



کمیسیون استاندارد کیفیت آب - ارزیابی عوامل مهارکننده سرعت مصرف اکسیژن در لجن فعال

رئیس سمت یا نمایندگی

قائمی ، ناصر

دانشکده علوم دانشگاه تهران

(دکترای شیمی)

اعضاء

پرور ، زهره

دانشگاه تهران

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

آب

جهانتاب ، سهیلا

و فاضلاب تهران

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

دانشگاه تهران

شریعت پناهی ، شقایق

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

مرکز

صدیق ابراهیم نیا ، پریدخت

تحقیقات نیرو

(فوق لیسانس شیمی)

سازمان حفاظت

عطاران ، ماندانا

از محیط زیست

(فوق لیسانس شیمی)

عضو

فیروزی ، فیروزه

هیأت علمی دانشگاه شهید بهشتی

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

سازمان حفاظت از محیط

قائمی ، نسرین

زیست

(فوق لیسانس تغذیه)

قاهری ، محمود

عضو هیأت علمی سازمان پژوهشها



(فوق لیسانس شیمی)

مرکز تحقیقات نیرو

منصوری ، ملک محمد

(لیسانس محیط زیست)

هاتفی ، میترا

شرکت داروگر - کف

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

دبیر

قبادی دانا ، مریم

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(لیسانس میکروبیولوژی)

فهرست مندرجات

صفحه

پیشگفتار

ب

مقدمه

پ

۱ هدف و دامنه کاربرد

۱

۲ اصطلاحات و تعاریف

۱

۳ اساس آزمون

۲

۴ مواد لازم

۳

۵ وسایل لازم

۵

۶ روش اجرای آزمون

۶



۷ بیگان نتایج	۷
۸ درستی و صحت نتایج	۸
۹ گزارش آزمون	۸
پیوست الف	۱۰
پیوست ب	۱۴

پیشگفتار

استاندارد کیفیت آب - ارزیابی عوامل مهار کننده سرعت مصرف اکسیژن در لجن فعال ، توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در جلسه چهل و یکمین کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۱/۱۲/۱۰ ورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند ۱



ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات ، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود ، در هنگام تجدیدنظر ، در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد .

در تهیه و تجدیدنظر این استاندارد ، سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه ، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود .

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد بکار رفته به شرح زیر است :

- *ISO 8192-1986 Water quality_Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge 1986*



مقدمه

این استاندارد ، روشی را جهت ارزیابی سمیت بالقوه مواد مخلوط یا فاضلاب در لجن فعال معرفی می‌کند . اطلاعات بدست آمده از این روش می‌تواند اثر ماده مورد آزمون بر جمعیت‌های باکتریایی (که حاوی انواع مختلف باکتریهاست) در محیط آبی ، مخصوصاً در سیستم‌های تصفیه بیولوژیکی هوایی ، را ارزیابی نماید.

کیفیت آب - ارزیابی عوامل مهار کننده سرعت مصرف اکسیژن در لجن فعال

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ، تعیین اثرمهراری ماده مورد آزمون ، بر مصرف اکسیژن توسط میکروارگانیسمهای موجود در لجن فعال میباشد . اثر مهراری میتواند ، روی فرآیند تنفس و نیتریفیکاسیون نیز مؤثر باشد .

این روش ، اطلاعاتی در مورد اثر مهراری یا اثر تحریکی مواد مورد آزمون ، بر میکروارگانیسمهای لجن فعال بعد از دوره کوتاه تماس (تا حدود ۱۸۰ دقیقه) ارائه می نماید .

این روش برای مواد شیمیایی که در شرایط آزمون محلول هستند کاربرد دارد ، البته باید دقت لازم در مورد موادی که حلالیت آنها در آب کم است و یا موادی که بصورت فیزیکی شیمیایی اکسیژن را تولید یا آنرا مصرف میکنند بعمل آید .

روش : الف مربوط به شرایط آبهای سطحی است ، روش : ب مربوط به شرایط سیستم های تصفیه بیولوژیک فاضلاب است . نتایج بدست آمده از این دو روش ممکن است متفاوت باشد . ضروری است که در گزارش آزمون نوع روش انتخاب شده مشخص شود .

برای مواد فرار روش اول مناسب است میتوان از این روش برای آزمون های فاضلاب هم استفاده نمود .

یادآوری - نتایج آزمون با مواد فرار و نا محلول باید با توجه بیشتری تفسیر شود .

۴-۱ نتایج حاصل از این آزمون فقط باید بعنوان راهنمایی برای ارزیابی سمیت احتمالی مواد مورد آزمون در نظر گرفته شود زیرا ممکن است لجنی که از منابع مختلف نمونه برداری شده از نظر ترکیب و تراکم باکتریایی متفاوت باشد . همچنین آزمون های آزمایشگاهی نمیتوانند بدرستی نمایانگر شرایط محیطی باشند . برای مثال هیچ گزارشی از سازش طولانی مدت میکروبهای لجن فعال با مواد مورد آزمون یا موادی که ممکن است جذب لجن شوند و در دوره زمانی طولانی تر از زمانی که در این آزمون آمده غلظت سمی ایجاد کند ، موجود نمیباشد .

۲ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و یا / واژه‌ها با تعاریف زیر بکار می‌رود:

۱-۲ لجن فعال

توده بیولوژیک تجمع یافته (لخته) که هنگام تصفیه فاضلاب در نتیجه رشد باکتریها و دیگر میکروارگانیسمها در حضور اکسیژن محلول تولید می‌شود.

۲-۲ مواد جامد معلق

مواد جامدی که با روش صاف کردن یا سانتریفوژ کردن از لجن فعال جدا شده و در دمای حدود ۱۰۰ درجه سلسیوس و تا رسیدن به وزن ثابت، خشک شود. این کمیت که بر حسب گرم در لیتر یا میلی‌گرم در لیتر بیان می‌شود بعنوان وزن خشک در واحد حجم در نظر گرفته می‌شود.

۳-۲ سرعت جذب اکسیژن

میزان مصرف اکسیژن بوسیله میکروارگانیسمهای لجن فعال در واحد حجم لجن در واحد زمان است. این کمیت بر حسب میلی‌گرم در لیتر و در ساعت بیان می‌شود.

۴-۲ سرعت ویژه جذب اکسیژن

میزان مصرف اکسیژن بوسیله میکروارگانیسمهای لجن فعال بر حسب واحد توده میکربی (مواد جامد معلق) در واحد زمان است. این کمیت بر حسب میلی‌گرم بر گرم و در ساعت بیان می‌شود.

۵-۲ مهار جذب اکسیژن

کاهش سرعت مصرف اکسیژن لجن فعال در حضور مواد مورد آزمون با مخلوط مشابهی که فاقد مواد مورد آزمون است مورد مقایسه قرار می‌گیرد. این کمیت بصورت درصد بیان می‌شود.

۶-۲ محدوده سمیت

محدوده غلظت ماده مورد آزمون که از صفر تا صد درصد مصرف اکسیژن را مهار می‌کند.

۷-۲ EC50

غلظت مؤثری از ماده مورد آزمون که در مقایسه با نمونه کنترل (شاهد) مصرف اکسیژن را به میزان ۵۰ درصد مهار می‌نماید. غلظت مؤثر از طریق محاسبه و یا درون یابی بدست می‌آید.

یادآوری ایمنی: لجن فعال و فاضلاب ممکن است بالقوه حاوی مواد سمی و ارگانیسمهای بیماریز باشد بنابراین لازم است هنگام کار احتیاط لازم صورت پذیرد.



۳ اساس آزمون

لجن فعال در حضور سوپسترای مناسبی که قابلیت تجزیه بیولوژیکی را داشته باشد سریعاً اکسیژن را مصرف می‌نماید که سرعت آن علاوه بر سایر عوامل به تراکم میکروارگانیسمها نیز بستگی دارد. افزایش غلظت ماده سمی مورد آزمون می‌تواند موجب کاهش سرعت جذب اکسیژن شود. سرعت جذب اکسیژن با استفاده از الکتروود اکسیژن اندازه‌گیری می‌گردد. درصد مهار کنندگی مصرف اکسیژن بوسیله مقایسه با نمونه کنترل که فاقد مواد مورد آزمون است قابل ارزیابی است. حساسیت لجن فعال می‌تواند با ماده مرجع مناسب کنترل شود. میزان جذب اکسیژن ناشی از فرآیندهای فیزیکیوشیمیایی (غیر بیولوژیکی) نیز قابل ارزیابی می‌باشد.

یادآوری - کلیه مواد و معرفها، باید از خلوص لازم برای آزمایشهای میکروبیولوژی برخوردار باشند و مصرف آنها، باعث کاهش دقت تشخیص نگردد. آب مورد استفاده باید آب مقطر یا آب دیونیزه و عاری از هر گونه موادی باشد که مانع رشد میکروارگانیسمها در شرایط آزمون می‌شود. اندازه‌گیری‌های pH باید با استفاده از pH متر و در دمایی که در آزمون ذکر شده انجام شود.

۴ مواد لازم

۴-۱ محیطهای کشت - محلول ذخیره (فاضلاب تهیه شده با غلظت ۱۰۰ برابر)

ترکیبات	مقدار
پپتن	۱۶ گرم
عصاره گوشت ^۱	۱۱ گرم
اوره	۳ گرم
سدیم کلرید (NaCl)	۰/۷ گرم
کلسیم کلرید	۰/۴ گرم
دوملکولول آب (CaCl ₂ .2H ₂ O)	
منیزیم سولفات	۰/۲ گرم
هفت ملکول آب (MgSO ₄ .7H ₂ O)	
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K ₂ HPO ₄)	۲/۸ گرم
آب	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : ترکیبات فوق را در آب حل نموده سترون نمایید ، pH این محلول باید $7/5 \pm 0/5$ باشد اگر محیط آماده شده فوراً استفاده نمی‌شود باید آنرا در تاریکی و در دمای بین صفر تا ۴ درجه سلسیوس نگهداری نمود. محیط آماده را حتی در شرایطی که تغییراتی در ترکیباتش ایجاد نمی‌شود ، نباید بیشتر از یک هفته نگهداری نمود .

1-meat extract

یاد آوری - محیط کشت فوق را برای نگهداری سترون کنید، یا اینکه کمی قبل از انجام آزمون پپتن و عصاره گوشت را اضافه کنید. قبل از استفاده مطمئن شوید که محیط کاملاً مخلوط شده است. در صورت لزوم pH را تنظیم کنید.

۲-۴ مواد مورد آزمون - محلول ذخیره

مواد مورد آزمون نمی‌توانند ترکیبات شیمیایی خالص، مخلوطی از ترکیبات یا فرآورده‌های شیمیایی، و یا پساب‌ها باشند. رقت مناسبی از مواد مورد آزمون در آب را بعنوان محلول ذخیره تهیه کنید (بطور مثال یک گرم در لیتر یا ۱۰ گرم در لیتر). پساب را می‌توان بدون تهیه رقت، مورد استفاده قرار داد. مواد نا محلول مورد آزمون را یا مستقیماً به ظروف آزمون اضافه نموده و یا یک تعلیق و یا پاشیده از آنها تهیه نمود.

۳-۴ مواد مرجع - محلول ذخیره

مقدار مناسبی از مواد مرجع را در آب حل کنید. یک گرم از ۳ و ۵ دی - کلروفنل در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مناسب است.

۴-۴ محلول ایزوتونیک

<u>ترکیبات</u>	<u>مقدار</u>
نمک طعام یا سدیم کلرید (NaCl)	۵ گرم
منیزیم سولفات با هفت ملکول آب (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	۰/۱۲ گرم
آب	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : ترکیبات فوق را در آب حل نمایید.

۵-۴ لجن فعال

برای مصارف عمومی لجن فعال باید از تانک‌های هوادهی که بطور معمول برای تصفیه پساب خام طراحی شده‌اند، برداشت شود. بسته به هدف آزمون می‌توان از هر نوع لجن فعال با غلظت مناسب استفاده نمود (برای مثال ۲-۴ گرم در لیتر) بهر حال لجن فعالی که از تصفیه خانه‌های مختلف برداشت شده، ممکن است خصوصیات و حساسیت‌های مختلفی داشته باشد. در صورت امکان لجن فعال را هوادهی کنید و حداکثر تا ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری، آنرا مورد استفاده قرار دهید. اگر

این امکان وجود ندارد ، روزانه به لجن فعال سوبسترای مناسبی (برای مثال محیط کشت بند ۴-۱) اضافه کنید . در صورت ضرورت ، ذرات درشت را در دوره کوتاهی ، بطور مثال ۱۵ دقیقه ته نشین کرده و لایه رویی حاوی مواد جامد ریزتر را برای استفاده ، سرریز نمایید . همچنین می‌توان لجن را چند ثانیه با مخلوطکن مخلوط کرد . در صورت احتمال وجود مواد مہار کننده در لجن ، می‌توان آن را بدین ترتیب شستشو داد :

ابتدا لجن را بمدت ۱۰ دقیقه و با دور تقریباً ۱۰,۰۰۰ متر بر مجذور ثانیه معادل با دور درثانیه سانتریفوژ کنید لایه رویی را دور بریزید مجدداً لجن را با استفاده از آب عاری از کلر یا محلول شستشوی ایزوتونیک (بند ۴-۴) بصورت سوسپانسیون درآورید . این سوسپانسیون را دوباره سانتریفوژ کنید و لایه رویی را دور بریزید . در صورت لزوم مراحل شستشو و سانتریفوژ را تکرار کرده ، وزن خشک نمونه لجن را تعیین کنید . سرانجام لجن را در آب عاری از کلر یا در محلول ایزوتونیک دوباره بصورت سوسپانسیون در آورید ، تا غلظت مناسبی از لجن فعال (برای مثال حدود ۳ گرم مواد جامد معلق در لیتر) بدست آید . در همه موارد منشاء ، غلظت و هر نوع آماده سازی لجن فعال باید درگزارش آزمون شرح داده شود .

۵ وسایل لازم

۱-۵ **ظروف آزمایش :** بطری *BOD* یا ظروف ارلن مایر با درپوش ، با گنجایش ۳۰۰ میلی‌لیتر و یا بشر با گنجایش ۱,۰۰۰ میلی لیتر. قبل از اندازه‌گیری غلظت اکسیژن ، در بطریهای *BOD* باید منفذ مناسبی برای الکتروود اکسیژن در درپوش بطری ایجاد کرد . به منظور جلوگیری از ریختن مایع به هنگام قرار دادن الکتروود اکسیژن ، می‌توان از قیف یا لوله شیشه‌ای در میان درپوش استفاده نمود (به شکل شماره ۱ و ۲ توجه کنید) .

۲-۵ **دستگاه اندازه‌گیری اکسیژن :** الکتروود اکسیژن مناسب همراه با دستگاه ثبت کننده

۳-۵ همزن مغناطیسی

۴-۵ **وسيله هوادهي :** در صورت نیاز هوا را از میان صافی مناسبی عبور دهید تا گرد و غبار و چربی هوا گرفته شود . سپس هوا را از میان بطری‌های شستشو حاوی آب عبور دهید تا هوا مرطوب‌شود . لوله‌های آزمایش را با پدیت پاستور یا با وسایل دیگری که جاذب مواد شیمیایی نباشد هوادهی کنید .

۶ روش اجرای آزمون کلیات ۱-۶

در صورت امکان آزمون را در دمای ثابت در حدود 20 ± 2 درجه سلسیوس و در هوایی غبار و بخارات سمی باشد، انجام دهید.

۲-۶ مخلوطهای آزمون

در لوله‌های آزمایش (بند ۶-۱) مخلوط‌های آزمون (F_T) که شامل آب رقیق‌کننده، محیط کشت مصنوعی و مواد مورد آزمون است را طوری تهیه کنید تا رقت‌های مختلف و مشخص مورد نیاز را بدست آورید. pH را حدود 0.5 ± 7 تنظیم کنید. ماده تلقیحی را اضافه و آنرا با آب رقیق کرده تا حجم‌هایی بدست آید. در صورت بررسی اثر مهارکنندگی pH ، نیازی به تنظیم pH نمی‌باشد.

۳-۶ مخلوطهای مرجع

در صورت نیاز مخلوطهای F_R را با ترکیب مرجع مناسب به همان روش تهیه کنید (بند ۷-۷)

۴-۶ کنترل شاهد

حداقل یک کنترل شاهد (F_B) حاوی حجم مساوی از لجن فعال و محیط کشت (مانند آنچه در مخلوط آزمایش وجود دارد) تهیه کنید. کنترل شاهد فاقد مواد مورد آزمون است. مانند مخلوط آزمون، کنترل شاهد را با آب به حجم برسانید.

۵-۶ کنترل فیزیکی شیمیایی :

در صورت نیاز مخلوط فیزیکی شیمیایی (F_{PC}) را برای اندازه‌گیری مصرف اکسیژن بطریقه فیزیکی شیمیایی تهیه نمایید. این مخلوط‌ها حاوی مواد مورد آزمون، محیط کشت و آب بوده و فاقد لجن فعال می‌باشد. در صورت نیاز یک بازدارنده‌ای مانند جیوه کلرید را به مخلوط اضافه نموده تا مانع مصرف اکسیژن بطریقه بیولوژیکی شود.

۶-۶ آزمون مقدماتی

این آزمون برای تخمین محدوده غلظت‌های مورد نیاز برای آزمون نهایی جهت تعیین مهار مصرف اکسیژن انجام می‌شود. آزمون، حداقل با استفاده از سه غلظت مواد مورد آزمون: بطور مثال ۰/۱، ۰/۰۱، میلی گرم در لیتر شاهد کنترل و در صورت نیاز، کنترل فیزیکی شیمیایی با بالاترین غلظت مواد مورد آزمون انجام می‌شود. در صورت امکان پایین‌ترین غلظت مواد مورد آزمون مورد استفاده قرار می‌گیرد که نباید تأثیری بر مصرف اکسیژن داشته باشد.

۶-۷ آزمون نهایی
این آزمون با استفاده از محدوده غلظتی که از آزمون مقدماتی بدست آمده ، انجام می‌شود . لازم است که در یک سری لگاریتمی ، حداقل از پنج غلظت که یکی از آنها کنترل شاهد است استفاده شود . اگر در آزمون مقدماتی در کنترل فیزیکی شیمیایی اکسیژنی مصرف نشده باشد نیاز نیست که در آزمون نهایی این کنترل تکرار شود .

حساسیت لجن ممکن است با استفاده از ماده مرجعی مثل ۳ و ۵ دی‌کلروفلنل کنترل شود . اگر از یک منبع تلقیحی استفاده می‌کنید ، در صورت امکان حساسیت لجن را برای هر سری آزمون یا برای یک دوره زمانی ، بررسی کنید .

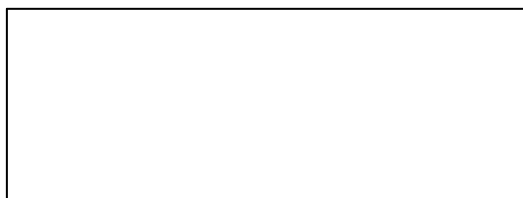
۶-۸ تعیین و شناسایی

همه مخلوط‌ها را تا حد امکان هوادهی کنید (مخلوط‌های بند ۲-۷ ، ۳-۷ ، ۴-۷ و ۵-۷) تا اینکه از اکسیژن اشباع شوند . طی دوره گرمخانه گذاری برای بدست آوردن مخلوط یکنواخت و نیز برای اندازه‌گیری اکسیژن بطور منظم و تکرارپذیر ، هم زدن بطریقه‌های اندازه‌گیری اکسیژن ضروری می‌باشد . دقت کنید که همه مخلوط‌ها در دمای یکسان (بطور معمول 20 ± 2 درجه سلسیوس) قرار گیرند و در طول آزمون دما تغییر عمده‌ای نکند .

برای روش الف (۱) غلظت اکسیژن را در هر مخلوط با الکتروود اکسیژن در فواصل زمانی مناسب اندازه‌گیری کنید (حداقل پنج بار در دوره زمانی سه ساعته آزمون) . برای روش ب ، بند الف (۲) سرعت کاهش غلظت اکسیژن محلول هر مخلوط را ، بعد از دوره‌های هوادهی ۳۰ دقیقه‌ای و در صورت نیاز سه ساعته با الکتروود اکسیژن اندازه‌گیری کنید . توجه داشته‌باشید که در مخلوط‌ها اکسیژن بحد فوق اشباع نرسد .

۷ بیان نتایج

سرعت مصرف اکسیژن در هر مخلوط مورد آزمایش را ، از روی بخش خطی نمودار غلظت اکسیژن بر زمان محاسبه کنید . سرعت مصرف اکسیژن را بر حسب میلی‌گرم در لیتر در ساعت ، یا میلی‌گرم در گرم در ساعت بیان کنید (برای اطلاعات بیشتر به پیوست مراجعه کنید) . درصد مهار مصرف اکسیژن (I) در هر غلظت از معادله زیر بدست می‌آید .



$$I = \frac{R_B - (R_T - R_{PC})}{R_B} \times 100$$

که در این معادله :

R_T سرعت مصرف اکسیژن توسط مخلوط مورد آزمون F_T
 R_B سرعت مصرف اکسیژن توسط کنترل شاهد F_B
 R_{PC} سرعت جذب اکسیژن توسط پدیده فیزیکی شیمیایی F_{PC} (شاهد)

نمودار درصد مهار مصرف اکسیژن را ، در مقابل لگاریتم غلظت مواد مورد آزمون رسم کنید . (نمودارمهار)

در روش ب بند الف (۲) نمودارهای مهاری برای هر دوره هوادهی مثلاً بعد از ۳۰ و ۱۸۰ دقیقه رسم می‌شود . غلظتی که مصرف اکسیژن را به میزان ۵۰٪ مهار کند ، از نمودار دورن یابی یا محاسبه کنید .

اگر اطلاعات مناسب در دسترس باشد با ضریب اطمینان ۹۵٪ $EC50$ ، شیب نمودار و مقادیر مناسب شروع مهار را مشخص کرده (مثلاً $EC10$ یا $EC20$) و پایان محدوده مهار (مثلاً ۹۰٪ یا $EC80$) را می‌توان تفسیر یا محاسبه نمود . نظر به اینکه اغلب نتایج آزمون تغییرپذیر می‌باشند . در بسیاری موارد بیان نتایج بصورت زیر کافی است مثلاً :

$EC50$	<	۱ mg/l
$EC50$		۱ - ۱۰ mg/l
$EC50$		۱۰ - ۱۰۰ mg/l
$EC50$	>	۱۰۰ mg/l

۸ درستی و صحت نتایج

در صورت امکان حساسیت لجن فعال را بوسیله ماده مرجع بررسی کنید .

در آزمون های بین آزمایشگاهی لجن فعال فا ضلاب خانگی ، $EC50$ ماده ۳ و ۵ دی‌کلروفنل در محدوده ۵ تا ۳۰ میلی گرم در لیتر است . اگر $EC50$ ماده مرجع در محدوده مورد نظر نباشد آزمایش را با استفاده از لجن فعالی که از منبع دیگری بدست آمده ، تکرار نمایید .

۹ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید شامل اطلاعات زیر باشد .
 الف - ذکر شماره استاندارد



- ب - ذکر روش بکار گرفته شده (روش الف یا ب)
- پ - نام ، ویژگیها و خواص ماده مورد آزمون
- ت - منبع ، غلظت و هر گونه آماده سازی لجن فعال
- ث - دمای آزمون
- ج - نام ماده مرجع و نتیجه اندازه گیری مهار با این ماده ($EC50$)
- چ - جذب اکسیژن غیر زیستی در پدیده فیزیکوشیمیایی (شاهد)
- ح - نتایج آزمون مخصوصاً $EC50$ و در صورت امکان اطلاعات آماری دیگر (بند ۸)
- خ - همه اطلاعات اندازه گیری شده و نمودار مهاری (بند ۸)
- د - تمام مشاهدات و انحراف از روش استاندارد که میتواند بر نتیجه تأثیر گذارد .

پیوست الف
(الزامی)
روش آزمون الف ۱
استفاده از غلظتهای کم لجن فعال :

غلظت لجن فعال در مخلوط آزمون پایین است (در حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی گرم مواد معلق جامد در لیتر) . مخلوطها فقط در ابتدای آزمون هوادهی می‌شوند . مخلوطهای آزمون اولیه را مطابق با جدول الف۱ آماده کنید .

در صورت امکان همه محلولها را در دمای ثابت $20 \pm 2^\circ C$ نگهداری و آزمون را هم در همین دما انجام دهید . قبل از اینکه مخلوطها آماده شوند ، محلولها باید تا جائیکه ممکن است با هوا اشباع شوند .

تمام مخلوطها را (بجز F_B) با افزودن حدود $2/3$ آب ، مواد مورد آزمون و محیط کشت در ظروف آزمایش تهیه نمایید . لجن فعال را به همه ظروف (بجز F_{PC}) بنوبت با فاصله زمانی ۵ دقیقه اضافه کرده ، هوادهی نموده و کاملاً مخلوط کنید . ظروف آزمایش را کاملاً با آب پر کنید . درب هر کدام از لوله‌ها را با درپوشی محکم ببندید و روی همزن مغناطیسی قرار داده و آن را روشن کنید . بعد از ۳۰ دقیقه اولین ظرف آزمایش را از روی همزن مغناطیسی برداشته ، درپوش آنرا بردارید . رابط و الکتروداکسیژن را وارد کنید و فوراً همزن را روشن صبر کنید تا تعادل برقرار شود . غلظت اکسیژن محلول را اندازه‌گیری کنید . سپس دوباره همزن را خاموش نموده الکتروداکسیژن را بجای درپوش اولیه طوری قرار دهید که حباب هوا تشکیل نشود و دوباره همزن را روشن کنید . بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از اضافه کردن لجن فعال ، این روش را بنوبت برای همه ظروف تکرار کنید . این روش را هر ۳۰ دقیقه یکبار بمدت ۳ ساعت ادامه دهید تا غلظت اکسیژن محلول به یک میلی گرم در لیتر برسد .

یادآوری - در کنترل شاهد مقدار لجن فعال مصرفی باید به میزانی باشد که باعث کاهش اکسیژن محلول از حالت اشباع (حدود ۹ میلی گرم در لیتر) به یک میلی گرم در لیتر در سه ساعت برسد . مقدار لجن فعال مصرفی را می‌توان قبلاً بررسی نموده ، تا غلظت نهایی لجن طوری تنظیم شود که فعالیت موردنیاز را تأمین کند .

برای هر مخلوط، نمودار غلظت اکسیژن محلول بر حسب زمان را رسم کنید . میزان تنفس R بصورت میلی گرم در لیتر و در ساعت بیان می‌شود . معادله زیر از بخش خطی نمودار بدست می‌آید .

$$R = \frac{\sigma_1 - \sigma_2}{\Delta t} \times 60$$

σ_1 = میزان غلظت اکسیژن، در ابتدای بخش خطی نمودار است که بصورت میلی گرم در لیتر اکسیژن محلول بیان می‌شود .



σ_2 = میزان غلظت اکسیژن، در انتهای بخش خطی نمودار است که بصورت میلی گرم در لیتر اکسیژن محلول بیان می شود.

Δt = فاصله زمانی بین دو اندازه گیری است که بر حسب دقیقه بیان می شود.

آزمون نهایی به همان روش آزمون مقدماتی انجام می شود. استفاده از حداقل پنج غلظت در هر سری لگاریتمی ضروری است. مثلاً ماده ای که در آزمون مقدماتی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کاملاً مهار کننده است، در یک میلی گرم در لیتر هیچ گونه مهاری ندارد، سری غلظتهای ۱ و ۲/۳ و ۵/۶ و ۱۰ و ۱۸ و ۳۲ و ۵۶ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر مناسب می باشد.

به تجربه ثابت شده که برای محاسبه نتایج آزمون می توان از اطلاعات آزمون مقدماتی و آزمون نهایی استفاده نمود.

مجموعه سری غلظتهای مناسب برای محاسبه به این صورت هستند.

۱ ، ۲/۳ ، ۵/۶ ، ۱۰ ، ۱۸ ، ۳۲ ، ۵۶ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر

در صورت لزوم برای بررسی حساسیت لجن فعال با مواد مرجع همان روش را اجرا کنید. نتایج آزمون را مانند بند ۸ محاسبه و بیان کنید.

جدول الف ۱ - مخلوط ها برای آزمون مقدماتی

غلظت اصلی	مواد	یک گرم در لیتر
-----------	------	----------------



محلول ذخیره مواد مورد آزمون محلول ذخیره محیط کشت لجن فعال	به بند ۲-۴ مراجعه شود ۳ گرم از مواد جامد در لیتر				
سوله آزمونایش					
اجزاء تشکیل دهنده مخلوط ها	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3}	F_B	F_{PC}
محلول ذخیره ای مواد مورد آزمون (میلی لیتر) محلول ذخیره کشت (میلی لیتر) لجن فعال (میلی لیتر) آب (میلی لیتر)	۳۰	۰	۰	۳۰	۳۰
				۰/۳	۱۰
		۱۰		۱۰	
		۱۰		۱۰	
		۱۰		۱۰	
	۲۵۰	۲۸۰		۲۶۰	
				۲۷۹/۷	
حجم کلی مخلوط ها (میلی لیتر)			۳۰۰		۳۰۰
	۳۰۰	۳۰۰			۳۰۰
غلظت مخلوط ها					
مواد مورد آزمون (میلی گرم در لیتر)	۰	۱۰۰			
لجن فعال (میلی گرم از مواد جامد معلق در لیتر)	۱		۱۰۰		۱۰۰
		۱۰۰			۰
	۱۰۰		۱۰۰		۱۰۰

برای مواد مرجع F_{R1} و F_{R2} ... باید همین روش استفاده شود .



شکل ۱ - مثالی از یک واحد
اندازه گیری برای روش الف

پیوست ب (الزامی) روش ب استفاده از غلظت بالای لجن فعال

در مخلوط آزمون باید غلظت لجن فعال تقریباً ۱۵۰۰ میلی گرم مواد معلق جامد در لیتر باشد مخلوطهای آزمون در طول زمان آزمایش هوادهی می‌شوند . اندازه‌گیری مصرف اکسیژن پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری و در صورت نیاز به اطلاعات بیشتر بعد از دوره زمانی تماس طولانی ، بعد از سه ساعت گرمخانه گذاری انجام می‌شود .

مخلوطهای آزمون مقدماتی را در ظروفی که در حدود ۱۰۰۰ میلی لیتر گنجایش دارد مطابق با جدول ۴ آماده کنید .

تمام محلولها و مکانی که آزمون در آنجا انجام می‌شود باید دمایی ثابتی داشته باشد (بطور مثال 20 ± 2 درجه سلسیوس) .

تمام مخلوطها را بجز F_B به این ترتیب تهیه کنید : حدود $2/3$ آب ، مواد مورد آزمون و محیط کشت . مواد فوق را در ظروفی بریزید که با کمک همزن مغناطیسی خوب مخلوط شود . (به لوله‌های B که کنترل شاهد است ، مواد مورد آزمون اضافه نمی‌شود) .

لجن فعال را به ترتیب به همه مخلوطها با فاصله زمانی مناسبی حدود ۱۰ دقیقه اضافه کنید . (بجز F_{PC} شاهد فیزیکیوشیمیایی که لجن فعال به آن اضافه نمی‌شود) . فوراً مواد موجود در ظروف را ، با آب ، به حجم ۵۰۰ میلی لیتر برسانید . محتویات ظروف را هوادهی کرده و همزن مغناطیسی را بکار اندازید .

بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از زمان آماده شدن اولین مخلوط ، غلظت اکسیژن محلول را اندازه‌گیری کنید . نمونه‌ای از اولین ظرف برداشته و سرعت مصرف اکسیژن را اندازه‌گیری نمایید .

مثلاً یک بطری BOD پر شده از نمونه را به همراه همزن مغناطیسی مناسب بکار برید . الکتروود اکسیژن را به کمک رابط وارد دهانه بطری نموده ، همزن مغناطیسی را بکار اندازید . غلظت اکسیژن محلول را در فاصله ۱۰-۵ دقیقه از شروع آزمایش تا زمانی که غلظت اکسیژن محلول به کمتر از یک میلی گرم در لیتر کاهش یابد

اندازه‌گیری و ثبت کنید. سپس الکتروود را از ظرف خارج و مخلوط را به ظرف آزمایش برگردانده، هم‌زدن و هوادهی را ادامه دهید. برای همه ظروف حاوی نمونه بنوبت این‌روش را تکرار کنید، تا اینکه بعد از ۳۰ دقیقه مجموعه‌ای از غلظت اکسیژن محلول اندازه‌گیری شده بدست آید. در صورت نیاز به اطلاعات بیشتر، بعد از دوره زمانی تماس طولانی یعنی پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه از شروع گرمخانه گذاری روش را تکرار کنید.

می‌توان بجای پر کردن ظروف BOD ، نمونه را در سل^۱ اندازه‌گیری استوانه‌ای شکل که حجم آن حدود ۲۰ میلی لیتر است بریزید. توجه کنید که سل مورد استفاده، برای الکتروود اکسیژن و هم‌زدن مغناطیسی مناسب باشد. در این مورد، حجم مخلوط‌ها را کاهش داده تا به حدود ۲۰۰ میلی لیتر برسد. نمونه‌های اندازه‌گیری شده را دور بریزید. قبل از اینکه اندازه‌گیری دیگری را شروع کنید، سل باید با آب شیر تمیز شود. در شکل ۲ نمونه‌ای از واحد اندازه‌گیری نشان داده شده است.

سرعت مصرف اکسیژن R بر حسب میلی گرم در لیتر در ساعت را می‌توان یا از طریق محاسبه یا از طریق درون یابی با استفاده از قسمت خطی نمودار کاهش اکسیژن بدست آورده و سپس با کمک معادله زیر محاسبه نمود.

$$R = \frac{\sigma_1 - \sigma_2}{\Delta t} \times 60$$

σ_1 = غلظت اکسیژن در شروع فاز خطی است که بر حسب میلی گرم در لیتر بیان می‌شود.

σ_2 = غلظت اکسیژن در انتهای فاز خطی است که بر حسب میلی گرم در لیتر بیان می‌شود. Δt = زمان بین دو اندازه‌گیری است بر حسب دقیقه بیان می‌شود.

آزمون نهایی را به همان روش آزمون مقدماتی انجام دهید برای کسب جزئیات بیشتر در مورد غلظت‌های توصیه شده به بند الف ۱ توجه کنید.

- cellcell

۱)

جدول ب ۱ - مخلوطها برای آزمون مقدماتی

غلظت اصلی مواد بکار رفته					
محللول ذخیره مواد مورد آزمون محللول ذخیره محیط کشت لجن فعال	یک گرم در لیتر به بند ۲-۴ مراجعه شود ۳ گرم از مواد جامد معلق در لیتر				
اجزاء تشکیل دهنده مخلوطها	لوله آزمایش				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3}	F_B	F_{PC}
محللول ذخیره مواد مورد آزمون (میلی لیتر)	۵	۵	۵۰	۰	۵۰
محللول ذخیره محیط کشت (میلی لیتر)	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
لجن فعال (میلی لیتر)	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۰
آب (میلی لیتر)	۵	۲۲	۱۸	۲۳	۴۳
	۲۳۳	۹	۴	۴	۴
حجم نهایی مخلوطها (میلی لیتر)	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
	۰	۰	۰	۰	۰
غلظت مخلوطها					
مواد مورد آزمون (میلی گرم در لیتر)	۱	۱۰	۱۰	۰	۱۰
لجن فعال (بر حسب میلی گرم مواد جامدمعلق در لیتر)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۰
	۰۰	۰۰	۰۰	۰۰	

برای مواد مرجع F_{R1} و F_{R2} می‌توان از همین روش استفاده نمود.

