جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

_6858

_ آب ــ ارزیابی اثر مهار کنندگی ترکیبات موجود در آب بر روی رشد میکروارگانیزم های موجود در لجن فعال

چاپ اول

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که

استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان ،مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان

وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

کمیسیون استاندارد کیفیت آب ـ ارزیابی اثر مهارکنندگی ترکیبات موجود در آب بر روی رشد میکروارگانیزمهای موجود در لجن فعال

رئیس	**سمت یا نمایندگی**
قائمی ـ ناصر (دکترای شیمی)	رئیس گروه شیمی دانشکده علوم دانشگاه تهران
اعضاء	
پرور– زهره (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	دانشگاه تهران
جهانتاب ـ سهیلا (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	سازمان آب و فاضلاب تهران
شریعت پناهی– شقایق (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	دانشگاه تهران
صدیق ابراهیم نیاـپروین‌دخت(فوق لیسانس شیمی)	مرکز تحقیقات نیرو
عطاران – ماندانا(فوق لیسانس شیمی)	سازمان حفاظت ازمحیط زیست
فیروزی – فیروزه (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	دانشگاه شهید بهشتی
قائمی ـ نسرین (فوق لیسانس تغذیه)	سازمان حفاظت از محیط زیست
قاهری – محمود (فوق لیسانس شیمی)	سازمان پژوهشهای علمی وصنعتی ایران
هاتفی – میترا(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت داروگر – کف
دبیر	
قبادی دانا ـ مریم(لیسانس میکروبیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات — صفحه

پیشگفتار..... الف
مقدمه ..... ب
۱ هدف ۱
۲ دامنه کاربرد..... ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۲
٤ اساس آزمون ۳

۵ شرایط محیطی آزمون.....٤
٦ مواد لازم ٤
۷ وسایل لازم ۸
۸ روش اجرای آزمون ۸
۹ منحنی های رشد ۱۳
۱۰ تفسیر نتایج ۱۵
۱۱ تجدیدپذیری ۱۵
۱۲ گزارش آزمون ۱٦
پیوست الف ۱۷
پیوست ب ۱۹
پیوست پ ۲۰

پیشگفتار

استاندارد کیفیت آب- ارزیابی اثر مهار کنندگی ترکیبات موجود ر روی رشد میکروارگانیسم های موجود در لجن فعال توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در چهل و یکمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۱/۱۲/۱۰ مورد 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 .

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

ISO 15522-1999 Water quality -Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms 1999

مقدمه

اطـلاعات بدست آمده از این روش، می تواند در تخمین اثـر مـاده مـورد آزمـون ، در جمعیـت هـای باکتریـایی، مخلوط موجود در سیستم های تصفیه بیولوژیک هوازی پساب ، یا در انتخاب غلظت های اولیه مناسب بـرای آزمونهای تجزیه پذیردر شرایط هوازی مواد ، بکارگرفته شود . نتایج این آزمون باید فقط به عنوان راهنمایی برای سمیت مواد مورد آزمون در نظر گرفته شود ، زیرا لجن فعالی که از منابع مختلف برداشت شده یا حتی لجن فعالی که در زمانها ی مختلف از یک منبع برداشت شده ممکن است از نظر ترکیب و تراکم باکتریایی متفاوت باشند . همچنین آزمون های آزمایشگاهی نمی توانند واقعاً مشابه با شرایط محیطی باشـند ؛ بعنـوان مثال تاکنون از سازش طولانی مدت میکروارگانیزمها به مواد مورد آزمون یا موادی که ممکن است درنتیجـه تصفیه فاضلاب جذب غشای[1] زیستی یا لجن فعال شود و در دوره زمانی طولانی، غلظت سمی ایجـاد کنـد گزارشی در دست نیست .

کیفیت آب ـ ارزیابی اثر مهارکنندگی ترکیبات موجود در آب بر روی رشد میکروارگانیسم ها ی موجود در لجن فعال

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روشی برای ارزیابی سمیت بالقوه ماده مورد آزمون برای رشد باکتریهای هوازی موجود در لجن فعال می باشد. این اثر مهاری منحصر به میکروارگانیزمهایی است که قابلیت رشد در محیط کشت آلی مشخصی را دارند .این روش اطلاعاتی را در مورد اثـرات مهـاری بـر میکروارگانیزمهـا در دوره گرمخانه گذاری تا ٦ ساعت در اختیار ما قرار می دهد .

۲ دامنه کاربرد

1- *Biofilm*

این روش برای آب ، پساب و موا د شیمیایی که در شرایط آزمون محلول هستند بکـار مـی رود . در مـورد مـواد فرار یا رنگی و موادی که ایجاد کدورت بصورت تعلیق[1] یا پاشیدگی[2] می نماینـد دقـت بیشـتری لازم است .

یـادآوری ۱ – در مورد مواد فرار بعلت مشکلات حفظ غلظت اولیه در ظروف آزمایش ، نتـایج آزمـون بایـد بـا احتیاط تفسیر شود .

یادآوری ۲ – مواد رنگی و موادی که حلالیت کمی در آب دارند و بصورت تعلیق یا پاشیدگی ایجـاد کـدورت مـی کننـد را مـی تـوان در بعـــضی مـوارد بـا اسـتفاده از کنتـرل هـای رنگ/کـدورت بعنـوان شـاهد (بند ۸-۲) مورد آزمون قرار داد .

یادآوری ۳ – در مواردی که این آزمون عملی نیست ، اثرات مهاری مواد مـورد آزمـون بـر میکروارگانیزمهـای لجن فعال را می توان ، با استفاده از یک آزمون مهاری که برپایه اندازه گیری های تنفس سـنجی اسـت تعیـین نمود .

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و/ یا واژه ها با تعاریف زیر بکار می رود :

۳-۱ رشد

افزایـــش تـعداد سلولهای میکربی در طول دوره آزمون که بوسیله اندازه گیری تـوده زیسـتی[1] یـک کشـت تعیین می شود .

1- Suspention
2 - Dispersion
[1] Biomass

یادآوری ـ توده زیستی با روشهای مناسب دیگری مثل کدورت سنجی با بیناب سنج[1] در طول موج ۵۳۰ نـانومتر و برحسب واحد کدورت نسبی بیان می شود .

۳-۲ منحنی رشد

منحنی حاصل از اندازه گیری رشد توده زیستی برحسب زمـان گـرمـخانـه گذاری است .

۳-۳ سرعت رشد مخصوص (μ)

دوبرابرشدن توده زیستی (x) در واحد زمان(t)

$\mu=1/x \cdot dx/dt$

یادآوری ـ سرعت رشد معمولاً بر ساعت (h^{-1}) بیان می شود .

۳-۴ مهار رشد

اختلاف رشد در پایان زمان گرمخانه گذاری در حضور محیط آلی مورد آزمـون و مـواد مـورد آزمـون و در مخلوط مشابهی بدون مـواد مـورد آزمـون (شاهـد) بـا هم مورد مقایسه قرار می گیرند .

یادآوری ـ مهار رشد برحسب درصد بیان می شود .

۳-۵ منحنی مهار

منحنی مهار رشد بر حسب درصد که در مقابل غلظت لگاریتمی موا د مورد آزمون رسم می شود.

۳-۶ غلظت مؤثر[2]

غلظـتی از مواد مورد آزمون که رشـد میکروارگانیزمها را مهار می کند . میزان مـهـار رشـد را مـی تـوان محاسـبه نموده یا از طریق منحنی مهار ۵۰٪ یا ۲۰٪ یا ۸۰٪ در مقایسه با شاهد بدست آورد.

---

[1] Spectrophotometer
[2]- Effective concentration

۴ اساس آزمون

ظروف حاوی محیط آلی مورد آزمون ومواد موردآزمون با یک کشت ۲٤ ساعته میکروارگانیزمهای لجن فعال ، تلقیح شده و در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سلسیوس بر روی بهمزن گرمخانه گذاری می شوند .بطور معمول زمان کل آزمون ٦ ساعت است که شامل حدود ٤/٥ ساعت زمان تماس[1] می باشد. توده زیستی این کشتها و کنترل های شاهد که فاقد مواد مورد آزمون است ، با استفاده از یک روش مناسب تعیین می شود . اندازه گیری کدورت توسط بیناب سنج در طول موج ۵۳۰ نانومتر و بیان توده زیستی برحسب واحدهای نسبی(*OD 530*) انجام می پذیرد . درصد مهار رشد در پایان گرمخانه گذاری درمقایسه با کنترل های شاهد محاسبه شده و سپس منحنی آن در برابرغلظت مواد مورد آزمون ، (بطور مثال به شکل یک منحنی نیمه لگاریتمی) رسم می شود و با استفاده ازآن *EC value* تعیین می گردد . حساسیت میکروارگانیزمهای لجن فعال را می توان در برابر یک ماده مرجع بررسی نمود .

۵ شرایط محیطی آزمون

گرمخانه گذاری باید در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سلسیوس و در تاریکی یا در مکانی که نور بطور غیرمستقیم بتابد و عاری از بخارات سمی برای میکروارگانیزمها باشد، انجام گیرد .

۶ مواد لازم

۶-۱ آب بدون یون (دیونیزه) یا آب مقطر

۶-۲ محیط کشت آلی

ترکیبات	مقدار
محلول الف	۱۰ میلی لیتر
محلول ب تاث	۱ میلی لیتر
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

۶-۲-۱ محلول الف

[1] - Exposure

پتاسیم دی هیدروژن فسفات بدون آب (KH_2PO_4)	۸/۵ گرم
دی پتاسیم هیدروژن فسفات بدون آب (K_2HPO_4)	۲۱/۷۵ گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات با دو ملکول آب ($Na_2HPO_4, 2H_2O$)	۳۳/٤ گرم
آمونیم کلرید(NH_4Cl)	۰/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

به منظور کنترل این محلول بافر ، pH را اندازه گیری کنید . pH باید حدود ۷/٤ باشد . در غیر این صورت محلول جدیدی تهیه نمایید .

۶-۲-۲ محلول « ب »

۲۲/۵ گرم منیزیم سولفات با هفت ملکول آب ($MgSO_4 , 7H_2O$) را در هزار میلی لیترآب حل نمایید .

۶-۲-۳ محلول « پ »

۳٦/٤ گرم کلسیم کلرید با یک ملکول آب ($CaCl_2 . H_2O$) را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل نمایید.

۶-۲-۴ محلول « ت »

۰/۲۵ گرم فریک کلرید با ٦ ملکول آب($FeCl_3 .6H_2O$) را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل کنید. این محلول را درست قبل از استفاده تهیه نمائید .

یادآوری - اگر یک قطره اسید هیدروکلریک غلیظ به این محلول اضافه کنید ،لازم نیست که آنرا درست قبل از استفاده تهیه نمایید .

۶-۲-۵ محلول « ث »

توصیه می شود برای تسریع رشد هوازی ،ترکیبات زیر را اضافه کنید.

اسید بوریک (H_3BO_3)	۵۰ میلی گرم
کبالت کلرید ، با ٦ مولکول آب ($CoCl_2 , 6H_2O$)	۵۰ میلی گرم
دی سدیم مولیبدات با ۲ مولکول آب ($Na_2MoO_4 ,2H_2O$)	۱۵ میلی گرم
نیکل کلرید با ٦ مولکول آب($NiCl_2 ,6H_2O$)	۱۰ میلی گرم
روی سولفات با هفت مولکول آب($ZnSO_4 ,7H_2O$)	۵۰ میلی گرم

ترکیبات مذکور را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل نمایید .

۶-۲-۶ محلول چ (سوبسترای آلی)

۸۰ گرم پودر آبگوشت[1] (مخلوط عصاره گوشت[2] و پپتن بصورت تجارتی در دسترس است) و ٦٠ گرم سدیم استات را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل کنیدو یا بجای آن می توان از ترکیبات آلی مشابه موجود در فاضلاب استفاده نمود .

۶- ۳ محلول سدیم آزاید (اختیاری)

۱۰۰ گرم سدیم آزاید(NaN_3) را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر یا آب بدون یون حل کنید . این محلول به عنوان نگهدارنده استفاده می شود .

۶-۴ محلول سدیم هیدروکسید

٤٠ گرم سدیم هیدروکسید($NaOH$) را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید . این محلول برای تنظیم pH استفاده می شود .

۶-۵ محلول اسید سولفوریک (H_2SO_4)

۹۸ گرم اسید سولفوریک را در۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید .این محلول برای تنظیم pH استفاده می شود.

۶-۶ محلول مورد آزمون

نمونه های آب و پساب را یا مستقیماً استفاده کنید و یا در صورت لزوم آنها را رقیق کنید .برای تهیه محلول ذخیره مقدار مناسبی از مواد مورد آزمون محلول در آب مثلاً ۱۰۰۰ میلی گرم را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید .در صورت لزوم pH محلول ذخیره و پساب را با استفاده از محلولهای بند ٦– ٤ و ٦ – ٥ روی $pH = ٧ \pm ٠/٢$ تنظیم کنید . اگر اثر ترکیبات اسیدی یا بازی مورد نظر است pH را تنظیم نکنید .درنمونه هایی که کدورت زیادی دارند تعیین میزان کدورت نیزلازم میباشد.

۶-۷ تهیه محلول ذخیره جهت ماده مرجع

1- Nutrient broth
2- Beef extract

۱۰۰۰ میلی گرم ۳ ، ۵ دی کلروفنل را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر ، حل کرده وبا محلولهای بند ٦-٤ ، ٦-٥ ، pH را روی ۰/۲ ±۷ تنظیم نمایید .

۸-۶ ماده تلقیحی

برای تهیه ماده تلقیحی از لجن فعال , ترجیحاً از حوضچه های هوادهی فاضلابهای خانگی استفاده میگردد . بدین منظور , از مایع رویی لجن فعال موردنظر, که حداقل بمدت ۱۵ دقیقه ته نشین شده استفاده نمایید . ترجیحاً مایع تلقیح تازه تهیه شده را , به کار ببرید ، ولی در صورت لزوم می توان , مایع تلقیحی که بمدت ۲٤ ساعت در حرارت ٤ درجه سلسیوس نگهداری شده را بکار برد .

۷ وسایل لازم

همه ظروف شیشه ای مورد استفاده باید کاملاً تمیز بوده ومخصوصاً عاری از هرگونه مواد آلی و سمی باشند . لوازم آزمایشگاهی معمول و وسایل زیر موردنیاز است :

۱-۷ ظروف آزمایش

ارلن مایر در پوش دار به گنجایش ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتر

۲-۷ همزن[1]

برای ظروف ارلن مایر با سرعت حدود۱۵۰ دور در دقیقه .

۳-۷ گرمخانه

گرمخانه یا اطاقی با دمای ثابت ۲ ± ۲۲ درجه سلسیوس .

۴-۷ بیناب سنج

1- Shaker

بیناب سنج با " سل[2] " مناسب ، ترجیحاً با ضخامت عبور یک یا ٤ سانتیمتر و یا هر دستگاه دیگری که توده زیستی را تعیین کند .

۵-۷ ***pH*** **متر**

۸ روش اجرای آزمون

۸-۱ طراحی آزمون

از طرحهای آزمایشگاهی متنوعی می توان استفاده نمود .(پیوست الف) مثلاً در مورد مواد مورد آزمون محلول در آب طرحهای زیر قابل استفاده است :

الف) آزمون اولیه

برای تعیین محدوده غلظت موردنیاز جهت آزمون نهائی ، یک آزمون اولیه با استفاده ازغلظت های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر ماده مورد آزمون و شاهدها ترتیب دهید ..

ب) آزمون نهائی

انجام یک آزمون نهائی با استفاده از حداقل پنج غلظت با رعایت تصاعد هندسی درمحدوده سمیت پیش بینی شده (برای مثال ۱ میلی گرم درلیتر ، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر ، ۱,۰۰۰ میلی گرم در لیتر ، ۱۰,۰۰۰ میلی گرم در لیتر) و تهیه شاهدها با استفاده از اطلاعات بدست آمده از آزمون اولیه .

ج) انجام آزمون در غلظتی از نمونه همراه با شاهدها که تا آن غلظت هیچگونه اثر سمی پیش بینی نمی شود (مثلاً ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بعنوان یک غلظت مناسب).

۸-۲ آزمون و ظروف شاهد

تعداد کافی ظروف ارلن مایر با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر را برچسب زده و برای موارد زیر آماده کنید :

F_T – حداقل دو ظرف , برای آزمون F_T برای هر غلظتی از مواد مورد آزمون (٦-٦)

2- Cell

F_R – حداقل دو ظرف F_R برای هر غلظت مناسب از مواد مرجع (٦–٧)

F_B – حداقل دو ظرف F_B بعنوان شاهد بدون مواد مورد آزمون (نمونه تهی)

F_C – حداقل یک ظرف F_C بعنوان شاهد رنگ / کدورت در هر غلظت آزمون ، حاوی محیط آلی و مواد مورد آزمون و بدون تلقیح فقط وقتی که مواد رنگی یا مواد کدر ، مورد آزمون قرار می گیرند از F_C بعنوان کنترل استفاده نمایید .

یادآوری ـ اگر داده های اندازه گیری شده بصورت آماری بیان می شود ظروف و شاهدهای بیشتری موردنیاز است .

۸–۳ پیش کشت

حدود ۲۰–١٦ ساعت قبل از آغاز آزمون ، پیش کشتی با حجم کافی تهیه نمائید , تا مطمئن باشید که در آن میزان کافی توده زیستی برای شروع کشت اصلی وجود دارد .

غلظتی از ماده تلقیحی (بند ٦–٨) ۰/۵ میلی لیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت آلی (بند ۵–۲) در ظروف ارلن مایر (بند ۷–۱) استفاده نمائید. اگر تجربه ای در مورد کیفیت ماده تلقیحی (بند ٦–٨) ندارید ، بهتر است که در بعضی از ظروف ، تلقیح را با حجم های کمتر و بعضی ظروف را , با حجم های بیشتر انجام دهید . درب ظروف را با درپوش پنبه ای ببندید و در حالیکه آنها را روی همزن گذاشته اید ، بمدت ۲۰ – ١٦ ساعت گرمخانه گذاری کنید .(سرعت بهم خوردن ۱۵۰ دور در دقیقه باشد) .

بعد از دوره پیش کشت،یک نمونه از هر ظرف را برداشته و توده زیستی آنرا اندازه بگیرید . (بند ۸–٤) . کشتهایی که کدورت آنها بیش از ۰/٦ در سل های با ضخامت عبور یک سانتیمتر و یا کدورت بیش از ۱/۵ در سل هایی با ضخامت عبور ٤ سانتیمتر باشد ، واحد جمعیت انبوه میکربی در حال رشد در مرحله رشد لگاریتمی می باشد که می توان از آن بعنوان منبع تلقیح در آزمون نهائی استفاده نمود.

۸–۴ اندازه گیری توده زیستی

برای اندازه گیری رشد , هر روش تعیین کننده توده زیستی را می توان بکار برد .توصیه میشود که از روش اندازه گیری کدورت , با یک بیناب سنج در طول موج ۵۳۰ نانومتر یا در طول موج های مناسب دیگر استفاده شود . نتایج را برحسب واحدهای کدورت نسبی , بیان کنید . بطور مثال در مورد اندازه گیری کدورت ، می توان از سل های با ضخامت عبور ۱ سانتی متر و ٤ سانتی متر استفاده نمود و به ازای هر یک میلی لیتر از نمونه , ۲۰ میکرولیتر محلول سدیم آزاید اضافه نموده و کاملاً مخلوط کنید . این نمونه ها را می توان تا زمان اندازه گیری ، در دمای اطاق تا ٢٤ ساعت نگهداری نمود . باید به هنگام اندازه گیری آنرا کاملاً مخلوط کنید .کدورت را در سل واجد محیط کشت آلی فاقد ماده تلقیحی کدورت را اندازه

گیری کنید . در مورد , مواد مورد آزمون رنگی یا کدر ، کدورت سل ها را نسبت به کنترل F_C (۸-۲) حاوی ۲۰ میکرولیترمحلول سدیم آزاید

(٦-۳) ، اندازه گیری نمایید .

یادآوری ۱ ـ همچنین کدورت را می توان با استفاده از روش نفلومتری (محلول فورمازین) بر حسب واحد FNU تعیین نمود . تحقیقات نشان داده است که بین کدورت و توده زیستی که بعنوان تراکم سلول باکتریایی بیان می شود ارتباط مستقیم وجود دارد .

یادآوری ۲ ـ وقتی که اندازه گیری توده زیستی ، فوراً بعد از نمونه برداری انجام شود می توان از محلول سدیم آزاید استفاده نکرد .ولی در مواردی که فاصله زمانی بین نمونه برداری و اندازگیری توده زیستی وجود داشته باشد حتماً باید سدیم آزاید اضافه شود.

۸-۵ تهیه کشت اصلی

برای تهیه کشت اصلی ابتدا باید مقدار مناسبی از محیط کشت آلی (٦-۲) (تجربه نشان داده است که در بیشتر موارد ٤۰۰ میلی لیتر مناسب است) را در ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت ، ۳ میلی لیتر از پیش کشت که خوب رشد کرده (۸-۳) را به آن اضافه کنید و در همان شرایطی که برای پیش کشت ها معین شده گرمخانه گذاری نمایید . نمونه ها را در فواصل زمانی منظم از گرمخانه خارج کرده و توده زیستی آنها را اندازه بگیرید (۸-٤) معمولاً بعد از ۳-۱ ساعت گرمخانه گذاری ، کشت اصلی به شروع فاز سریع رشد لگاریتمی میرسد (بطور مثال کدورت ۰/۱ تا ۰/۱۵ , OD۵۳۰ درسل های با ضخامت عبوریک سانتیمتر) در این زمان کشت اصلی را تقسیم کنید و به همان ترتیب که دربند ۸-٦ آمده است آزمون را ادامه دهید .

۸-٦ مراحل آزمون

۲۰ میلی لیتر کشت اصلی که قبلاً گرمخانه گذاری شده (۸ –۵) و غلظت های مطلوب از مواد مورد آزمون و مواد مرجع را به ظروف تهیه شده اضافه نمایید و با آب آنرا به حجم ۲۵ میلی لیتر برسانید . نمونه ای از آنرا برای تعیین توده زیستی بکارگیرید (۸ –٤) . برای اندازه گیری کدورت در سل های با ضخامت عبور ٤ سانتیمتری ، حجم مناسبی را بکار برید

.گرمخانه گذاری میکروارگانیزمها را در مـجاورت مواد مورد آزمون ادامه دهید. نمونه ها را در فواصل زمانی منظم(بـرای مثـال هر ساعت) یا حداقل در پایان دوره گرمخانه گذاری از گرمخانه خارج نموده و توده زیستی آنها را اندازه بگیرید.

کل دوره گرمخانه گذاری نباید بیشتر از ٦ ساعت باشد تا اینکه وجود مرحله رشـد لگـاریتمی باکتریهـا در طـول دوره زمـانی آزمون رعایت شود .زمان مجاورت با مواد مورد آزمون کمتر از ٦ ساعت و حدود ٥-٤ ساعت است . در پایـان دوره گرمخانـه گذاری توده زیستی را اندازه گیری نموده و مهار رشد را تعیین نمایید .

برای رسم منحنی رشـد لازم است در فواصل زمانی منظم بطور مثال هر ساعت توده زیستی اندازه گیری شود .

شکل منحنی رشد اطلاعات مفیدی را درباره بی نظمی ها در رشد و مشخصات فرآیندهای مهاری فراهم می نماید . در مـورد بعضی از مواد شیمیایی سمی ، منحنی های رشد ، یک مرحله تأخیری اولیه را نشان می دهد و بـدنبال آن افـزایش در میزان سرعت رشد دیده می شود که نشانه سازش سریع یا قدرت تحمل بعضی از ارگانیزمهای مورد آزمـون در مقابل مواد مورد آزمون است. توصیه می شود که در آزمون های اولیه ، رشد میکروارگانیزمها را درکنترل شاهد تعیین نموده و از اطلاعات بدست آمده برای مشخص نمودن زمان تماس مناسب و همچنین کل زمان آزمون برای رسیدن به فاز رشد لگاریتمی استفاده نمایید .

۹ منحنی های رشد

نتایج آزمون در پایان دوره رشد لگاریتمی محاسبه می شود . برای بدست آوردن اطلاعات در مـورد رشـد طبیعی میکروارگانیزمها منحنی اندازه گیری های لگاریتمی توده سلولی (٨-٤) برحـسب زمـان را بـرای هر غلظتی از مواد مورد آزمون ، شاهدها و مواد مرجع (٨-٢) رسم نماییـد . بـا اسـتفاده از میـانگین هـای بدست آمده ، منحنی رشد را رسم کنید . مثالی از منحنی های رشد در پیوست ب آمده است .

۹-۱ محاسبه مهار رشد

درصد مهار رشد (I) را در هر غلظت از فرمول زیر محاسبه کنید :

$$I = [(B_c - B_t) / (B_c - B_a)] \times ۱۰۰$$

که در این فرمول

B_c : میانگین کدورت اندازه گیری رشد (OD ۵۳۰) در انتهای زمان گرمخانه گذاری در ظروف کنترل شاهد F_B است .

B_t :میانگین کدورت اندازه گیری شده (OD ۵۳۰) در انتهای زمان گرمخانه گذاری در ظروف مربوط به آزمون Ft است .

B_a : میانگین کدورت اندازه گیری شده (OD ۵۳۰) ، وقتی که کشت اصلی تقسیم شده و مواد مورد آزمون به ظروف Ft اضافه شده است .

از اطلاعات بدست آمده از آزمونهای اولیه و نهائی برای رسم منحنی درصد مهار ، بر لگاریتم غلظت ماده مورد آزمون استفاده کنید تا یک منحنی مهار بدست آورید .با محاسبه یا درون یابی از روی این نمودار، میزان ۵۰ EC را بعنوان غلظتی که درمقایسه با کنترل شاهد ۵۰ درصد رشدرا مهار می کند ، تعیین نمایید .

اگر اطلاعات کافی در دسترس باشد با ۹۵ درصد حد اطمینان، ۵۰ EC و مقادیر EC های اضافی ($EC_{۶۰}$ ، $EC_{۷۰}$ ، $EC_{۸۰}$) را می توان تعیین نمود . $EC_{۲۰}$ نشانه آغاز محدوده مهار و $EC_{۸۰}$ نشانه پایان محدوده مهار می باشد .

در ظروف F_R به همان روش ، مهار رشد توسط مواد مرجع را اندازه گیری کنید و مقادیر EC را تعیین نمایید .

با توجه به تغییر پذیری که اغلب در نتایج مشاهده می شود ممکن است در بسیاری موارد کافی باشد که نتایج در رابطه با حجم ، بیان شود .

بطور مثال :

کمتر از ۱ میلی گرم در لیتر

بین ۱ میلی گرم در لیتر تا ۱۰ میلی گرم در لیتر

بین ۱۰ میلی گرم در لیتر تا ۱۰۰ میلی گرم در لیتر

بیشتر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر

در بقیه موارد کافی است که نشان دهیم که هیچ اثر سمی مشاهده نشده است (کمتر از ۲۰ EC)

۱۰ تفسیر نتایج

از نتایج این آزمون می توان برای انتخاب غلظت ماده مورد آزمون در آزمایشهای تجزیه زیستی استفاده نمود . غلظت مناسب غلظتی است که در آن هیچ مهار رشدی صورت نگیرد .

(کمتر از EC۲۰) نتایج آزمون ، معرف اثر یکسان ماده مورد آزمون بر مراحل تصفیه بیولوژیک فاضلاب می باشد . رأی نهایی در مورد اثرات مواد شیمیایی برتصفیه فاضلاب را بعلت اثرجذب سطحی احتمالی و واکنش های ممکن با ترکیبات شیمیایی موجود در فاضلاب و نیز تعویق در تجزیه زیستی پس از یک دوره سازش ، باید بعد از اجرای آزمون شبیه سازی بیان شود .

حساسیت میکروارگانیزمهای لجن فعال بوسیله مواد مرجع بررسی می شود .$EC50$ در مورد ماده ۳ و ۵ دی کلروفنل (بعنوان ماده مرجع) ، باید حدود ٤ تا ۱۲ میلی گرم بر لیتر باشد . توده زیستی کافی باید در دسترس باشد . اگر توده زیستی در ظروف کنترل شاهد (F_B) (بند ۸-۲) توسط اندازه گیری کدورت در سل هائی با ضخامت عبور یک سانتیمتر تعیین شود ، جذب نهایی در طول موج ۵۳۰ در پایان دوره گرمخانه گذاری باید حداقل ۰/۸ باشد .

در غیر اینصورت باید آزمون با تلقیحی از منبع دیگر تکرار شود .

۱۱ تجدید پذیری

در سالهای ۱۹۹۵ آزمون بین آزمایشگاهی بین المللی باشرکت ۲۳ آزمایشگاه بر اساس آزمون توصیف شده در این استاندارد اجرا شد . نتایج بدست آمده با ترکیبات ۳ و ۵ دی کلروفنل و پتاسیم سیانید در جدول ۱ نشان داده شده است تمام اطلاعات حاصل از روش آزمون بین آزمایشگاهی بر اساس این استاندارد اعتبار و صحت روش را تأیید می نماید .

جدول ۱ ـ سرعت رشد مخصوص ـ نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

مواد مورد آزمون	پارامتر	تعداد نتایج	میانگین سرعت رشد مخصوص	انحراف معیار	پراکندگی

۳ و ۵ دی کلروفنل	$EC_{۲۰}(mg/l)$ $EC_{۵۰}(mg/l)$ $EC_{۸۰}(mg/l)$	۲۹ ۳۳ ۲۹	٤/۲ ۸/۱ ۱۵/۹	۱/۵ ۲/٤ ۵/۲	٪۳٦ ٪۲۹ ٪۳۳
پتاسیم سیا نید	$EC_{۲۰}(mg/l)$ $EC_{۵۰}(mg/l)$ $EC_{۸۰}(mg/l)$	۱۸ ۱۷ ۱۳	۵/۵ ۱۲/۳ ۲۷/۷	۳/٤ ۵/۳ ۱۳/٦	٪٦۲ ٪٤۳ ٪٤۹
پارا مترهای رشد شاهدها	سرعت رشد مخصوص کدورت نهایی	٦۹ ٦۹	./٥٦ ۱/۰٤	./۱۹ ./٤۷	٪۳٤ ٪٤٥

۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حداقل واجد اطلاعات زیر باشد .

الف) ارجاع به این استاندارد

ب) تمام اطلاعات لازم در مورد مشخصات مواد مورد آزمون

ج) منبع وهرگونه آماده سازی میکروارگانیزمهای لجن فعال

د) دمای آزمون و pH اندازه گیری شده

هـ) توده زیستی در پایان دوره گرمخانه گذاری کنترل شاهد

و) نام مواد مرجع و $EC_{۵۰}$.

ز) اطلاعات اندازه گیری شده در مورد توده زیستی ، منحنی های رشد ، منحنی مهار ، $EC_{۵۰}$. و در صورت امکان $EC_{۲۰}$. و $EC_{۸۰}$. و در صورت نیاز اطلاعات آماری

ح) هرگونه ملاحظات وانحرافات از روش آزمون استاندارد که می تواند روی نتیجه آزمون مؤثرباشد.

ط) تاریخ انجام آزمون

پیوست الف

(اطلاعاتی)

آزمون اولیه را مطابق جدول الف ـ ۱ انجام دهید. مثالهایی از محتویات ظروف کنترل و آزمون

جدول الف ـ ۱ : مثالهایی از محتویات ظروف کنترل و آزمون

حجم کل میلی لیتر	آب میلی لیتر	محیط کشت تلقیح نشده میلی لیتر	محیط کشت تلقیح شده میلی لیتر	حجم : میلی لیتر مواد مورد آزمون /مواد مرجع / محلول ذخیره[1]	غلظت : میلی گرم بر لیتر (مواد مورد آزمون – مواد مرجع)	محتویات	نشانه	شماره ظرف
۲۵	۵	۰	۲۰	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	مواد مورد آزمون	F_T F_T	۱ ۲
۲۵	٤/۷۵	۰	۲۰	۰/۲۵	۱۰	مواد مورد آزمون	F_T F_T	۳ ٤
۲۵	۲/۵	۰	۲۰	۲/۵	۱۰۰	مواد مورد آزمون	F_T F_T	۵ ٦
۲۵	۵	۰	۲۰	۰/۱۲۵	۵	مواد مرجع	F_R F_R	۷ ۸
۲۵	۵	۰	۲۰	۰	۰	کنترل شاهد	F_B F_B	۹ ۱۰
۲۵	۵	۲۰	۰	۰/۰۲۵	۱	کنترل رنگ/کدو رت	F_C	۱۱
۲۵	٤/۷۵	۲۰	۰	۰/۰۲۵	۱۰	کنترل رنگ/کدو رت	F_C	۱۲
۲۵	۲/۵	۲۰	۰	۲/۵	۱۰۰	کنترل رنگ/کدو رت	F_C	۱۳

آزمون نهایی

در مورد آزمون نهائی برای F_T و F_C غلظت های زیر را استفاده نمایید .

۲ میلی گرم در لیتر ، ٤ میلی گرم در لیتر ، ۸ میلی گرم در لیتر ، ١٦ میلی گرم در لیتر و ۳۲ میلی گرم در لیتر

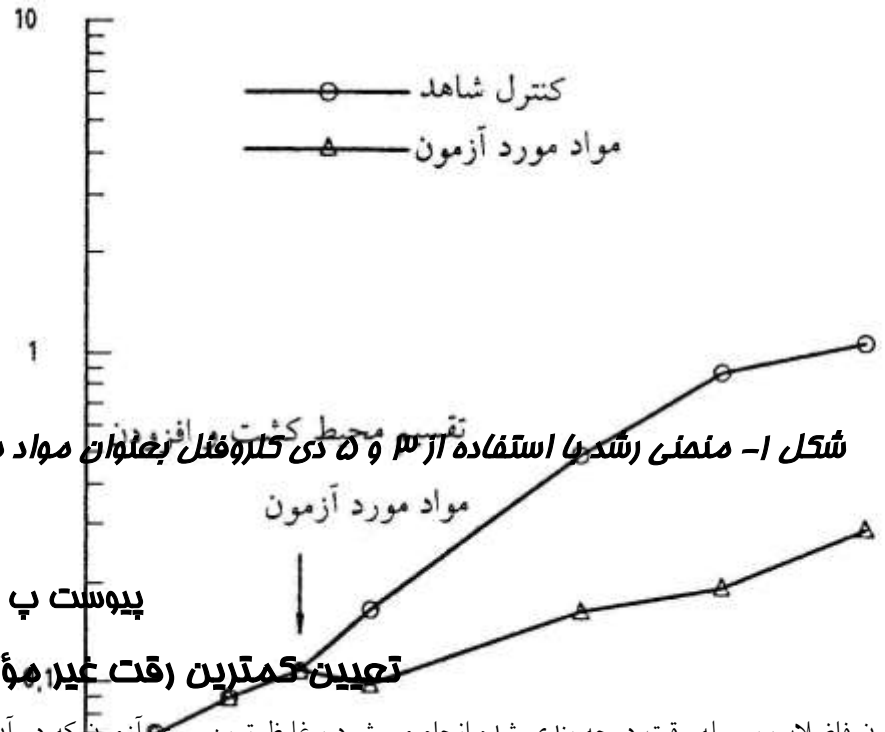
و به انضمام ظروف یا اطلاعات آزمون اولیه

پیوست ب

۱- غلظت محلول ذخیره مواد مورد آزمون و مواد مرجع در این مثال یک گرم در لیتر می باشد .

نمونه ای از منحنی رشد با استفاده از ۳ و ۵ دی کلروفنل بعنوان ماده مورد آزمون

(اطلاعاتی)



شکل ۱- منحنی رشد با استفاده از ۳ و ۵ دی کلروفنل بعنوان مواد مورد آزمون

پیوست پ (اطلاعاتی)

تعیین کمترین رقت غیر مؤثر فاضلاب

در مواردی که آزمون فاضلاب بوسیله رقت درجه بندی شده انجام می شود ، غلیظ ترین سری آزمون که در آن کمتر از ۲۰٪ مهار رشد میکروارگانیزمها مشاهده شده ، کمترین رقت غیر مؤثر(LID) نامیده می شود . در آزمون مهار رشد باکتریها ، محیط کشت غیر آلی (معدنی) از محلول های بند ٦-۲-۱ تا ٦-۲-۵ تهیه شده و مخلوط نموده و می تواند برای رقیق کردن فاضلاب مورد استفاده قرارگیرد مقادیری از سوبسترای آلی (محلول ٦-۲-۱-٦ مطابق با ٦-۲-۲) را به هرکدام از ظروف آزمون و کنترل شاهد (تهی) اضافه کنید و تلقیح را انجام دهید . برای تهیه مقدار کافی فاضلاب ، در مخلوط نهایی با ضریب رقت ۲ ، فقط ۱۰ میلی لیتر از کشت اصلی را برای پیش گرمخانه گذاری استفاده نمایید (بند ٦-۹ را ملاحظه نمایید) . بطور معمول از حجم های یکسان فاضلاب و ترکیبات باقیمانده مخلوط و مواد مورد آزمون بعنوان رقت مینیمم استفاده می شود . بنابراین ضریب رقت ۲ $D \geq$ بعنوان یک اصل می توان پذیرفت .

بطور مثال برای بدست آوردن آزمون کلی با حجم ۲۵ میلی لیتر ترکیبی از فاضلاب و ترکیبات باقیمانده مخلوط مورد آزمون در جدول زیر نشان داده شده است .

جدول پ ـ ۱ : تعیین کمترین رقت غیر موثر فاضلاب

سهم فاضلاب در کل مخلوط	ضریب غلظت	فاضلاب میلی لیتر	سایر ترکیبات میلی لیتر
۱ در ۲	۲	۱۲/۵	۱۲/۵
۱ در ۳	۳	۸/۳	۱٦/۷
۱ در ٤	٤	٦/۲	۱۸/۸
۱ در ٦	٦	٤/۲	۲۰/۸

۲۱/۹	۳/۱	۸	۱ در ۸
۲۲/۹	۲/۱	۱۲	۱ در ۱۲
۲۳/٦	۱/٤	۱٦	۱ در ۱٦
۲٤/۱	۰/۹	۲٤	۱ در ۲٤
۲٤/۲	۰/۸	۳۲	۱ در ۳۲
۲۵	۰	۰	کنترل شاهد

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

6858_

Water – Determination of the inhibitory Effect of water Constituents on the Growth of activated sludge microorganisms

1st. Revision