 molar):**

101 g Magnesiumsulfat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen. 1 mL entspricht 10 mg Mg.

(R5) **Eisenchlorid-Lösung (0,018 molar):**

4,84 g Eisenchlorid $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen. 1 mL entspricht 1,0 mg Fe.

(R6) **Kaliumhydroxid-Lösung (6 molar):**

336 g Kaliumhydroxid KOH in 700 mL Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen. Achtung: Das KOH wird langsam unter stetem Rühren vorsichtig dem Wasser zugegeben um eine übermäßige Wärmeentwicklung zu vermeiden. Alternativ können auch fertige KOH-Lösungen mit 30 – 50 % Massenanteil eingesetzt werden.

(R7) **Säure-Lösung (1 molar):**

28 mL konzentrierte Schwefelsäure H_2SO_4 oder 83 mL konzentrierte Salzsäure HCl mit 700 mL Wasser mischen und auf einen Liter auffüllen.

(R8) **Laugen-Lösung (1 molar):**

40 g Natriumhydroxid NaOH in 700 mL Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen.

(R9) **Nitrifikationshemmstoff:**

TCMP (2-chloro-6-(trichlormethyl)pyridin) p.a. oder eine vergleichbare Substanz einsetzen, wenn die Hemmung der Nitrifikation erwünscht ist. Dabei 10 mg TCMP/L der Meßlösung zugeben.

Als Nitrifikationshemmstoff kann auch Allylthioharnstoff ATH eingesetzt werden. Hier ist eine Dosierung von 5mg pro Liter Meßlösung vorzunehmen.

Wird die bereits gebrauchsfertige WTW NTH600 Lösung eingesetzt, ist eine Dosierung von 20 Tropfen pro Liter Probe vorzunehmen, da der NTH600 eine Konzentration von 5 g/L besitzt.

(R10) **Glukose/Glutaminsäure-Lösung:**

15 g Glukose p.a. (getrocknet bei 103°C für 1h) und 15 g Glutaminsäure p.a. (getrocknet bei 103°C für 1h) in destilliertem Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen. Mit der 6N KOH-Lösung (R6) auf pH 7,0 neutralisieren. Diese Lösung kann eine Woche bei 4°C gelagert werden.

(R11) **Natriumsulfit Lösung:**

1,575 g Natriumsulfit Na_2SO_3 in 800 mL Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen. Diese Lösung ist nicht stabil. Sie muß vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

(R12) **Spurenelemente-Lösung:**

40 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 57 mg H_3BO_3 , 43 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 35 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 100 mg Fe-Chelat (FeCl_3 -EDTA) in 800 mL Wasser lösen und auf einen Liter auffüllen. Sterilisiert wird die Lösung bei 120°C und 200kPa (2atm) Druck für 20 Minuten.

(R13) **Hefeextrakt-Lösung:**

15 mg Bierhefe zum Laborgebrauch und für pharmazeutische Zwecke in 100 mL Wasser lösen. Diese Lösung ist vor jedem Gebrauch frisch anzusetzen.

(R14) **Nährstofflösung:**

2,5 mL Phosphatpuffer-Lösung (R1)
0,65 mL Ammoniumchlorid-Lösung (R2)
1,0 mL Calciumchlorid-Lösung (R3)
0,22 mL Magnesiumsulfat-Lösung (R4)
0,1 mL Eisenchlorid-Lösung (R5)
1,0 mL Spurenelemente-Lösung (R12)
1,0 mL Hefeextrakt-Lösung (R13)

sind in 900 mL Wasser zu lösen und auf einen Liter aufzufüllen.

Diese Nährlösung und die Lösungen aus R12 und R13 sind extra für den Gebrauch beim OECD-Test formuliert.

Hinweis: Eine 10:1 konzentrierte Nährlösung kann bereitet und zum Gebrauch verdünnt werden.

(R15) **Animpfmaterial nach Standard Methods – 5210 B BSB₅-Test – 19. Auflage - 1995**

Einige Proben enthalten nicht die notwendige Anzahl an Mikroorganismen (zum Beispiel unbehandelte Industrieabwässer, desinfiziertes Wasser, hochehitztes Abwasser oder Wasser mit extremen pH-Werten). Diese Proben sind mit Mikroorganismen zu versetzen. Vorzugsweise ist der Ablauf einer biologischen Reinigungsstufe, die das Abwasser behandelt, einzusetzen. Wo dieses Wasser nicht zu bekommen ist, benutzt man den Überstand eines sedimentierten häuslichen Abwassers, das bei Raumtemperatur 1h, maximal 36h, abgesetzt ist. Wird Wasser aus dem Ablauf einer biologischen Reinigungsstufe benutzt, ist der Einsatz von Nitrifikationshemmstoff empfohlen. Manche Proben enthalten Material, welches unter normalen Umständen von Mikroorganismen aus häuslichem Abwasser nicht abgebaut wird. Solche Proben sind mit adaptierter Mikrobiologie anzupflanzen, erhalten aus dem nicht desinfizierten Ablauf der entsprechenden biologischen Reinigungsstufe. Ausgehend hiervon kann auch Flußwasser aus dem Vorfluter (3-8km) unterhalb der Einleitstelle benutzt werden. Ist auch dieses nicht zu bekommen, ist ein eigenes adaptiertes Animpfmaterial herzustellen, indem unter kontinuierlicher Sauerstoffzugabe häusliches Abwasser täglich mit dem später zu messenden Abwasser angesetzt wird. Möglich ist auch der Einsatz einer belasteten Suspension, eines aktivierten Schlammes oder einer käuflichen Animpfmischung um die benötigte Mikrobiologie zu erhalten. Das Vorhandensein einer verwendbaren Biologie ist durch Messen eines BSB-Wertes der Probe zu beweisen. Steigt die Abbaurate mit zunehmender Adaptionszeit auf ein stabiles Niveau spricht dies für eine erfolgreiche Adaption des Animpfmaterials.

Verdünnungsmethode (DIN EN 1899-1, ISO 5815, Standard Methods 5210 B)

(V1) **Phosphat-Pufferlösung, pH 7.2**

8,5 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 21,75 g Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), 33,4 g Dinatriumhydrogenphosphat-heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) und 1,7 g Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in etwa 500 mL Wasser lösen. Auf 1000 mL verdünnen und mischen

(V2) **Magnesiumsulfat-heptahydrat, Lösung 22,5 g/L**

22,5 g Magnesiumsulfat-heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) in Wasser lösen. Auf 1000 mL verdünnen und mischen

(V3) **Calciumchlorid, Lösung 27,5 g/L**

27,5 g wasserfreies Calciumchlorid (CaCl_2) (oder eine äquivalente Menge, wenn das Hydrat verwendet wird) in Wasser lösen, auf 1000 mL verdünnen und mischen

(V4) **Eisen(III)-chlorid-hexahydrat, Lösung 0,25 g/L**

0,25 g Eisen(III)-chlorid-hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), in Wasser lösen. Auf 1000 mL verdünnen und mischen

(V5) **Glucose-Glutaminsäure, Standardlösung**

Wasserfreie D-Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) und L-Glutaminsäure ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$) bei $(105 \pm 5)^\circ\text{C}$ 1 h trocknen. (150 ± 1) mg von jeder Substanz einwiegen, in Wasser lösen, auf 1000 mL verdünnen und mischen. Der theoretische Sauerstoffbedarf dieser Lösung beträgt 307 mg/L Sauerstoff (der empirische BSB_5 beträgt 210 ± 40 mg/L). Die Lösung unmittelbar vor Gebrauch herstellen und Reste davon am Ende des Arbeitstages verwerfen. Die Lösung kann auch in kleinen Anteilen eingefroren werden. Die aufgetaute Lösung muß unmittelbar nach dem Auftauen verwendet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Standard Methods for Examination of Water and Wastewater – BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND – 5210D – 19th Edition 1995
- [2] DIN EN 1899-1 – Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs nach n Tagen (BSB_n) – Teil 1: Verdünnungs- und Impfverfahren nach Zugabe von Allylthioharnstoff – DEV 43. Lieferung 1999
- [3] DIN EN 1899-2 – Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs nach n Tagen (BSB_n) – Teil 2: Ververfahren für unverdünnte Proben – DEV 43. Lieferung 1999
- [4] Vorschlag für ein Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-, und Schlammuntersuchung – Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs in n Tagen (BSB_n) in einem Respirometer – Erweiterung des Verfahrens nach DIN EN 1899-2 H55 – DEV 46. Lieferung 2000.
- [5] DIN 38409 Teil 51 – Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs in n Tagen nach dem Verdünnungsprinzip (Verdünnungs- BSB_n) (Gruppe H) H51– DEV 18. Lieferung 1987)
- [6] DIN 38409 Teil 52– Bestimmung der Sauerstoffzehrung in n Tagen (Gruppe H) H52– DEV 19. Lieferung 1987)