

Stabiliteit met gesloten respirometer

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Monsterbehandeling	3
4	Apparatuur en materiaal	3
4.1	<i>Apparatuur</i>	3
4.2	<i>Materiaal</i>	4
5	Reagentia en oplossingen	4
5.1	<i>Reagentia</i>	4
5.2	<i>Oplossingen</i>	4
6	Analyseprocedure	5
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Volumebepaling reactor</i>	5
6.3	<i>Analyseprocedure</i>	5
7	Berekeningen	6
7.1	<i>Blanco correctie</i>	6
7.2	<i>Grafische weergave</i>	6
7.3	<i>Berekening zuurstofverbruik</i>	7
7.4	<i>Beoordeling resultaten</i>	8
8	Controle analyses	8
9	Referenties	9

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt de procedure CMA/2/IV/25 van **november 2014**.

Deze procedure is van toepassing voor alle matrixtypes met uitzondering van vloeibare monsters met een droge stof gehalte van < 2%.

Deze methode beschrijft een procedure voor de bepaling van de stabiliteit van monsters die als meststof of bodemverbeterend middel worden aangewend, door het zuurstofverbruik onder welbeschreven condities te meten in een gesloten respirometer.

2 PRINCIPE

Bij de gesloten respirometrische test wordt 10 à 20 g monster gemengd met 200 ml gebufferd mineraal medium. Dit mengsel wordt gedurende 5 dagen permanent geschud in een recipiënt dat afgesloten is met een druksensor. Door verbruik van zuurstof en doordat het gevormde CO₂ uit de lucht wordt weggenomen door NaOH-korrels in een bekertje, resulteert de microbiële activiteit in een drukdaling. De hoogte van deze drukdaling staat uiteraard in verhouding tot de hoogte van de microbiële activiteit.

3 MONSTERBEHANDELING

De monsterconservering is beschreven in CMA/1/B en de monstervoorbehandeling in CMA/5/B.1.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Geklimatiseerde ruimte met temperatuur van 20°C ± 2°C
- 4.1.2 Schudtoestel (120 tpm)
- 4.1.3 Gesloten respirometer met drukmeetkop, adapter en controller (zie Figuur 1)
- 4.1.4 Glazen fles van 1000 ml waarop adapter en drukmeetkop passen
- 4.1.5 pH meter
- 4.1.6 Analytische balans



Figuur 1: Foto van een gesloten respirometer met drukmeetkop en adapter

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Maatkolven
- 4.2.2 Pipetten
- 4.2.3 Trechter
- 4.2.4 Zeef met een maaswijdte van 10 mm

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 REAGENTIA

All gebruikte reagentia hebben een *pro analyse* zuiverheidsgraad.

- 5.1.1 Gedestilleerd of gedemineraliseerd water, vrij van toxische substanties
- 5.1.2 Watervrij kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4)
- 5.1.3 Watervrij dikaliumdiwaterstoffosfaat (K_2HPO_4)
- 5.1.4 Dinatriumwaterstoffosfaat dihydraat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 5.1.5 Ammoniumchloride (NH_4Cl)
- 5.1.6 Magnesiumsulfaat heptahydraat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 5.1.7 Calciumchloride dihydraat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 5.1.8 Ijzer(III)chloride hexahydraat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 5.1.9 Nitrificatie-inhibitor NTH 600 (N-Allylthioureum)
- 5.1.10 Waterstofchloride (HCl), geconcentreerd
- 5.1.11 Zuivere zuurstof (industriële zuurstof met zuiverheid meer dan 99%)
- 5.1.12 Koolstof dioxide absorbens, bij voorkeur natronkalk korrels met indicator

5.2 OPLOSSINGEN

- 5.2.1 Minerale oplossing A: Los 8.5 g KH_2PO_4 , 21.75 g K_2HPO_4 , 33.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 2.0 g NH_4Cl op in 1 liter gedemineraliseerd water.
- 5.2.2 Minerale oplossing B: Los 22.50 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ op in 1 liter gedemineraliseerd water.
- 5.2.3 Minerale oplossing C: Los 36.40 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ op in 1 liter gedemineraliseerd water.
- 5.2.4 Minerale oplossing D: Los 0.25 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ op in 1 liter gedemineraliseerd water.
- 5.2.5 Mineraal medium: Vul een maatkolf van 1000 ml voor de helft met gedemineraliseerd water. Voeg achtereenvolgens 10 ml van minerale oplossing A toe, en 1 ml van oplossing B,

C en D. De pH, indien nodig, bijstellen met HCl tot $\text{pH } 6.5 \pm 0.2$. Leng aan met gedemineraliseerd water tot de maatstreep.

5.2.6 Verdunde HCl oplossing e.g. 1:10

5.2.7 Allylthiouremoplossing 5 g/l: Los 0.5 g ATU op in 100 ml gedemineraliseerd water.

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 MONSTERVERVOORBEREIDING

Het monster (minimaal 1 l) dient gezeefd te worden over een zeef met een maaswijdte van 10 mm. De fractie <10 mm wordt gebruikt voor het uitvoeren van de respiratietest.

Opmerking: Vloeibare monsters welke geen deeltjes > 10 mm bevatten, dienen niet gezeefd te worden.

6.2 VOLUMEBEPALING REACTOR

- Bepaal bij ingebruikname van de reactiefles gravimetrisch het werkelijk volume van de reactiefles.
- Vul de fles volledig met water en monteer het sluitstuk alsook de drukmeetkop. Weeg de hoeveelheid water in de reactiefles.
- Het gemiddelde volume van de verschillende flessen (V_{reactor}) wordt gebruikt voor de verdere berekeningen.

6.3 ANALYSEPROCEDURE

- Vul de reactor m.b.v. een trechter met een hoeveelheid gezeefd monster (overeenkomend met een droog equivalent van ongeveer 10 gram) en weeg het exacte gewicht tot op 0.1 g (m_{monster}).

Opmerkingen: Normaliter bedraagt deze hoeveelheid 15 à 20 gram. Bij vermoeden van een onstabiel monster wordt de hoeveelheid verlaagd tot 10 à 15 gram. Bij vloeibare monsters kan een intake tot 40 gram nodig zijn.

- Voeg 200 ml mineraal medium toe ($V_{\text{mineraal medium}}$).
- Voeg 1.25 ml allylthiouremoplossing toe.

Opmerking: Bij opstart van de proef dient de pH bijgesteld te worden tot pH 7 à 7.5 om op het einde van de proef gesitueerd te zijn tussen pH 5.8 en 8.2.

- Vul het sluitstuk met 2.5 g Natronkalk en sluit het af met een zwart rubberen buisje. Draai de drukmeetkop vast op het sluitstuk.

Opmerking: Op het einde van de proef dienen nog voldoende witte (niet verkleurde) Natronkalk korrels aanwezig te zijn.

- Purgeer de headspace van de reactor met zuivere zuurstof. Het dampje wordt hierbij tot net boven het vloeistofoppervlak gebracht (niet in de vloeistof). De headspace moet gedurende ± 15 sec gepurgeerd worden. Na het purgeren onmiddellijk de drukmeetkop met het sluitstuk op de reactiefles monteren en vastdraaien.
- Plaats het geheel op de schudtafel en schud (120 tpm) gedurende ± 15 minuten om de lag fase te verminderen. Stop het toestel en draai de kop van de reactor even open en weer dicht (instellen evenwichtstoestand).

- Start de reactor op met de controller van de respirometer. Voor de juiste werking van de gesloten respirometer wordt verwezen naar de handleiding van de fabrikant. Een tijdsduur van 5 dagen wordt ingesteld. Tijdens deze periode worden 360 metingen geregistreerd gelijk verdeeld over deze 5 dagen.
- Schudden (120 tpm) gedurende 5 dagen.
- De mogelijkheid bestaat om een dagelijkse aflezing van de drukdaling uit te voeren.

Opmerking: Indien de limietwaarde van -500 hPa benaderd wordt voor een reactor, is het noodzakelijk om de drukmeetknop even los te draaien en opnieuw te sluiten. Hierdoor zal de maximaal bereikte onderdruk weggewerkt worden en zal de reactor terug op omgevingsdruk gebracht worden. Het openen van de reactor dient wel in rekening gebracht te worden voor de bepaling van de totale drukvermindering.

Opmerking: Bij een optimaal verloop van de proef dient de pH waarde na 5 dagen gesitueerd te zijn tussen pH 5.8 – 8.2; pH controle is aangewezen.

- Breng op het einde van de proef (na 5 dagen) de gegevens van de (cumulatieve) drukdaling t.o.v. de tijd van de respirometer over naar de computer, volgens de richtlijnen van de fabrikant.
- Voer bij elke reeks een blanco meting uit. De blanco meting doorloopt hetzelfde proces als een monster, met dit verschil dat er geen monster wordt toegevoegd in de reactor.

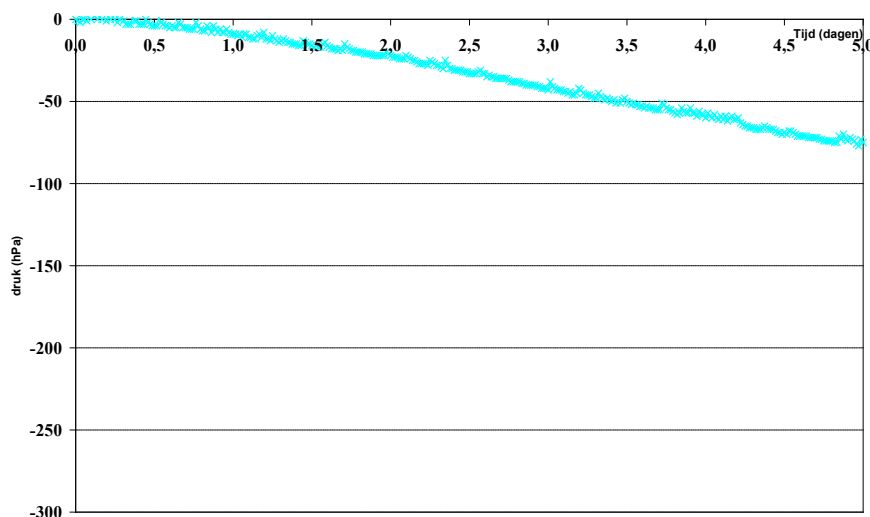
7 BEREKENINGEN

7.1 BLANCO CORRECTIE

- Breng de bekomen meetwaarden in vermindering met de overeenkomstige blanco waarden.

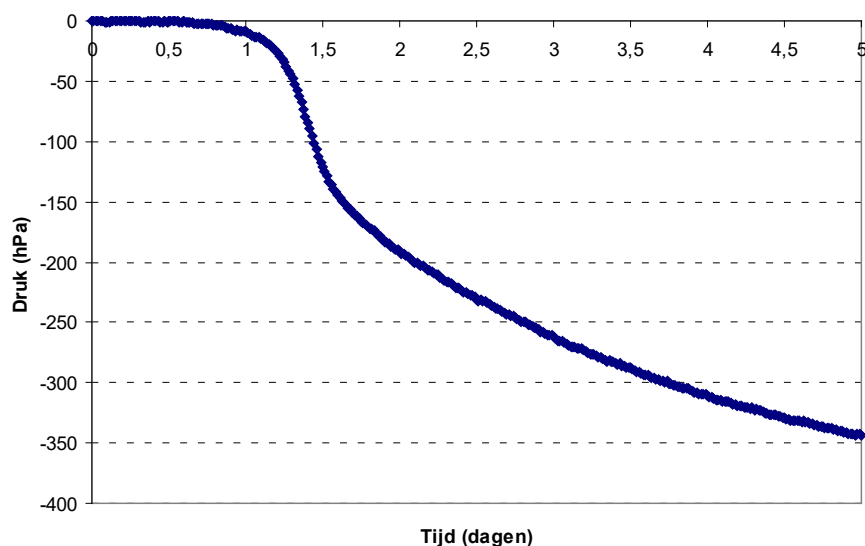
7.2 GRAFISCHE WEERGAVE

- Zet een grafisch verloop uit van de cumulatieve drukdaling i.f.v. tijd waarbij een standaard X-as van 0 tot 5 dagen wordt gebruikt en een standaard Y-as van 0 tot -300 hPa.



Figuur 2: Voorbeeld van de cumulatieve drukdaling i.f.v. de tijd

Opmerking: Bij actieve stalen kan men de Y-as vergroten.



Figuur 3: Voorbeeld van de cumulatieve drukdaling i.f.v. de tijd

7.3 BEREKENING ZUURSTOFVERBRUIK

De hoeveelheid zuurstofverbruik (n_{O_2}) in mmol/kg OS/uur bedraagt

$$n_{O_2} = \frac{\left[\frac{(p_{begin} - p_{eind})}{R (273.15 + T)} \times V \right]}{(m_{monster} \times \% OS) (N \times 24)} \times 10^4$$

waarbij

p_{begin} Druk na blancocorrectie op het tijdstip t_{begin} i.e. tijdstip in dagen waarbij de reactie start (na lagfase), in hPa

p_{eind} Druk na blancocorrectie op het tijdstip ($t_{begin} + 3.5$ dagen), in hPa

R 8.31 J/mol K

T Omgevingstemperatuur in °C

V Volume van de headspace in ml
 $= V_{reactor} - V_{mineraal\ medium} - V_{monster} - V_{natronkalk + inhibitor}$

$V_{reactor}$ effectieve volume van de reactiefles in ml

$V_{mineraal\ medium}$ toegevoegd volume mineraal medium in ml

$V_{monster}$ wordt gelijkgesteld aan het monstergewicht ($m_{monster}$) in ml

$V_{natronkalk + inhibitor}$ = 2 ml

$m_{monster}$ Massa vers monster in g

% Vocht Vochtgehalte, bepaald volgens CMA/2/IV/1 in g/100 g vers monster

% OS	Organische stof, bepaald volgens CMA/2/IV/3 in g/ 100 g vers monster
N	Aantal dagen (standaard 3.5 dagen)

Het vochtgehalte en het gehalte aan organische stof wordt bepaald op de fractie < 10 mm.

Het tijdstip t_{begin} is het moment waarbij de reactie (i.e. zuurstofopname) start en waarbij dus een significante drukdaling optreedt (i.e. daling van de curve). Het vastleggen van het tijdstip t_{begin} is grotendeels gebaseerd op 'expert judgement', echter volgende richtlijnen kunnen hiervoor gehanteerd worden:

- Het tijdstip t_{begin} is gelegen tussen 0 en 1.5 dagen.
Opmerking: Indien de reactie na 1.5 dag niet is opgestart, dient een grotere hoeveelheid monster in bewerking genomen te worden of kan er een fout zijn opgetreden in de meetopstelling.
- Uit de grafische weergave kan afgeleid worden op welk tijdstip de reactie ongeveer start.
Bv. In Figuur 2 start de reactie op ± 0.5 dagen, bij Figuur 3 op ± 0.8 dagen.
- Op basis van blanco gecorrigeerde drukwaarden van de lagfase van diverse monsters (Bv. 10) of uit controlekaartgegevens wordt een vaste overschrijdingswaarde vastgelegd. Uit de meetgegevens (blanco gecorrigeerd) van de lagfase wordt van x monsters $3 \times$ standaard deviatie berekend. Deze $3 \times$ standaard deviatie waarde wordt weerhouden als het significante drukverschil waarbij wordt aangenomen dat de reactie start. Deze waarde wordt als vaste overschrijdingswaarde gehanteerd voor alle te analyseren monsters.
- De initiële drukwaarde van het te analyseren monster verminderd met $3 \times$ standaard deviatie wordt weerhouden als p_{begin} met bijhorende t_{begin}
Toetsing van de bekomen resultaten met de grafische weergave is aanbevolen.
- Als streefwaarde voor de $3 \times$ standaard deviatie wordt een waarde kleiner dan 10 hPa vooropgesteld.

7.4 BEOORDELING RESULTATEN

Een voorlopig voorstel naar klassenindeling op basis van de Oxitop® resultaten werd door VLACO vzw geformuleerd en is weergegeven in Tabel 1.

Zuurstofverbruik	Typering
< 5 mmol O ₂ /kg OS/u	Heel stabiel, weinig actief
5 – 10 mmol O ₂ /kg OS/u	Stabiel, beperkt actief
10 – 15 mmol O ₂ /kg OS/u	Matig stabiel, actief
15 – 25 mmol O ₂ /kg OS/u	Relatief jong, vrij sterk actief
> 25 mmol O ₂ /kg OS/u	Jong, heel actief, onstabiel

Tabel 1: Voorstel klassenindeling bij Oxitop® resultaten

Als kwaliteitsdoelstelling zou de waarde van 10 mmol O₂/kg OS/u worden vooropgesteld, en 15 mmol O₂/kg OS/u als normwaarde.

8 CONTROLE ANALYSEN

- Controle van de respirometer kan uitgevoerd worden met een pneumatische tester (commercieel beschikbaar).

9 REFERENTIES

- NBN EN ISO 14851:2019 Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium - Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer (ISO 14851:2019)
- Dr. A.H.M. Veeken, V. de Wilde en Dr. H.V.M. Hamelers, *OxiTop® measuring system for standardised determination of the respiration rate and N-mineralisation rate of organic matter in waste material, compost and soil*, Wageningen University & NMI, 2003