

**TCVN 6664 : 2000
ISO10708 : 1997**

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – ĐÁNH GIÁ SỰ PHÂN HUỖ SINH HỌC
ƯA KHÍ CUỐI CÙNG CÁC CHẤT HỮU CƠ TRONG
MÔI TRƯỜNG NƯỚC – XÁC ĐỊNH NHU CẦU
OXY SINH HOÁ DÙNG BÌNH THỬ KÍN HAI PHA**

*Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic
biodegradability of organic compounds – Determination of biochemical oxygen
demand in a two-phase closed bottle test*

HÀ NỘI -2000

Lời nói đầu

TCVN 6664 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 10708 : 1997.

TCVN 6664 : 2000 do Ban Kỹ thuật Tiêu chuẩn TCVN/TC 147 Chất lượng nước biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Chất lượng nước – Đánh giá sự phân hủy sinh học ưa khí cuối cùng các chất hữu cơ trong môi trường nước – Xác định nhu cầu oxy sinh hoá dùng bình thử kín hai pha

Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds – Determination of biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test

Cảnh báo

CHÚ Ý AN TOÀN – Bùn hoạt hoá và nước thải có thể chứa sinh vật gây bệnh. Do đó cần hết sức chú ý khi làm việc với chúng. Cần chú ý cẩn thận khi làm việc với những chất thử có độc tính mà bản chất của chúng chưa biết rõ.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp đánh giá sự phân hủy sinh học cuối cùng bởi vi sinh vật ưa khí của các chất hữu cơ, đặc biệt là các chất ít tan trong nước, ở nồng độ đã cho.

Chú thích 1 – Những điều kiện trong tiêu chuẩn này không phải luôn luôn là điều kiện tối ưu cho mức tối đa phân hủy sinh học cực đại.

Phương pháp này áp dụng cho các chất hữu cơ:

- hoà tan hoặc ít hoà tan trong nước ở nồng độ được dùng dưới các điều kiện thử;
- không hấp phụ hoặc không ảnh hưởng đến điện cực oxy (xem 8.1.2 và 8.3.4);
- không gây ức chế vi khuẩn ở nồng độ đã chọn cho phép thử.

Chú thích 2 – Các hợp chất không phân tan vào bình thử, xem ISO 10634.

Chú thích 3 – Tác dụng ức chế có thể xác định như 8.1.4 và 8.3.1 hoặc bằng các phương pháp khác để xác định sự ức chế vi sinh vật của một chất (thí dụ TCVN 6226: 1996 (ISO 8192)).

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 10634:1995 Chất lượng nước – Hướng dẫn chuẩn bị và xử lý các chất hữu cơ khó tan trong nước để đánh giá sự phân huỷ sinh học của chúng trong môi trường nước.

3 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, các định nghĩa sau đây được sử dụng:

3.1 Sự phân huỷ sinh học cuối cùng

Sự phân huỷ các hợp chất hữu cơ bằng vi sinh vật khi có oxy để tạo thành cacbon dioxyt, nước, muối khoáng của các nguyên tố có mặt (vô cơ hóa) và sinh khối mới.

3.2 Sự phân huỷ sinh học ban đầu

Sự thay đổi cấu trúc của hợp chất hữu cơ bởi vi sinh vật, dẫn đến sự mất một tính chất nhất định.

3.3 Nhu cầu oxy sinh hoá (BOD)

Nồng độ oxy hoà tan bị tiêu thụ dưới những điều kiện nhất định bởi sự oxy hoá sinh học ưa khí một hợp chất hoá học hoặc chất hữu cơ trong nước, được biểu diễn bằng miligam oxy tiêu tốn cho miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.4 Nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD)

Lượng oxy cực đại lý thuyết cần để oxy hoá một hoá chất hoàn toàn tính từ công thức phân tử, được biểu diễn bằng miligam oxy trên miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.5 Nhu cầu oxy hoá học (COD)

Nồng độ oxy tương đương với lượng chất oxy hoá bị tiêu thụ bởi chất hoá học hoặc chất hữu cơ khi mẫu nước được xử lý với chất oxy hoá trong điều kiện nhất định, được biểu diễn bằng miligam oxy trên miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.6 Cacbon hữu cơ hoà tan (DOC)

Phần cacbon hữu cơ trong nước không thể tách ra bằng ly tâm 40 000 m· s⁻² trong 15 min hoặc bằng cách lọc qua màng cỡ lỗ từ 0,2 µm đến 0,45 µm.

3.7 Nồng độ chất rắn lơ lửng của bùn hoạt hoá

Lượng chất rắn thu được bằng cách lọc hoặc ly tâm một thể tích biết trước của bùn hoạt hoá và sấy ở 105°C đến khối lượng không đổi.

3.8 Pha trễ

Thời gian từ khi bắt đầu thử đến khi đạt được sự thích nghi và chọn lọc của vi sinh vật phân huỷ và mức phân huỷ sinh học đã tăng khoảng 10% của hoá chất hoặc chất hữu cơ so với phân huỷ sinh học cực đại lý thuyết, tính bằng ngày.

3.9 Mức phân huỷ sinh học cực đại

Mức phân huỷ sinh học cực đại một hợp chất hoá học hoặc chất hữu cơ trong một phép thử, quá mức đó thì không còn sự phân huỷ sinh học nào xảy ra trong khi thử, được tính bằng phần trăm.

3.10 Pha phân huỷ

Thời gian từ cuối pha trễ của một thử nghiệm đến khoảng 90 % mức độ phân huỷ sinh học cực đại; được tính bằng ngày.

3.11 Pha giới hạn (plateau phase)

Thời gian kể từ khi kết thúc pha phân huỷ lúc mức độ phân huỷ sinh học cực đại đã đạt được cho đến kết thúc phép thử.

3.12 Thử tăng sinh trước

Ủ trước một môi cấy vi sinh vật khi có mặt hợp chất thử với mục đích để tăng khả năng của môi cấy với chất thử, để tăng tính thích nghi và chọn lọc của vi sinh vật.

3.13 Thích nghi trước

Ủ sớm một môi cấy vi sinh vật trong các điều kiện thử nhưng không có chất thử với mục đích cải thiện tính năng của phép thử bằng cách làm thích nghi vi sinh vật với điều kiện thử.

4 Nguyên tắc

Phân huỷ sinh học các chất hữu cơ bằng vi sinh vật được xác định trong môi trường nước. Chất hữu cơ là nguồn cacbon duy nhất cung cấp năng lượng trong môi trường này. Môi trường được cấy vi sinh vật được lắc hoặc khuấy trong bình kín chứa một thể tích đã biết của môi trường và không khí để oxy phân bố ổn định giữa chất lỏng và khí. Sự phân huỷ được theo dõi bằng cách đo đều đặn nồng độ oxy hoà tan trong pha nước suốt 28 ngày. Oxy tổng số tiêu tốn trong bình thử được tính từ hiệu số nồng độ oxy hoà tan được đo trong bình thử và bình trắng chia cho giá trị bão hoà oxy dưới điều kiện tiêu chuẩn và nhân với hàm lượng oxy tổng số từ đầu trong pha lỏng và pha khí. Độ phân huỷ sinh học được tính là oxy tổng số tiêu tốn chia cho nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD) hoặc nhu cầu oxy hoá học (COD) và biểu diễn bằng phần trăm.

5 Điều kiện thử

Sự ủ được làm ở nơi tối hay dưới ánh sáng khuếch tán có nhiệt độ ổn định ($\pm 0,5$ °C) trong khoảng 20 °C và 25 °C.

6 Thuốc thử

Chỉ dùng các thuốc thử tinh khiết phân tích

6.1 Nước

Nước cất hoặc nước đã loại ion chứa ít hơn 2 mg/l DOC và / hoặc ít hơn 10 % hàm lượng các bon hữu cơ bắt đầu được đưa vào bởi chất thử.

6.2 Môi trường thử

6.2.1 Thành phần

6.2.1.1 Dung dịch A

Kali dihydrophosphat khan (KH_2PO_4)	8,5 g
Dikali hydrophosphat khan (K_2HPO_4)	21,75 g
Natri hydrophosphat ngậm 2 nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33,4 g
Amoni clorua (NH_4Cl)	0,5 g
Nước (6.1) đủ để tạo thành	1lit

Chú thích – Thành phần đúng của môi trường có thể kiểm tra bằng cách đo pH, nó phải là 7,4.

6.2.1.2 Dung dịch B

Hoà tan 22,5 g magiê sunphat ngậm 7 phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) trong 1000 ml nước (6.1)

6.2.1.3 Dung dịch C

Hoà tan 27,5 g canxi clorua (CaCl_2) trong 1000 ml nước (6.1).

6.2.1.4 Dung dịch D

Hoà tan 0,25 g sắt (III) clorua ngậm 6 phân tử nước ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) trong 1000 ml nước (6.1). Pha dung dịch này ngay trước khi dùng.

Chú thích – Không cần pha dung dịch này nếu thêm một giọt axit clohydric (HCl) đậm đặc hoặc axit ethylen diamin tetra axetic (EDTA) 0,4 mol/l.

6.2.2 Pha chế

Để pha một lít môi trường thử thì thêm vào khoảng 500 ml nước (6.1).

- 10 ml dung dịch A;
- 1 ml mỗi dung dịch B, C, D.

Thêm nước (6.1) cho đủ 1000 ml.

6.3 Dung dịch natri hydroxyt

Hoà tan natri hydroxyt (NaOH) trong nước (6.1) để được dung dịch 0,1 mol/l đến 0,5 mol/l.

6.4 Dung dịch axit clohydric

Hoà tan axit clohydric (HCl) trong nước (6.1) để được dung dịch 0,1 mol/l đến 0,5 mol/l.

7 Thiết bị, dụng cụ

Bảo đảm rửa kỹ các dụng cụ thủy tinh, chú ý chất hữu cơ hoặc chất độc. Dùng các thiết bị thông thường trong phòng thí nghiệm và:

7.1 Bình ủ, kín khí, như bình cổ hẹp dung tích 200 ml đến 300 ml với nút thích hợp (như nút nhám, nắp vặn hoặc nút bằng cao su butyl), kín ánh sáng (thí dụ làm bằng thủy tinh nâu).

Nên dùng kẹp nút. Đánh dấu từng bình bằng chất không nhoè nước. Nếu dùng điện cực oxy không có lắp máy khuấy kèm theo thì cần đảm bảo mỗi bình đều được khuấy từ với con khuấy bọc polytetrafloetylen. Hoặc chọn trước các bình có độ lệch thể tích không quá 1 ml, hoặc đo và ghi từng bình, đánh số chính xác đến 1 ml. Bôi vào nút mỗi bình bằng mỡ silicon để bảo đảm nút chặt và dễ mở.

7.2 Điện cực oxy, đo được khoảng từ 0 mg/l đến 10 mg/l với độ chính xác 1 %.

Trạng thái ổn định của điện cực phải đạt được trong khoảng 2 min. Gá điện cực vào một chiếc nút trợ gắn vừa khít vào cổ bình. Tốt nhất là dùng điện cực có máy khuấy.

7.3 Máy khuấy từ, có điều tốc nếu cần

Que khuấy gắn vào điện cực cần bằng vật liệu không gây ô nhiễm môi trường thử và không hấp phụ chất thử. Cần tránh không để máy khuấy làm nóng bình thử.

7.4 Máy lắc, nếu cần

7.5 Nồi cách thủy, hoặc thiết bị khác đảm bảo độ chính xác $\pm 0,5$ °C trong khoảng nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C.

7.6 pH mét

7.7 Máy phân tích cacbon hữu cơ hoà tan (DOC) (chỉ trong trường hợp đặc biệt, xem 8.3.4, chú thích 3).

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị chất thử và đối chứng

8.1.1 Chất thử hoà tan trong nước

Chuẩn bị dung dịch gốc chất thử hoà tan trong nước trong môi trường thử (6.2) hoặc trong nước (6.1). Pha loãng một thể tích thích hợp dung dịch này trong môi trường thử (6.2) để thu được nồng độ thử cuối cùng là 100 mg/l ThOD (xem 8.3.3). Để tính toán ThOD, xem phụ lục A. Nếu ThOD không thể tính được bằng công thức thì dùng phân tích hoặc xác định COD (xem phụ lục B). Chú ý rằng việc xác định COD của chất thử ít tan trong nước là khó khăn. Nếu DOC cần xác định thì đo nồng độ thử DOC tương đương (miligam trên lit) hoặc tính nó từ dung dịch gốc đã được đo.

8.1.2 Chất thử không tan trong nước

Nghiền trong cối, cân trên một mảnh kính và đặt trực tiếp vào bình thử. Chất dầu mỡ hoặc sáp thì cân trên miếng kính và đặt trực tiếp vào bình thử.

Nếu dùng dạng nhũ tương thì phân tán chất thử trong nước (6.1) bằng xử lý siêu âm hoặc nhũ tương hoá bằng chất tạo nhũ tương không phân huỷ sinh học, hoặc kết hợp cả hai kỹ thuật. Chất nhũ tương hoá là nonylphenol etoxylat (khoảng 10 EO) và propoxylat (khoảng 3 đến 7 PO). Phải đảm bảo sự phân tán hoặc nhũ tương hoá là đồng nhất khi hút ra một phần để thử nồng độ.

Nồng độ cuối cùng của chất thử trong bình thử phải khoảng 100 mg/l ThOD (xem phụ lục A) nhưng cần ghi chính xác lượng trong mỗi bình đánh số.

Thông tin thêm về làm việc với chất thử ít tan trong nước xem ISO 10634.

Chú thích – Nếu chất thử hấp phụ lên điện cực oxy (thí dụ mỡ hoặc chất béo), nồng độ oxy sẽ bị giảm. Hấp phụ có thể xảy ra trên thành bình hoặc nút. Nếu điều đó xảy ra, nên dùng phương pháp thử khác [thí dụ dùng máy thử (ISO 9408) hoặc phép thử CO₂ sinh ra (TCVN 6489: 1999 (ISO 9439))].

8.1.3 Dung dịch chất đối chứng

Chuẩn bị dung dịch gốc chất đối chứng (một chất hữu cơ đã biết khả năng phân huỷ sinh học như natri axetat, natri benzoat hoặc anilin) như điều 8.1.1 để nhận được nồng độ chất thử cuối cùng tương ứng với 100 mg/l ThOD.

8.1.4 Dung dịch để thử sự ức chế

Nếu muốn biết khả năng có thể ức chế chất cấy của chất thử thì chuẩn bị trong môi trường thử (6.2) một dung dịch chất thử và chất đối chứng ở nồng độ đã chỉ ở 8.1.1, 8.1.2 và 8.1.3.

8.2 Chuẩn bị chất cấy

Chuẩn bị chất cấy bằng các nguồn như trong điều 8.2.1 và 8.2.3 hoặc dùng hỗn hợp của các nguồn này để thu được quần thể vi sinh có đủ hoạt độ phân huỷ sinh học. Ổn định chất cấy như 8.3.2 trước khi thử.

8.2.1 Chất cấy từ nước thải đã xử lý thứ cấp

Lấy chất cấy từ nước thải thứ cấp của trạm xử lý nước thải hoặc trạm thử nghiệm làm việc chủ yếu với nước thải sinh hoạt. Nếu mật độ vi sinh vật trong chất cấy quá thấp đến nỗi phải dùng một thể tích quá lớn thì cô đặc chất cấy bằng cách lọc hoặc ly tâm. Trộn đều, giữ chất cấy ở điều kiện thoáng khí và nên dùng trong ngày lấy.

Từ chất cấy chuẩn bị cấy như sau:

- a) Để lắng chất cấy lấy từ nguồn nước thải đã qua xử lý thứ cấp trong 1 h.
- b) Lấy một thể tích thích hợp từ phần trên để cấy. Thể tích thích hợp có nghĩa là
 - cho một quần thể có hoạt tính phân huỷ sinh học đầy đủ;
 - có khả năng phân huỷ chất đối chứng đúng phần trăm đã qui định;
 - có 10^4 đến 10^8 tế bào hoạt động trong một mililit;
 - không tạo quá 30 mg/l chất rắn lơ lửng bùn hoạt hoá trong hỗn hợp cuối.

8.2.2 Chất cấy từ bùn hoạt hoá

Lấy chất cấy từ bùn hoạt hoá ở trong bể sục khí của trạm xử lý hoặc từ trạm thử nghiệm làm việc chủ yếu với nước thải sinh hoạt. Trộn đều, giữ chất cấy trong điều kiện thoáng khí và nên dùng trong ngày lấy.

Trước khi dùng, xác định nồng độ chất rắn lơ lửng [thí dụ dùng TCVN 6625: 2000 (ISO 11923)]. Nếu nồng độ chất rắn lơ lửng rất thấp, thì để lắng bùn để thể tích bùn được thêm vào mẫu thử là nhỏ nhất. Nếu có nhiều hạt lớn trong bùn thì cần loại ra. Để bùn vào rây mịn và rửa nhiều lần bằng môi trường thử (6.2). Ly tâm hoặc để lắng, loại bỏ phần dịch trong ở trên và hoà lại chất rắn vào môi trường thử để được nồng độ chất rắn khoảng 3 g/l. Dùng một thể tích chất cấy để cho được không quá 30 mg/l chất rắn lơ lửng ở hỗn hợp cuối cùng.

TCVN 6664 : 2000

8.2.3 Chất cấy từ nước mặt

Lấy chất cấy từ nước mặt thích hợp. Nếu vi sinh vật trong chất cấy quá thấp và không đạt yêu cầu nêu ở điều 8.2.1 thì ly tâm hoặc lọc. Giữ chất cấy trong điều kiện thoáng khí và nên dùng trong ngày lấy. Lấy một thể tích thích hợp để cấy (8.2.1).

Chú thích – Trong một số trường hợp có thể sử dụng chất cấy đã cấy tăng sinh trước, nhưng cần nói rõ trong báo cáo kết quả (thí dụ phần trăm phân huỷ sinh học = x%, sử dụng chất cấy đã cấy tăng sinh trước) và nêu chi tiết phương pháp cấy tăng sinh trước. Chất cấy đã được cấy tăng sinh trước có thể lấy từ phòng thí nghiệm thử phân huỷ sinh học dưới các điều kiện khác nhau [thí dụ thử Zahn-wellen (ISO 9888) và thử SCAS (ISO 9887)] hoặc mẫu lấy từ nơi có các điều kiện môi trường tương ứng (thí dụ trạm xử lý các chất tương tự hoặc ở vị trí ô nhiễm tương tự.)

8.3 Cách tiến hành

8.3.1 Chuẩn bị bình thử

Lấy đủ số bình thử (7.1) để có:

- ít nhất ba bình chứa chất thử (8.1.1 hoặc 8.1.2) và môi trường thử đã cấy (6.2 và 8.2) (bình F_T);
- ít nhất ba bình trắng chỉ chứa môi trường thử đã cấy (6.2 và 8.2) (bình F_B);
- ít nhất ba bình để kiểm tra chứa chất đối chứng (8.1.3) và môi trường thử đã cấy (6.2 và 8.2) (bình F_C);
- nếu cần, ít nhất một bình để kiểm tra hiệu ứng ức chế của chất thử, chứa dung dịch 8.1.4 và môi trường thử đã cấy (6.2 và 8.2) (bình F_i);
- nếu cần, ít nhất 1 bình để kiểm tra sự phân huỷ phi sinh học chứa chất thử (8.1.1 hoặc 8.1.2) nhưng không được cấy chất cấy, diệt khuẩn bằng cách thêm 1 ml/l dung dịch thủy ngân (II) clorua (HgCl₂) chứa 10 g/l Hg (II) hoặc chất độc vô cơ thích hợp khác để ngăn cản hoạt động của vi sinh vật (bình F_S). Nếu chất thử rất dễ phân huỷ thì thêm một lượng như vậy chất độc vào dung dịch thử sau hai tuần lễ thử.

8.3.2 Ổn định môi trường đã cấy

Chuẩn bị môi trường thử (6.2) đủ để thử trọn vẹn, cấy vào đó và rót vào các bình thử. Nếu dùng bùn hoạt hoá làm chất cấy, thì lấy 800 ml môi trường thử (6.2) và 10 ml chất cấy (8.2.2) và thêm môi trường thử (6.2) đến 1000 ml. Nồng độ chất rắn lơ lửng không được vượt quá 30 mg/l.

Đặt máy khuấy từ cho mỗi bình (nếu không dùng máy lắc và / hoặc điện cực oxy không kèm theo máy khuấy) và thêm một thể tích môi trường thử đã cấy bằng 2/3 thể tích bình (thí dụ 200 ml trong bình 300 ml). Đậy nút, đặt bình lên máy lắc hoặc khuấy và ủ ở 20°C đến 25°C trong một tuần lễ. Trong thời gian này vi khuẩn sẽ sử dụng chất dự trữ và được ổn định.

8.3.3 Bắt đầu thử

Sục khí các bình chứa môi trường thử đã cấy và ổn định (8.3.2) bằng không khí nén bão hoà hơi nước khoảng 15 min. Đo nồng độ oxy đầu tiên (khuyến nghị) hoặc tính toán (xem 8.3.4). Thêm vào các bình F_T một lượng thích hợp dung dịch gốc chất thử (8.1.1) hoặc cho trực tiếp chất thử khó tan (8.1.2) để đạt nồng độ 100 mg/l ThOD ở mỗi bình. Thêm vào các bình F_C một lượng thích hợp dung dịch gốc chất đối chứng (8.1.3) và vào bình F_i những lượng như nhau của chất thử và chất đối chứng (8.1.4). Cho vào bình F_S môi trường thử không được cấy (6.2) và một lượng chất thử như ở các bình F_T . Đảm bảo rằng mọi bình đều chứa cùng thể tích dung dịch và không khí (xem 8.3.2); thêm nước (6.1) nếu cần.

Đậy kín các bình (thí dụ dùng kẹp nút), đặt chúng lên máy lắc và ủ ở nhiệt độ 20°C đến 25°C ($\pm 0,5$ °C). Có thể khuấy các bình bằng máy khuấy từ thay cho máy lắc.

8.3.4 Phân tích

Hiệu chuẩn điện cực oxy theo chỉ dẫn của hãng sản xuất.

Cần hiệu chuẩn điểm không, điểm bão hoà và cả độ trôi, thí dụ bằng cách đặt điện cực vào nước bão hoà không khí ở 20°C $\pm 0,5$ °C. Giá trị bão hoà oxy hoà tan trong nước phải là 9,08 mg/l; đó là giá trị lý thuyết ở áp suất khí quyển (1013 kPa) và 20°C. Giá trị oxy thường được đọc trên thang 0 mg/l đến 10 mg/l với độ đúng 0,1 mg/l. Không cần phải hiệu chỉnh các thay đổi theo áp suất khí quyển.

Chú thích 1 – Nếu nghi ngờ chất thử ảnh hưởng đến điện cực oxy (thí dụ trường hợp dầu hoặc chất béo...), nên thử riêng xem chất thử có bị hấp phụ lên điện cực hay không hay sự hiệu chuẩn và hoạt động của điện cực oxy không có tác dụng.

Chú thích 2 – Trong tiêu chuẩn này, việc xác định nồng độ oxy trong các bình thử được thực hiện bằng điện cực oxy. Tuy nhiên, có thể dùng những kỹ thuật thích hợp khác yêu cầu máy móc và phương pháp đo khác.

Sau khi ủ tối đa một tuần lễ, hoặc lâu hơn nếu muốn đường cong phân huỷ chính xác hơn, xác định nồng độ oxy trong mỗi bình. Giữ bình ở nhiệt độ ủ ($\pm 0,5$ °C) trong khi đo.

Lấy từng bình ra và lắc mạnh bằng tay khoảng 30 s. Đặt bình lên máy khuấy nhưng chưa khuấy. Mở nút và cắm ngay điện cực oxy qua cổ bình sao cho nút của điện cực đậy kín bình còn mũi điện cực thì nhúng vào dung dịch trong bình. Khuấy ở tốc độ mà có thể đo oxy nhưng không gây xoáy. Tốc độ khuấy khi hiệu chuẩn và khi đo một loạt phép đo là như nhau. Ghi giá trị oxy khi ổn định, thường khoảng 2 min.

Đo và ghi giá trị pH của dung dịch trong mỗi bình. Nếu pH nhỏ hơn 6,0, cần điều chỉnh đến khoảng 7,5 bằng dung dịch natri hydroxit (6.3). Nếu pH cao hơn 8,0, cần điều chỉnh đến khoảng 7,5 bằng axit clohydric (6.4).

Cuối cùng, sục khí vào mỗi bình 15 min và đo lại nồng độ oxy như đã mô tả trước đây. Đậy nút và đặt lên máy lắc tiếp tục ủ.

TCVN 6664 : 2000

Thông thường sự thử kết thúc sau 28 ngày. Nếu đạt được trên 60 % sự phân huỷ và mức độ phân huỷ sinh học không đổi trước 28 ngày thì sự thử được xem là kết thúc. Có thể kéo dài sự thử thêm một đến hai tuần lễ nếu thấy sự phân huỷ sinh học đã bắt đầu nhưng chưa đạt giới hạn.

Nếu chất thử chứa nitơ, thì xác định nồng độ nitrat hoặc nitrit ngay sau khi thử, hoặc trong mẫu lưu giữ, để khi tính toán mức độ phân huỷ sinh học có thể hiệu chỉnh (nếu có) sự nitrat hoá (xem phụ lục C). Cũng có thể dùng phương pháp thử định tính nitrat và nitrit ở một thể tích nhỏ lấy ra từ mỗi bình. Chỉ dùng phương pháp định lượng nếu kết quả dương tính.

Chú thích 3 – Khi chất thử tan trong nước, có thể xác định DOC để thu thêm thông tin về sự phân huỷ sinh học cuối cùng. Trong trường hợp này, dùng một bình thử chứa đủ chất thử để phân tích. Mẫu có thể lấy sau mỗi khi đo oxy hoặc khi kết thúc sự thử. Sự thay đổi thể tích cần tính đến khi tính toán mức độ phân huỷ sinh học (xem công thức 2 điều 9.1).

Chú thích 4 – Khi một phương pháp đặc biệt được dùng cho chất thử, thông tin thêm về sự phân huỷ ban đầu có thể nhận được ngay cả với các chất không tan trong nước (thí dụ sau khi chiết với dung môi thích hợp). Trường hợp này, mẫu cần lấy khi kết thúc sự thử từ các bình F_T và F_S .

9 Tính toán và biểu thị kết quả

9.1 Tính toán

Lượng oxy tiêu thụ tương đối OR trong mỗi bình được tính theo công thức (1)

$$OR = \frac{\rho_{oBt} - \rho_{ot}}{\rho_{os}} \quad (1)$$

trong đó

ρ_{oBt} là giá trị trung bình của nồng độ oxy hoà tan trong bình trắng sau thời gian ủ t (mg/l);

ρ_{ot} là nồng độ oxy hoà tan trong mỗi bình thử sau thời gian ủ t (mg/l);

ρ_{os} là giá trị bão hoà của oxy hoà tan (mg/l).

Cần tính giá trị trung bình ρ_{os} ở bình trắng và bình thử sau mỗi lần thổi khí hoặc thổi khí lại.

Chú thích 1 – Giá trị bão hoà của oxy hoà tan ở áp suất khí quyển (101,3 kPa) và 20°C là 9,08 mg/l.

Tính theo công thức (2) lượng oxy tổng số trong mỗi bình OC (mg/bình) từ hàm lượng oxy cực đại ở pha khí và pha lỏng ở áp suất bình thường và 20 °C.

$$OC = (0,28 \times V_g) + (0,009 \times V_l) \quad (2)$$

trong đó

0,28 là hàm lượng oxy trong không khí (mg/ml);

V_g là thể tích khí trong bình ủ (ml);

0,009 là hàm lượng oxy bão hoà trong nước (mg/ml);

V_1 là thể tích chất lỏng trong bình ủ (ml).

Chú thích 2 – Thông thường V_1 là hằng số trong loạt mẫu thử, trừ trường hợp lấy mẫu để phân tích. V_g phụ thuộc vào bình thử được dùng. Nếu sự khác biệt giữa các bình là nhỏ thì OC được coi là hằng số. Nếu sự khác biệt lớn (thí dụ > 2 ml với thể tích 200 ml) thì OC cần tính cho mỗi bình. Nếu V_1 giảm do lấy mẫu để phân tích, V_g sẽ tăng tương ứng.

Tính lượng oxy tiêu tốn B (mg/bình) theo công thức (3)

$$B = OR \times OC \quad (3)$$

Tổng oxy tiêu tốn $\sum B$ (mg/bình) cho tất cả (n) thời gian ủ được tính theo công thức (4) để nhận được giá trị ở cuối phép thử:

$$\sum B = B_1 + B_2 + \dots + B_n \quad (4)$$

Cuối cùng, tính phần trăm phân huỷ sinh học D_{ThOD} (%) theo công thức (5):

$$D_{ThOD} = \frac{\sum B}{B_{ThOD}} \times 100 \quad (5)$$

trong đó B_{ThOD} là nhu cầu oxy lý thuyết, mg/bình. Tính toán xem phụ lục A.

Chú thích 3 – Nếu COD được dùng thay cho ThOD (xem 8.1.1), D_{COD} có thể tính theo công thức (5). Kết quả có thể khác đi COD thường thấp hơn ThOD nếu chất thử không bị oxy hoá hoàn toàn.

Chú thích 4 – Sự phân huỷ phi sinh học (bình F_s) có thể tính theo công thức (5) nhưng không chú ý đến giá trị trắng trong công thức (1).

Chú thích 5 – Độ phân huỷ của hỗn hợp chất thử và chất đối chứng trong kiểm tra sự ức chế (bình F_i) có thể tính bằng công thức (5).

Khi DOC được xác định để có thông tin thêm về các chất hoà tan trong nước, tính sự phân huỷ D_c (%) dùng công thức (6):

$$D_c = \left[1 - \frac{\rho_{ct} - \rho_{cBt}}{\rho_{co}} \right] \times 100 \quad (6)$$

trong đó

ρ_{co} là nồng độ thử DOC tính được của chất thử (mg/l);

ρ_{ct} là nồng độ trung bình DOC đo được ở cuối phép thử trong bình F_T (mg/l);

ρ_{cBt} là nồng độ trung bình DOC đo được ở cuối phép thử trong bình F_B (mg/l).

TCVN 6664 : 2000

Khi phân tích riêng chất thử, tính toán độ phân huỷ ban đầu D_S (%) bằng công thức (7):

$$D_S = \frac{\rho_S - \rho_T}{\rho_S} \times 100 \quad (7)$$

trong đó

ρ_T là nồng độ chất thử trong bình F_T ở cuối sự thử (mg/l);

ρ_S là nồng độ chất thử trong bình F_S ở cuối sự thử (mg/l);

Kết quả D_c và D_S dựa trên các nguyên tắc thử khác nhau nên có thể không giống D_{ThOD} .

9.2 Thể hiện kết quả

Lập bảng cho mọi giá trị đo được và phần trăm phân huỷ sinh học ở mỗi khoảng xác định và mỗi bình ủ. Nếu kết quả nhận được của thử ba lần khác nhau lớn hơn 20 % thì vẽ đường cong trung bình phụ thuộc vào thời gian (xem thí dụ ở phụ lục D). Nếu sự khác biệt nhỏ hơn 20% thì dùng đường cong từ một bình đại diện.

Nếu có thể thì chỉ rõ pha trễ, thời gian phân huỷ và mức phân huỷ cực đại trên đường cong.

10 Tính đúng đắn của phép thử

10.1 Phép thử được xem là đúng nếu khi trong một bình thử chứa cùng nồng độ chất thử và cấy, giá trị phân huỷ khác biệt giá trị phân huỷ cực đại là ít hơn 20% ở cuối phép thử.

10.2 Phép thử được xem là đúng khi phần trăm phân huỷ sau mười bốn ngày lớn hơn 60%, với chất đối chứng được đề nghị.

10.3 Lượng oxy tiêu tốn ở bình trắng sau tuần lễ đầu tiên của phép thử phải nhỏ hơn 3 mg/l và ở các tuần lễ tiếp theo phải nhỏ hơn 1 mg/l trong một tuần lễ. Nếu lượng oxy tiêu thụ cao hơn thì phép thử không đúng. Nếu phép thử được lặp lại thì ổn định mùi cấy (8.3.2) lâu hơn hoặc dùng chất cấy khác.

10.4 Chất thử có thể là độc nếu độ phân huỷ sinh học của hỗn hợp trong bình thử sự ức chế là ít hơn 25% trong mười bốn ngày. Điều đó chỉ ra rằng sự phân huỷ sinh học của chất đối chứng bị ức chế do chất thử. Nếu chất thử không bị phân huỷ sinh học và cần thử lại thì dùng nồng độ chất thử thấp hơn hoặc dùng mùi cấy đã được cấy tăng sinh trước.

Nếu các tiêu chuẩn này không đạt thì phải lặp lại phép thử, thí dụ với mùi cấy hoạt động hơn và chất cấy được sục khí trước tốt hơn.

11 Báo cáo kết quả thử

Báo cáo kết quả thử cần ít nhất những thông tin sau:

- a) trích dẫn tiêu chuẩn này;
- b) mọi thông tin cần để nhận dạng chất thử;
- c) mọi số liệu thu được (thí dụ dạng bảng) và đường cong phân huỷ;
- d) nồng độ chất thử đã dùng, hàm lượng ThOD của nồng độ này và cách xử lý các chất ít tan trong nước;
- e) tên chất đối chứng đã dùng và phần trăm phân huỷ của nó;
- f) nguồn, đặc tính, nồng độ hoặc thể tích mũi cấy đã dùng và mọi thông tin về xử lý trước;
- g) nhiệt độ ủ của phép thử;
- h) phần trăm phân huỷ ở bình F_s (kiểm tra phân huỷ phi sinh học);
- i) phần trăm phân huỷ ở bình F_i (thử độc tính) và nhận xét về độc tính của chất thử;
- j) lý do trong trường hợp loại bỏ phép thử;
- k) mọi sự thay đổi phương pháp tiêu chuẩn hoặc mọi tình huống có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(tham khảo)

Tính toán nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD)

Nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD) có thể tính toán nếu đã biết thành phần nguyên tố và khối lượng phân tử hoặc đã xác định .

THÍ DỤ



Khi không có nitrat hoá

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{M}$$

trong đó M là khối lượng phân tử.

Khi có nitrat hoá

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + \frac{5}{2}n + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{M}$$

Biểu thị ThOD bằng miligam trên miligam chất. Khi tính độ phân huỷ sinh học theo công thức (5) ở điều 9.1 ThOD được biểu thị bằng miligam trên bình.

Với chất tan trong nước, tính lượng để chuẩn bị dung dịch gốc từ lượng chất nhân với ThOD (mg/mg).
Thí dụ, thể tích chất lỏng trong bình là 200 ml và nồng độ dung dịch gốc là 40 g ThOD/l thì dùng 0,5 ml cho một bình để có ThOD 100 mg/l hoặc 20 mg trong một bình.

Lượng ThOD của chất ít tan trong nước trong bình thử (mg/bình) được tính từ lượng chất nhân với ThOD (mg/mg).

Phụ lục B
(Tham khảo)

Xác định nhu cầu oxy hoá học (COD)

Nhu cầu oxy hoá học của chất hữu cơ tan trong nước được xác định bằng phương pháp đã được thiết lập (thí dụ TCVN 6491: 1999 (ISO 6060)).

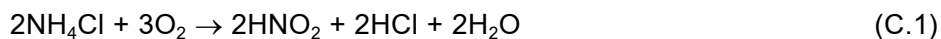
COD, nhất là của các chất ít tan, thường được xác định một cách thuận lợi khi dùng một cách của phương pháp phân tích trên, nghĩa là trong hệ kín với áp suất bằng áp suất khí quyển (xem 8). Phương pháp này có thể xác định tốt những chất mà các phương pháp thông thường gặp khó khăn, thí dụ axit axêtic. Phương pháp này có thể thất bại, ví dụ với trường hợp pyridin. Nếu nồng độ kali dicromat tăng từ 0,016 N (0,0026 mol/l) đến 0,25 N (0,0416 mol/l) như Kelkenbery đã mô tả, lượng cân từ 5 mg đến 10 mg chất là làm dễ dàng, đó là điều cần bản cho việc xác định COD các chất ít tan trong nước.

Phụ lục C
(tham khảo)

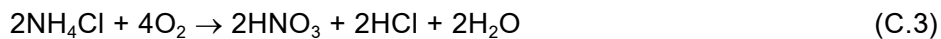
Hiệu chỉnh lượng oxy tiêu tốn khi có nitrat hoá

Sai số do sự nitrat hoá những chất có chứa ít nitơ là không đáng kể (< 5%), ngay cả sự oxy hoá nitơ amoni trong môi trường xảy ra giữa các bình thử nghiệm và bình trắng đã chứng tỏ rằng sự tăng nồng độ amoni trong môi trường là không lớn. Tuy nhiên, với những chất chứa lượng lớn nitơ thì sai số có thể nảy sinh.

Nếu nitrat hoá xảy ra nhưng không hoàn toàn, thì lượng oxy tiêu tốn bởi hỗn hợp phản ứng có thể hiệu chỉnh cho lượng oxy dùng để oxy hoá amoni thành nitrit và nitrat nếu sự thay đổi nồng độ của nitrit và nitrat trong khi ủ được xác định và chú ý đến các phương trình sau:



Tổng cộng



Từ phương trình (C.1), lượng oxy tiêu tốn để oxy hoá 28 g nitơ (thêm vào bằng NH_4Cl) đến nitrit là 96 g, nghĩa là với hệ số 3,43 (96/28). Cũng tương tự, từ phương trình (C.3), lượng oxy tiêu tốn để oxy hoá 28 g nitơ (thêm vào bằng NH_4Cl) đến nitrat là 128 g, nghĩa là với hệ số 4,57 (128/28).

Vì các phản ứng là liên tiếp, được thực hiện bởi các loại vi khuẩn khác nhau nên nồng độ nitrit có thể tăng hoặc giảm. Khi nồng độ nitrit giảm, một nồng độ tương đương nitrat được tạo thành. Như vậy, lượng oxy tiêu tốn để tạo thành nitrat là 4,57 nhân với sự tăng nồng độ nitrat, lượng oxy tiêu tốn để tạo thành nitrit là 3,43 nhân với sự tăng nồng độ nitrit, hoặc lượng oxy tiêu tốn để làm mất một lượng nitrit là 3,43 nhân với sự giảm nồng độ nitrit.

O_2 tiêu tốn để tạo nitrat bằng 4,57 lần sự tăng nồng độ nitrat.

O_2 tiêu tốn để tạo thành nitrit bằng 3,43 lần sự tăng nồng độ nitrit.

O_2 tiêu tốn do sự mất nitrit bằng - 3,43 lần sự giảm nồng độ nitrit.

Vậy O_2 tiêu tốn cho sự nitrat hoá bằng $\pm 3,43$ lần tăng nồng độ nitrit và + 4,57 lần tăng nồng độ nitrat.

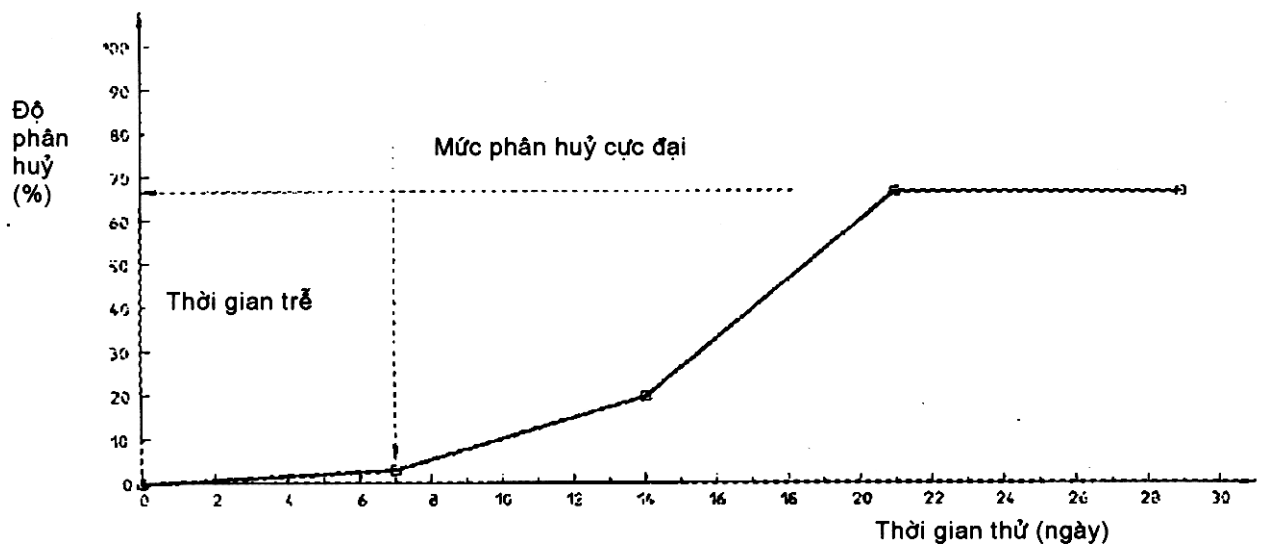
Cuối cùng O_2 tiêu tốn để oxy hoá các bon bằng BOD trừ đi oxy tiêu tốn cho sự nitrat hoá.

Nếu "nitơ bị oxy hoá tổng số" được xác định thì lượng oxy tiêu tốn cho sự nitrat hoá có thể lấy gần đúng bậc nhất là 4,57 lần sự tăng nồng độ nitrat.

Giá trị hiệu chỉnh cho lượng oxy tiêu tốn cho sự oxy hoá cacbon được so sánh với $\text{ThOD}_{\text{NH}_3}$ như tính toán ở phụ lục A.

Phụ lục D
(tham khảo)

Thí dụ về đường cong phân huỷ



Chất thử: anthraquinon

Thời gian trễ: khoảng bảy ngày

Thời gian phân huỷ: khoảng mười bốn ngày

Mức phân huỷ cực đại: khoảng 65%.

Phụ lục E

(thông tin)

Tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6491: 1999 (ISO 6060:1989) Chất lượng nước – Xác định nhu cầu oxy hoá học.
- [2] TCVN 6226: 1996 (ISO 8192:1986) Chất lượng nước – Thử sự ức chế khả năng tiêu thụ oxy của bùn hoạt hoá.
- [3] ISO 9408:1991 Chất lượng nước – Đánh giá sự phân huỷ sinh học ưa khí cuối cùng của các chất hữu cơ trong môi trường nước – Phương pháp xác định nhu cầu oxy trong máy thử kín.
- [4] TCVN 6489: 1999 (ISO 9439:1990) Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân huỷ sinh học hiếu khí "hoàn toàn" của các chất hữu cơ trong môi trường nước – Phương pháp dựa trên sự phân tích cacbon dioxyt được giải phóng.
- [5] ISO 9887:1992 Chất lượng nước – Đánh giá sự phân huỷ sinh học ưa khí cuối cùng của các chất hữu cơ trong môi trường nước – Phương pháp bùn hoạt hoá nửa liên tục (SCAS).
- [6] ISO 9888:1991 Chất lượng nước – Đánh giá sự phân huỷ sinh học ưa khí cuối cùng của các chất hữu cơ trong môi trường nước – Thử tĩnh (phương pháp Zahn-Wellens).
- [7] TCVN 6625: 2000 (ISO 11923: -" Chất lượng nước – Xác định chất rắn lơ lửng bằng cách lọc qua cái lọc sợi thủy tinh.
- [8] KELKENBERG, H., Zeitschrift Wasser - und Abwasserforschung, **8**, 1975, tr146.
-