www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

۷۶۱۷

کیفیت آب - آزمون مهار رشد جلبک آب شیرین به وسیله جلبک های سبز تک سلولی

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 - آزمون مهار رشد جلبك آب شیرین به وسیله جلبك هاي سبز تك سلولي "

رئیس	سمت یا نمایندگی
اصغر زاده ، احمد (دکتراي میکروبیولوژي خاك)	موسسه تحقیقات بیولوژي خاك وآب
اعضاء	
آزموده ، مهدي (لیسانس مهندسي کشاورزي)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتي استان کرمان
اميري ، حميد (لیسانس میکروبیولوژي)	شرکت صنایع شیمیایي کرمان زمین
پوررحیمي ، مسعود (لیسانس مهندسي کشاورزي)	شرکت خدمات حمایتي کشاورزي
حافظي اردکاني ، پرتو (لیسانس شیمي کاربردي)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتي استان کرمان
دهقاني ، فاطمه (لیسانس شیمي محض)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتي استان کرمان
سرچشمه پور ، مهدي (فوق لیسانس مهندسي خاك شناسي)	مرکز تحقیقات کشاورزي کرمان

علايي ، آناهيتا (فوق ليسانس شيمي كاربردي)	اداره كل استاندارد و تحقيقات صنعتي استان كرمان
كرمي ، اكبر (فوق ليسانس بهداشت محيط)	شركت آب و فاضلاب كرمان
كيانفر ، مريم (فوق ليسانس شيمي تجزيه)	اداره كل استاندارد و تحقيقات صنعتي استان كرمان
دبير	
خالقي ، موج (فوق ليسانس ميكروبيولوژي)	اداره كل استاندارد و تحقيقات صنعتي استان كرمان

فهرست مندرجات

صفحه
پيش گفتار ..... ب
۱ هدف و دامنه كاربرد ۱
2 مراجع الزامي ۱
۳ اصطلاحات و تعاريف ۲
٤ اساس روش ٤
٥ مواد لازم ٤
٦ وسايل لازم ۸

۷ روش آزمون ۹
۸ محدوده مورد قبول ۱۴
۹ روش محاسبه نتایج ۱۵
۱۰ بیان نتایج ۱۸
۱۱ تفسیر نتایج ۱۹
۱۲ دقت روش ۱۹
۱۳ گزارش آزمون ۲۰
پیوست الف (اطلاعاتي) جداسازي سريع مهاركننده رشد جلبك آب شيرين ۲۳
پیوست ب (اطلاعاتي) منابع ۳۰

پیش گفتار

استاندارد " كيفيت آب - آزمون مهار رشد جلبك آب شيرين به وسيله جلبك هاي سبز تك سلولي " كه توسط كميسيونهاي مربوط تهيه و تدوين شده و در شصت و سومين جلسه كميته ملي استاندارد ميكروبيولوژي و بيولوژي مورخ ۱۳۸۳/۷/۲۵ مورد تصويب قرار گرفته است، اينك به استناد بند يك ماده ۳ قانون اصلاح قوانين و مقررات موسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ بعنوان استاندارد ملي ايران منتشر مي شود.

براي حفظ همگامي و هماهنگي با تحولات و پيشرفت هاي ملي و جهاني در زمينه صنايع، علوم و خدمات، استانداردهاي ملي ايران در مواقع لزوم تجديد نظر خواهد شد و هر گونه پيشنهادي كه براي اصلاح يا تكميل اين استانداردها ارائه شود، در هنگام تجديد نظر در كميسيون فني مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت .
بنابراين براي مراجعه به استانداردهاي ايران بايد همواره از آخرين تجديد نظر آنها استفاده كرد.
در تهيه و تدوين اين استاندارد سعي شده است كه ضمن توجه به شرايط موجود و نيازهاي جامعه ، در حد امكان بين اين استاندارد و استاندارد ملي كشورهاي صنعتي و پيشرفته هماهنگي ايجاد شود.
منبع و ماخذي كه براي تهيه اين استاندارد به كار رفته به شرح زير است:

1- ISO 8692 : 2004, Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae .

كيفيت آب - آزمون مهار رشد جلبك آب شيرين بوسيله جلبك هاي سبز تك سلولي

۱ هدف و دامنه كاربرد

هدف از تدوين اين استاندارد ، تعيين و ارائه روش براي تعيين مهار رشد جلبك سبز تك سلولي ، توسط مواد و تركيبات موجود در آب يا پسآب مي باشد . اين روش براي موادي كه به آساني در آب حل مي شوند ، كاربرد دارد . با تغييراتي در اين روش (به بندهاي ۲-۱ و۲-۲، مراجعه نماييد) ، مي توان اثر ضعيف بازدارنده مواد معدني و مواد آلي محلول ، تركيبات فرار ، فلزات سنگين و پسآب را نيز بررسي نمود .
يادآوري- يك روش آزمون مهار رشد جلبك سريع براي پسآب ، در پيوست الف آمده است .

۲ مراجع الزامي

مدارك الزامي زير حاوي مقرراتي است كه در متن اين استاندارد به آنها ارجاع داده شده است . بدين ترتيب آن مقررات جزئي از اين استاندارد محسوب مي شود . در

مورد مراجع داراي تاريخ چاپ و/ يا تجديد نظر ، اصلاحيه ها و تجديد نظرهاي بعدي اين مدارك مورد نظر نيست . معهذا بهتر است كاربران ذينفع اين استاندارد ، امكان كاربرد آخرين اصلاحيه ها و تجديد نظرهاي مدارك الزامي را مورد بررسي قرار دهند . در مورد مراجع بدون تاريخ چاپ و/ يا تجديد نظر ، آخرين چاپ و/ يا تجديد نظر آن مدارك الزامي ارجاع داده شده مورد نظر است .

استفاده از مراجع زير براي كاربرد اين استاندارد الزامي است :

2-1 ISO 5667-16:1998, Water – Sampling – Part 16: Guidance on biotesting of samples .

2-2 ISO 14442:1999, Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials .

۳ اصطلاحات و تعاريف

در اين استاندارد اصطلاحات و / يا واژه ها با تعاريف زير به كار مي رود :

۳-۱ تراكم سلولي

X

تعداد سلول ها ، در واحد حجم محيط كشت است .

يادآوري - تراكم سلولي بر حسب سلول در ميلي ليتر ، بيان مي شود .

۳-۲ سرعت رشد ويژه

μ

افزايش سرعت نسبي بر حسب تراكم سلولي در واحد زمان است .

$$\mu = \frac{1dx}{xdt}$$

كه در آن :

x = تراكم سلولي برحسب سلول در ميلي ليتر ،

t = زمان بر حسب روز .

یادآوري – سرعت رشد ویژه بر حسب بر روز[1] (day^{-1}) ، بیان مي شود .

۳-۳ محیط رشد

مخلوط آب و مواد مغذي است، که در آن سلول هاي جلبك ، گرمخانه گذاري شده تا براي نمونه هاي شاهد و پیش کشت ، استفاده شوند .

۳-٤ آزمایه

نمونه هاي مایع (مانند پسآب) ، ترکیبات مخلوط و یا شیمیایي هستند، که در آنها اثر مهار بر روي رشد جلبك بررسي مي شود .

۳-٥ محیط آزمون

مخلوط آب ، مواد مغذي و آزمایه است .

۳-٦ بهر آزمون

مخلوط آب ، مواد مغذي و آزمایه (محیط آزمون ، طبق بند ۳-٥) بوده و بدون جلبك است .

۳-۷ شاهد

مخلوط آب ، مواد مغذي (محیط رشد ، طبق بند ۳-۳) و جلبك بوده و بدون ماده آزمون است .

۳-۸ غلظت موثر[1] (E_rC_x)

غلظتي از آزمایه است ، که موجب کاهش x درصدي سرعت رشد ویژه ، نسبت به شاهد مي شود .

یادآوري –براي نشان دادن نتیجه مقدار EC از سرعت رشد ، بهتر است از نشانه E_rC استفاده نمایید .

٤ اساس روش

سویه هاي جلبك خالص براي چندین نسل در یك محیط کشت محتوي محدوده اي از غلظت هاي ماده مورد آزمون ، که از طریق مخلوط کردن مقادیر مناسب از ماده مغذي ، آب

1- Inverse days (d^{-1})
1- Effective concentration

، محلول هاي ذخيره ماده آزمون و مايه تلقيح از سلول هاي جلبكي كه بطور تصاعدي رشد كرده اند ، كشت مي شوند . محلول هاي آزمون براي يك دوره زماني حداقل ۲±۷۲ ساعته ، گرمخانه گذاري شده و در خلال اين دوره تراكم سلولي در هر يك از آنها حداقل هر ۲۴ ساعت يك بار ، اندازه گيري مي شود . مهار به صورت كاهش رشد يا سرعت رشد ، نسبت به رشد كشت هاي شاهد تحت شرايط كاملا" يكسان ، اندازه گيري مي شود .

۵ مواد لازم

۵-۱ ارگانيسم هاي مورد آزمون

از گونه هاي جلبك پلانكتوني آب شيرين كه در زير آمده اند ، استفاده كنيد .

الف) SAG)86.81 (*Desmodesmus suspicatus*[1] ،

ب) *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak [2]

(SAG يا 61.81 4/278 CCAP , 22662 ATCC) .

يادآوري 1- اين دو گونه از خانواده جلبك هاي پلانكتوني سبز مي باشند ، كه متعلق به رده *Chlorococcales*
(Chlorophyta , Chlorophyceae) **بوده ، و معمولا" در محيط كشت به صورت تك سلولي هستند .**

سويه هاي جلبك تك سلولي از كلكسيون هاي زير قابل تهيه مي باشند :

- SAG : Collection of Algal Cultures Inst . Plant Physiology Unniversity of Gottingen Nikolausberger Weg 18 **D-**37073 **Gottingen Germany .**

- ATCC : American Type Culture Collection 12301 **Parklane Drive Rockville Maryland** 20852 **USA .**

- CCAP: Culture Centre of Algae and Protozoa Freshwater Biological Association The Ferry House Ambleside Cumbria LA 22 **OLP , UK .**

۱- در گذشته اين گونه تحت عنوان *Scenedesmus subspicatus* ، شناخته مي شده است .

۲- در گذشته اين گونه تحت عنوان *Selenastrum capricornutum* Printz ، شناخته مي شده است .

یادآوري 2- کشت هاي ذخیره، در محیط شرح داده شده در بند ۵-۳ و ۷-۱ ، مي توانند باقي بمانند . به هر حال ، تکرار کشت هاي بعدي[1] جهت جلوگیري از عدم رشد ، ضروري است (یك بار در هفته) . کشت ذخیره مي تواند براي دوره هاي طولاني تري بر روي محیط هاي کشت جلبك غني تر ، مثل محیط هایي که توسط مجموعه کشت (کلکسیون کشت) توصیه کرده است ، باقي بماند .

۵-۲ آب

تمام آبي که در آماده سازي محیط کشت و محلول هاي ماده آزمون استفاده مي شود ، باید یون زدایي شده و یا کیفیتي معادل آن داشته باشد (هدایت کمتر از ده میکرو زیمنس بر سانتي متر) . ضمن آماده سازي و ذخیره سازي آب از آلودگي آن به مواد آلي و معدني ، جلوگیري نمایید . از هیچ وسیله مسي ، نباید استفاده نمود .

۵-۳ مواد مغذي

مطابق با شرایط نوشته شده در جدول ۱ ، چهار محلول ذخیره زیر را در آب تهیه نمایید .

در نهایت ، این محلول ها را براي دست یافتن به غلظت هاي نهایي مواد مغذي در محلول هاي آزمون ، رقیق نمایید (به بند هاي ۷-۱ و ۷-٤ مراجعه نمایید) .

با این وجود ، ممکن است مواد مغذي ماکرو[1] مستقیما" به آب اضافه شوند .

تمام مواد شیمیایي استفاده شده ، از نظر کیفیت ، باید داراي درجه خلوص آزمایشگاهي باشند .

محلول هاي ذخیره را به وسیله صافي هاي غشایي (متوسط قطر منافذ ، باید ۰/۲ میکرومتر باشد) یا اتوکلاو (در دماي ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۵

1-Sub- Culturing
1- Macro – nutrient

دقيقه) ، سترون نماييد . محلول ها را در محل تاريك و در دماي چهار درجه سلسيوس ، نگهداري كنيد . محلول ذخيره شماره ٤ ($NaHCO_3$) را اتوكلاو نكنيد و تنها با صافي غشايي ، سترون نماييد .

جدول ١ - طريقه تهيه محلول هاي ذخيره

مواد مغذي	غلظت در محلول ذخيره	غلظت نهايي در محلول آزمون
محلول ذخيره شماره ١ : مواد مغذي ماكرو		
NH_4Cl	1/5 (گرم بر ليتر)	15 (ميلي گرم بر ليتر)
$MgCl_2.6H_2O$	1/2 (گرم بر ليتر)	12 (ميلي گرم بر ليتر)
$CaCl_2.2H_2O$	1/8 (گرم بر ليتر)	18 (ميلي گرم بر ليتر)
$MgSO_4.7H_2O$	1/5 (گرم بر ليتر)	15 (ميلي گرم بر ليتر)
KH_2PO_4	0/16 (گرم بر ليتر)	1/6 (ميلي گرم بر ليتر)
محلول ذخيره شماره ٢ : FE-EDTA		
$FeCl_3.6H_2O$	٨٠ (ميلي گرم بر ليتر)	٨٠ (ميكرو گرم بر ليتر)
$Na_2EDTA.2H_2O$	١٠٠ (ميلي گرم بر ليتر)	١٠٠ (ميكرو گرم بر ليتر)
محلول ذخيره شماره ٣ : عناصر كمياب		
H_3BO_3 *	١٨٥ (ميلي گرم بر ليتر)	١٨٥ (ميكرو گرم بر ليتر)
$MnCl_2.4H_2O$	٤١٥ (ميلي گرم بر ليتر)	٤١٥ (ميكرو گرم بر ليتر)
$ZnCl_2$	٣ (ميلي گرم بر ليتر)	٣ (ميكرو گرم بر ليتر)
$CoCl_2.6H_2O$	١/٥ (ميلي گرم بر ليتر)	١/٥ (ميكرو گرم بر ليتر)
$CuCl_2.2H_2O$	٠/٠١ (ميلي گرم بر ليتر)	٠/٠١ (ميكرو گرم بر ليتر)
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٧ (ميلي گرم بر ليتر)	٧ (ميكرو گرم بر ليتر)
محلول ذخيره شماره ٤ : $NaHCO_3$		
$NaHCO_3$	٥٠ (گرم بر ليتر)	٥٠ (ميلي گرم بر ليتر)

* H_3BO_3 مي تواند با افزودن سديم هيدروكسيد (۰/۱ مولار) حل شود .

٦ وسايل لازم

وسايل معمول آزمايشگاهي و وسايل شرح داده شده در زير :

يادآوري - تمام وسايلي كه با محيط كشت آزمون در تماس هستند ، بايد از جنس شيشه بوده و يا از موادي ساخته شده باشند ، كه از نظر شيميايي بي اثر مي باشند .

٦-١ كابينت يا اتاق با دماي كنترل شده با روشنايي ثابت و مداوم بوسيله نور فلورسنت سفيد مناسب ، براي برآورده كردن نياز روشنايي كشت در طي آزمون مطابق با آنچه در بند ٧-٦ نوشته شده است .

٦-٢ وسايل اندازه گيري تراكم سلول جلبك ، ترجيحا" از شمارش گر ذرات [1] يا ميكروسكوپ با محفظه شمارش كننده [2] ، استفاده كنيد . راه ديگر اندازه گيري تراكم سلول جلبك ، يك روش غير مستقيم با استفاده از فلوريمتر[3] است . اين روش ها ، زماني حساسيت كافي خواهند داشت ، كه رابطه مناسبي با تراكم سلولي به دست آمده باشد . وسايل به كار رفته ، بايد قادر به اندازه گيري دقيق تراكم سلولي ، در حد 10^4 سلول در ميلي ليتر بوده و همچنين توانايي افتراق بين رشد جلبك و اثرات مخرب مثل حضور ذرات و رنگ نمونه، داشته باشند . ممكن است طيف سنج ها حساسيت كافي براي اندازه گيري 10^4 سلول در ميلي ليتر كه طول مسير مناسب (بيشتر از ده سانتي متر) را فراهم مي نمايند ، دارا باشند . اين روش به خصوص به

1- Particle counter
2 - Counting chamber
3 – Fluorimeter

تداخل مواد معلق و سوسپانسیون هاي رنگي در تراکم سلولي کم ، حساس مي باشد .

۳-٦ **ظروف کشت** ، براي مثال : ظروف مخروطي ۲۵۰ ميلي ليتري با درپوش هايي با قابليت نفوذ هوا .

٤-٦ **وسايل استريل غشايي** ، از صافي هايي با متوسط قطر منافذ ۰/۲ ميکرومتر ، استفاده گردد .

٥-٦ **اتوکلاو** .

٦-٦ **pH متر** .

۷ روش آزمون

۱-۷ تهيه محيط رشد

محيط رشد را با افزودن حجم مناسبي از محلول هاي ذخيره مغذي (طبق بند ٥-۳) به آب ، تهيه نماييد : به حدود ٥۰۰ ميلي ليتر آب ،
۱۰ ميلي ليتر محلول ذخيره شماره ۱ (طبق بند ٥-۳) ،
۱ ميلي ليتر محلول ذخيره شماره ۲ (طبق بند ٥-۳) ،
۱ ميلي ليتر محلول ذخيره شماره ۳ (طبق بند ٥-۳) ،
و ۱ ميلي ليتر محلول ذخيره شماره ۴ (طبق بند ۵-۳) را ، اضافه نماييد و با آب به حجم ۱۰۰۰ ميلي ليتر برسانيد . در صورتيکه سترون نمودن توسط اتوکلاو ضروري باشد ، بايد محلول شماره ٤ را بعد از سترون نمودن ، اضافه نماييد . پيش از استفاده از آن ، آنرا در طول مدت يك شب ، در معرض هوا قرار دهيد يا به مدت زمان ۳۰ دقيقه با هواي استريل ، هوادهي نماييد تا به حال تعادل برسد . پس از برقراري تعادل ، در صورت لزوم ، با استفاده از محلول هيدروکلريك اسيد با غلظت يك مولار يا محلول سديم هيدروکسيد با غلظت يك مولار، pH را روي ۰/۲ ± ۸/۱ ، تنظيم نماييد . اين محيط رشد توسط بي کربنات و دي اکسيد کربن اتمسفر ، بافري مي شود . ممکن است مقادير مختلف pH

به وسیله تغییر غلظت HCO_3 و/ یا غلظت دي اکسید کربن اتمسفر به دست آید (طبق بند ۲-۲) . در صورتیکه براي اجراي تغییري در آزمون و یا مقدار pH ویژه ، اصلاحاتي لازم باشد ، باید به وضوح مشخص و گزارش شوند .

۷-۲ تهیه پیش کشت و مایه تلقیح

دو تا چهار روز قبل از شروع آزمون ، پیش کشت را تهیه نمایید . به منظور حفظ رشد تصاعدي تا شروع آزمون ، محیط رشد (طبق بند ۷-۱) را با حداقل تراکم سلولي مناسب (براي مثال : 5×10^3 تا 10^4 سلول در میلي لیتر از پیش کشت سه روزه) ، تلقیح نمایید . پیش کشت را تحت شرایطي یکسان با آزمون ، گرمخانه گذاري نمایید (طبق بند ۷-٦) . از این پیش کشت با رشد تصاعدي، به عنوان یك مایه تلقیح براي آزمون ، استفاده کنید . به منظور محاسبه حجم مایه تلقیح مورد نیاز ، بلافاصله پیش از استفاده ، تراکم سلولي را در کشت اولیه ، اندازه گیري نمایید .

۷-۳ انتخاب غلظت هاي آزمون

جلبك ها باید در معرض غلظت هایي از آزمایه با سري هاي هندسي، که نسبت آن ها از ۳/۲ تجاوز نکند (براي مثال : غلظت هاي ۱۰ و ٥/٦ ، ۳/۲ ، ۱/۸ ، ۱/۰ میلي گرم بر لیتر) ، قرار گیرند.

غلظت ها باید به گونه اي انتخاب شوند به طوریکه حداقل یك مهار رشد ، زیر و یك مهار رشد ، بالاي پارامتر E_rC_x مورد نظر ، به دست آید . روي هم رفته جهت به دست آوردن اطلاعات براي تجزیه رگرسیون ، باید حداقل دو سطح مهار رشد ، بین ده و نود درصد وجود داشته باشد . یك محدوده آزمون با تنها یك غلظت ، مي

تواند براي نشان دادن عدم حضور سميت به كار رود . براي يك غلظت ، تعداد تكرار ها بايد شش عدد باشد .

يادآوري - بهترين راه براي يافتن گستره غلظتي مناسب ، انجام دادن آزمون اوليه گستره يابي است ، كه چندين فاصله در غلظت آزمون را پوشش دهد (تكرار غلظت هاي آزمون در آزمون مقدماتي ضروري نيست) .

٧-٤ تهيه آزمايه و محلول هاي ذخيره

در صورتي كه آزمايه ، مايع (مثل : پسآب) باشد ، بسته به طبيعت نمونه و توصيه آزمون ، بايد پيش تصفيه (براي مثال : صاف كردن ، خنثي سازي) انجام شود . طبق بند ٧-١ ، محلول هاي ذخيره مغذي (طبق بند ٥-٣) را به نمونه ، اضافه نماييد . براي آزمايه هاي غير مايع ، تهيه محلول ذخيره ، عمدتا" ضروري است . روش تهيه محلول هاي ذخيره ، بايد به دقت بر طبق خصوصيات نمونه ، انتخاب شود . معمولا" محلول هاي ذخيره ، با حل شدن آزمايه در محيط رشد ، تهيه مي شوند . زماني كه آزمايه به آساني در محيط آزمون حل نشود ، اصلاحات ضروري است (طبق بند ٢-١ و ٢-٢) .

به طور معمول ، آزمون بايد بدون تنظيم pH انجام گيرد . هر چند كه بعضي از موادممكن است در شرايط اسيدي يا قلياييِ شديد ، اثرات سمي داشته باشند . به منظور بررسي سميت يك ماده به واسطه عاملي غير از pH ، pH نمونه مايع يا محلول ذخيره (پيش از تهيه سري رقت) را ، با استفاده از هيدرو كلريك اسيد با غلظت يك مولار يا محلول سديم هيدروكسيد با غلظت يك مولار، تنظيم نماييد (به بند ٢-١ مراجعه نماييد) .

٧-٥ تهيه بهر هاي آزمون و شاهد

بهرهاي آزمون و شاهد را با مخلوط كردن حجم هاي مناسب آزمايه يا محيط رشد ، محلول هاي ذخيره آزمايه

(طبق بند ۷-۱) و مایه تلقیح (طبق بند ۷-۲) در ظروف آزمون ، تهیه نمایید .حجم کل در تمام ظروف باید برابر باشد . در تمام مدت آزمون ، بدون آنکه pH به بیش از ۱/۵ واحد افزایش یابد (به بند ۸ مراجعه نمایید) ، باید تراکم سلولي اولیه ، کم تر از رشد تصاعدي مجاز باشد . در این صورت ، تراکم سلولي اولیه بیشتر از 10^4 سلول بر میلي لیتر ، نمي باشد . حداقل سه تکرار براي هر غلظت آزمایه تهیه نمایید . به شش ظرف دیگر تنها محیط کشت و مایه تلقیح بدون آزمایه ، اضافه نمایید . این ظروف را بعنوان شاهد ، نگهداري نمایید . در شرایط خاص ، یك سري تك غلظتي از آزمایه بدون جلبك ، تهیه نمایید و بعنوان سابقه جهت تعیین تراکم سلولي ، نگهداري کنید . در صورت افزایش تعداد غلظت ها و کاهش فاصله گذاري غلظتي ، ممکن است تعداد تکرارها در غلظت بر اساس بررسي هاي آماري (به پیوست ب ، منبع ٤ مراجعه نمایید) ، کاهش یابند .

pH یك نمونه از هر بهر آزمون و هر شاهد را اندازه گیري کنید .

۷-٦ گرمخانه گذاري

به منظور جلوگیري از آلودگي توسط هوا و کاهش تبخیر آب ، در ظروف آزمون باید بسته باشد ولي نه کاملا" کیپ ، زیرا باید دي اکسید کربن کافي ، وارد ظروف آزمون شود (یك سوراخ کوچك کافي است) . ظروف آزمون در بسته را در دماي ۲±۲۳ درجه سلسیوس ، تحت نور سفید ممتد ، گرمخانه گذاري نمایید . شدت نور در سطح متوسط محیط آزمون باید در حدود ±۱۰ درصد همگن و در محدوده ۱۲۰ تا ٦۰ میکرومول بر مجذور متر در ثانیه باشد ، که با استفاده از یك گیرنده مناسب در

گستره طول موج موثر در فوتوسنتز از ٤٠٠ تا ٧٠٠ نانومتر ، اندازه گيري شده است .

يادآوري -شدت نور مشخص شده در بالا مي تواند با استفاده از چهار تا شش لامپ فلورسنت از نوع سفيد (معمولي) [يعني ، يك رنگ ارزيابي شده از دو رنگ استاندارد (درجه حرارت رنگ ٤٣٠٠ كلوين)] ، به **دست آيد . فاصله اپتيمم ، در حدود ٠/٣٥ متر از محيط كشت جلبكي ، مي باشد .**

براي وسايل اندازه گيري كاليبره شده بر حسب لوكس ، محدوده معادل ٦٠٠٠ تا ١٠٠٠٠ لوكس براي آزمون ، قابل قبول است . براي آزمون محلول هاي آزمون رنگي ، اصلاحات ويژه (طبق بند ٢-٢) ، بايد انجام شوند .

براي تامين تبادلات گاز دي اكسيد كربن لازم به جلبك هاي در حال رشد و كاهش تغييرات pH در محلول هاي آزمون ، به وسيله تكان دادن ، به هم زدن يا هوا دادن ، سلول هاي جلبكي را به صورت معلق نگهداريد .

٧-٧ اندازه گيري ها

تراكم سلولي را در هر ظرف آزمون (و ظرف شاهد) ، به مدت حداقل هر ٢٤ ساعت يكبار ، اندازه گيري نماييد . اين اندازه گيري ها در حجم هاي كوچك (براي مثال : ٥ ميلي ليتر) برداشته شده از محلول آزمون با پي پت انجام گرفته و نمونه برداشته شده ، نبايد به ظروف اوليه برگردانده شود . آزمون بايد براي يك دوره زماني ٢± ٧٢ ساعته ادامه يابد . در پايان آزمون ، pH نمونه هاي هر بهر آزمون (طبق بند ٧-٥) و شاهد ها (طبق بند ٧-٥) را اندازه گيري نماييد . ظهور سلول ها و هويت ارگانيسم مورد آزمون ، بايد توسط ميكروسكوپ مشخص شود .

٨ محدوده مورد قبول

در صورت عدم وجود شرايط شرح داده شده در زير ، آزمون غير معتبر است .

الف – ميانگين سرعت رشد شاهد ، حداقل d^{-1}[1] ۱/٤ باشد . اين سرعت رشد متناسب با افزايش تراكم سلولي با ضريبي از ٦٧ ، در مدت زمان ۷۲ ساعت مي باشد .

ب- تغيير ضريب سرعت رشد شاهد ، نبايد بيشتر از ٥ درصد باشد .

ج- pH شاهد در طي آزمون ، نبايد بيشتر از ۱/٥ واحد نسبت به pH ، افزايش يافته باشد .

يادآوري – تغييرات pH در طي آزمون ، مي تواند تاثير قابل ملاحظه اي بر نتايج ، داشته باشد و بنابراين حد مجاز تغييرات pH ، ۱/٥ واحد تعيين مي شود . به هر حال تغييرات pH بايد با تكان دادن مداوم محلول ها در طي آزمون ، به حداقل مقدار ممكن برسد .

در صورت لزوم ، اگر اين معيارها مشاهده نشد ، از روش هاي آزمايشگاهي و مايه تلقيح منبع ديگري ، استفاده نماييد .

۹ روش محاسبه نتايج

۹-۱ ترسيم منحني هاي رشد

اندازه گيري هاي تراكم سلولي يا پارامترهاي ديگري كه با تراكم سلولي در ارتباط هستند ، در محيط آزمون ، متناسب با غلظت آزمايه و زمان اندازه گيري ، جدول بندي نماييد . يك منحني رشد براي هر غلظت و شاهد ، به صورت نموداري از لگاريتم ميانگين تراكم سلولي بر حسب زمان ، رسم كنيد .

يك منحني رشد خطي ، رشد تصاعدي را نشان مي دهد در حاليكه يك شيب كم ، نشان دهنده ورود محيط كشت ها به فاز سكون[1] مي باشد . در صورتيكه كشت هاي شاهد ، در حدود پايان دوره در معرض گذاري ، كاهش سرعت رشد را نشان دهند ، ممكن است كشت هاي حاوي تركيبات مهار

1- Inverse day
1- Stationary phase

رشد به سمت کشت هاي شاهد متمايل شوند . در اين صورت اثر کاهش مهار رشد به صورت کاذب مي باشد ومحاسبات سرعت رشد و مهار رشد ، بر اساس اندازه گيري نهايي در دوره رشد تصاعدي در محيط هاي شاهد ، انجام مي شود .

۹-۲ محاسبه درصد مهار

ميانگين سرعت هاي رشد ويژه (μ) را براي هر کشت آزمون ، با استفاده از فرمول ۱ به شرح زير محاسبه نماييد :

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$ فرمول (۱)

که در آن :

t_0 = زمان شروع آزمون ،

t_L = زمان پايان آزمون [يا زمان آخرين اندازه گيري در دوره رشد تصاعدي در کشت هاي شاهد (طبق بند ۹-۱)] ،

x_0= تراکم سلولي اوليه اسمي .

x_L= تراکم سلولي اندازه گيري شده در زمان t_L .

روش ديگر محاسبه سرعت رشد با استفاده از شيب خط رگرسيون در منحني لگاريتم تراکم سلولي بر حسب زمان ، مي باشد .

مقادير ميانگين (μ) را براي هر غلظت آزمون و شاهد محاسبه نماييد . از اين مقادير ، درصد مهار براي هر غلظت آزمون را ، با استفاده از فرمول ۲ به شرح زير محاسبه کنيد :

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$ فرمول (۲)

که در آن :

$I_{\mu i}$ = درصد مهار (سرعت رشد) براي غلظت آزمون i .

μ_i = ميانگين سرعت رشد براي غلظت آزمون i .

μ_c = ميانگين سرعت رشد براي شاهد .

۳-۹ تعيين E_rC_x (براي مثال : E_rC_{10} و E_rC_{50})

براي هر ظرف به تنهايي ، مهار معمول ($I_{\mu i}$) را نسبت به غلظت آزمون با مقياس لگاريتمي ، جدول بندي نموده و نمودار مربوطه را رسم نماييد . در صورتيكه پراكندگي نقاط زياد باشد ، نمودار ميانگين تكرارهاي آزمون را با انحراف استاندارد هاي مربوطه ، رسم نماييد . به منظور تعيين مقدار E_rC_x ، نقاط آزمايش شده را با يك مدل غير خطي مناسب به وسيله تجزيه رگرسيون (طبق پيوست ب ، منابع ۲و۳) تطبيق دهيد .در صورتيكه اطلاعات جهت تجزيه آماري خيلي كم ويا نامشخص باشند ، يا مهار به دنبال يك قاعده منظمي در رابطه اثر غلظت (مثل تحريك) ظاهر نشود ، در نتيجه ممكن است يك روش گرافيكي (هندسي) به كار رود . در اين حالت ، به وسيله چشم ، خطي منطبق بر منحني در رابطه اثر غلظت ترسيم نماييد و مقدار E_rC_x را از اين نمودار بخوانيد . در صورتيكه غلظت هاي مياني ماده مورد آزمون ، تحريك شديد مشاهده شود ، استفاده از مدل هورمسيس[1] (طبق پيوست ب ، منبع ۱) توصيه مي شود .

۱۰ بيان نتايج

مقادير EC_{10} و EC_{50} را بر اساس سرعت رشد ، به صورت E_rC_{10} و E_rC_{50} ، نشان دهيد . هم چنين طول زمان

1- Hormesis model

استفاده شده براي تعيين مثلا" E_rC_{50} (صفر تا ۷۲ ساعت) را به روشني ، بيان نماييد . مقادير E_rC_{10} و E_rC_{50} را ، معمولا" بر حسب ميلي گرم برليتر و يا ميلي ليتر بر ليتر و فواصل اطمينان مربوطه ، ذكر كنيد .

در شرايطي كه آزمون پسآب به وسيله تهيه سري رقت انجام شود ، به طوريكه محيط آزمون با بالاترين غلظت ، كمتر از پنج درصد مهار را نشان دهد ، اصطلاحا" كمترين رقت بي اثر[۲] (LID)، ناميده مي شود . اين رقت رابطه معكوسي با جزء حجمي پسآب در محيط آزمون دارد [براي مثال : در صورتيكه مقدار پسآب ، يك قسمت از چهار قسمت باشد (جزء حجمي ۲۵ درصد باشد) ، ضريب رقت چهار است D=٤] ، (به پيوست الف ، بند ۲-۱ مراجعه نماييد) .

2 - Lowest Ineffective Dilution

۱۱ تفسیر نتایج

مقادیر EC_{10} و EC_{50} ، داده هاي سم شناسي هستند ، كه از انجام آزمايش هاي آزمايشگاهي تحت شرايط استاندارد مشخص ، به دست آمده اند . آن ها از خطر بالقوه خبر مي دهند ، ولي به طور مستقيم براي پيش بيني اثرات در محيط طبيعي ، نمي توانند به كار روند . در زمان تفسير مقادير EC_{10} و EC_{50} ، به شكل منحني هاي رشد ، توجه داشته باشيد . شكل هاي خاصي از اين منحني ها (براي مثال : شروع تأخيري رشد ، رشد اوليه خوب اما غير مستمر) ، ممكن است به نشان دادن نحوه عمل ماده سمي مطرح شده ، كمك نمايد .

۱۲ دقت روش

نتايج آزمون بين آزمايشگاهي ، بر اساس آزمون شرح داده شده در اين استاندارد ملي ايران ، در جدول ۲ براي پتاسيم دي كرومات $(K_2Cr_2O_7)$ و ۳، ۵ - دي كلرو فنل نوشته شده است.

جدول ۲ - نتايج آزمون بين آزمايشگاهي براي E_rC_{50}

ارگانيسم هاي مورد آزمون و ماده آزمون	تعداد آزمايشگاه ها	نتايج پرت	مقدار ميانگين (ميلي گرم بر ليتر)	انحراف استاندارد (ميلي گرم بر ليتر)	ضريب تغييرات (درصد)
Desmodesmus subspicatus					
پتاسيم دي كرومات	20	4	0/84	0/12	14
۳، ۵ - دي كلرو فنل	۱۸	۲	۴۲/۶	۳۸/۲	۳۷
Pseudokirchneriella subcapitata					
پتاسيم دي كرومات	۹*	۴	۱/۱۹	۰/۲۷	۲۳
۳، ۵ - دي كلرو فنل	۹*	۴	۳/۳۸	۱/۳۰	۳۸

* : تعداد زياد نتايج پرت در آزمايش با **Pseudokirchneriella subcapitata** ، به دليل استفاده از محيط هاي رشد مختلف (با مقدار متفاوت pH) ، مي باشد . اين استاندارد شامل نتايج حاصل از آزمون ها توسط محيط هايي با انحراف pH از محيط رشد ويژه نمي شود .

براي بررسي صحت سيستم آزمون ، استفاده از حداقل يك ماده مرجع (براي مثال : زمان استفاده از يك سويه يا بعد از تغيير شرايط آزمون) ، توصيه مي شود . بايد نتايج با موارد آمده در جدول ۲ ، مقايسه شوند .

يادآوري – در آزمون بين آزمايشگاهي ، ميانگين سرعت رشد براي Desmodesmus subspicatus ، d^{-1} ۱/۷٤ [ضريب تغييرات[1] (CV) ۲۷ درصد است] و براي Pseudokirchneriella subcapitata ، d^{-1} ۱/۹۱ [ضريب تغييرات (CV) ۲۳ درصد است] مي باشد . اين سرعت هاي رشد بر افزايش تراكم سلولي تا كمتر از ۱۵۰ سلول بر ليتر ، دلالت مي كنند .

۱۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون بايد در برگيرنده آگاهي هاي زير باشد :

۱-۱۳ شماره استاندارد ملي ايران كه آزمون بر اساس آن انجام گرفته است .

۲-۱۳ تمام اطلاعات لازم براي شناسايي آزمايه .

۳-۱۳ ارگانيسم مورد آزمون : گونه ، منشا ، تعداد سويه مرجع ، روش كشت .

٤-۱۳ جزئيات آزمون :

۱-٤-۱۳ تاريخ آغاز و مدت زمان آزمون .

۲-٤-۱۳ روش تهيه نمونه و بهر آزمون .

۳-٤-۱۳ غلظت هاي آزمايش شده .

٤-٤-۱۳ تركيب محيط كشت .

٥-٤-۱۳ وسايل كشت و روش گرمخانه گذاري .

٦-٤-۱۳ شدت نور و كيفيت آن .

۷-٤-۱۳ دما .

۸-٤-۱۳ pH محلول هاي آزمون در آغاز و پايان آزمون .

۹-٤-۱۳ روش اندازه گيري تراكم سلولي .

1- Coefficient of Variation

۱۳-۵ نتایج آزمون شامل :

۱۳-۵-۱ تراکم سلولي در هر ظرف در هر نقطه اندازه گيري .

۱۳-۵-۲ ميانگين تراکم سلولي براي هر غلظت آزمون (و شاهد) در هر نقطه اندازه گيري .

۱۳-۵-۳ منحني هاي رشد (لگاريتم تراکم سلولي ، بر حسب زمان) .

۱۳-۵-٤ ارتباط بين غلظت و تأثير (درصد مهار مقادير در برابر غلظت) به صورت جدول يا نمايش نموداري مثل درصد مهار ، بر روي طول ، مقياس بندي شده و غلظت ، بر روي عرض ، با مقياس لگاريتمي .

۱۳-۵-۵ مقادير E_rC_x از جمله E_rC_{10} و E_rC_{50} ، که شامل روش تعيين مي باشد .

۱۳-۵-٦ ساير اثرات مشاهده شده از جمله ، بي رنگ کردن سلول هاي جلبک .

۱۳-۵-۷ جزئيات ديگري که در اين استاندارد به آن اشاره نشده است ، وليکن ممکن است بر نتايج حاصله تأثيرگذار باشد .

۱۳-۵-۸ نام و نام خانوادگي و امضاء آزمايش کننده .

پيوست الف

جداسازي سريع مهار کننده رشد جلبک آب شيرين (اطلاعاتي)

الف. ۱ کليات

روشي که در اين استاندارد ملي شرح داده شده است ، مي تواند براي آزمون فاضلاب ها ، پسآب ها و نمونه هاي مايع محيطي ديگر ، به کار رود . تغييرات آمده در زير اساسا" به الزامات ، براي انجام آزمون جداسازي در انواع مختلف آزمون مثل : ظروف ميکروپليت ، مي پردازد .

الف. ۲ نموه برداري و ذخيره سازي

تا جايي كه ممكن است ، نمونه ها بايد بلافاصله بعد از جمع آوري يا احيانا" بعد از يخ زدن و ذوب شدن ، صاف شدن يا سانتريفيوژ شدن ، مورد آزمون ، قرار گيرند . قبل از طرح آزمون پسآب ، بايد به الزامات در بند ۲-۲ و ۲-۱ ، توجه نمود .

الف. ۳ ظروف كشت

از ارلن ها ، شيشه هاي كوچك[1] يا ميكروپليت ها با حجم هاي محيط كشت مناسب ، استفاده نماييد . مواد و شكل هندسي محفظه هاي آزمون بايد طوري انتخاب شوند كه از موارد زير ، جلوگيري به عمل آيد .

الف. ۳-۱ آزاد سازي بالقوه مواد سمي ،

الف. ۳-۲ جذب عناصر از محيط آزمون ،

الف. ۳-۳ تلفات تبخيري اجزاء مهم تشكيل دهنده پسآب ،

الف. ۳-٤ مقدار ناهمگن جزئي ، در تكرارها و روش كار .

الف. ٤ انتخاب غلظت هاي آزمون

سري هاي رقت نمونه آب را طبق بند الف . ٥ تهيه نماييد . سري هاي رقت ، بايد از يك تصاعد هندسي كه شامل گستره مورد نظر واكنش مي باشند ، پيروي نماييد . در صورتيكه از ميكروپليت يا سيستم هاي خودكار ، استفاده شود ، جهت اطمينان از مطابقت با اين الزام ، توصيه مي شود كه تعداد رقت هاي آزمون ، افزايش يابد . ممكن است آزمون تشخيص گستره براي تعيين سري هاي رقت انجام شود . حداقل از سه تكرار در هر روش (از جمله يك شاهد) و پنج غلظت ، استفاده نماييد . مگر اينكه توجيه فني مناسبي براي طرح آزمون متفاوتي

1- Vial

وجود داشته باشد . با افزایش تعداد غلظت ها و کاهش فاصله غلظتي ، تعداد تکرارها در غلظت بر طبق بررسي هاي آماري ، ميتوانند کاهش يابند .

الف. ٥ تهيه بهرهاي آزمون

سري هاي بهرهاي آزمون را به روشي تهيه نماييد که مطمئن باشيد ، تمام بهرها ، غلظت يکساني از ماده مغذي و مايه جلبك تلقيحي را دريافت مي کنند . اين امر مي تواند با ريختن نمونه آب مورد آزمون در محلول هاي ذخيره ماده مغذي (طبق بند ٥-٣) ، همان گونه که در بند ٧-١ شرح داده شده است و مخلوط کردن نمونه آب با حجم هاي مناسبي از محيط رشد و کشت تلقيحي ، به دست آيد .

الف. ٦ کنترل زمينه

براي منظور کردن اصلاحات زمينه و يا انتخاب يك روش اندازه گيري مناسب ، جهت تعيين تداخل هاي ممکن براي اندازه گيري تراکم جلبك (طبق بند الف . ٩) ، رقت هايي از پسآب بدون جلبك ، تهيه نماييد .

تا پايان آزمون ، هيچ تداخل رشد جلبك در کنترل زمينه نبايد باشد .

الف. ٧ ماده مرجع

براي اطمينان کامل و بررسي حساسيت جلبك ، در فواصل منظمي با ماده مرجع (طبق بند ١٢) آزمايش نماييد . در صورتيکه آزمون مهار رشد تنها با دو اندازه گيري (در شروع و پايان آزمون) و يا در آزمون تراکم سلولي اسمي ، تنها يك اندازه گيري در پايان آزمايش ، صورت گيرد . آزمون مرجع ممکن است با اين روش ساده شده ، انجام شود .

الف. ۸ ارگانیسم های مورد آزمون

از جلبک های ، **Desmodesmus subspicatus** و یا **Pseudokirchneriella subcapitata** (طبق بند ۵-۱) استفاده نمایید .

الف. ۹ اندازه گیری تراکم سلول جلبک

روش مرجع ، شمارش میکروسکوپی یا الکترونی می باشد . روش غیر مستقیم دیگر شامل ، کدورت سنجی[1] ، نور سنجی[2] یا فلوریمتری[3] می باشد . این روش ها ، زمانی حساسیت کافی خواهند داشت که رابطه مناسبی با تراکم سلولی به دست آمده باشد . در صورتیکه آزمایه کدر باشد ، روش فلوریمتری توصیه می شود .

الف. ۱۰ مدت زمان آزمون

مدت زمان آزمون ، حداقل ٤٨ ساعت است ولی می تواند تا ۷۲ ساعت نیز ادامه یابد .

الف. ۱۱ فراوانی اندازه گیری

به طور کلی ، اندازه گیری تراکم سلول جلبک باید به طور روزانه ، انجام شود .

در نمونه های پسآب ، تراکم سلول ممکن است تنها در شروع و پایان آزمون اندازه گیری شوند . روش دیگر ، استفاده از تراکم سلول اسمی بعنوان تراکم سلول اولیه است . در این حالت اندازه گیری ، تنها در پایان آزمون توصیه می شود .

الف. ۱۲ اندازه گیری pH

در یک ظرف شاهد ، ممکن است pH در پایان آزمون ، اندازه گیری شود . در یک آزمون میکروپلیت ، ممکن

1- Turbidimetry
2 - Photometry
3 - Fluorimetry

است براي اندازه گيري pH لازم باشد تا تكرار هاي شاهد مورد استفاده قرار گيرند .

الف. ۱۳ محاسبه درصد مهار

از آنجايكه درصد مهار به سطوح زي توده[1] ، شرايط رشد و مدت زمان آزمون بستگي دارد ، براي اين آزمون ، جداسازي مهار سرعت رشد (طبق بند ۹-۲) ، نقطه پايان محسوب مي شود .

الف. ۱٤ تعيين مقادير E_rC_x و LID

مقادير E_rC_x را مطابق با بند ۹-۳ ، تعيين نماييد . همچنين E_rC_x را مي توان از طريق رسم خط مستقيم در منحني نيز تعيين نمود . مقادير E_rC_x ممكن است براي مثال برحسب ميلي ليتر بر ليتر يا درصد پسآب در محيط آزمون بيان شوند . نتايج همچنين ممكن است به صورت LID (طبق بند الف . ۲-۱) كمترين رقت با اثري كمتر از پنج درصد است ، بيان شوند .

الف. ۱۵ محدوده مورد قبول

محدوده مورد قبول آمده در بند ۸ ، در اين پيوست نيز كاربرد دارد . معيار اضافي آمده در زير (به بند الف. ٦ مراجعه نماييد) ، بايد رعايت شود .

نبايد هيچ تداخل رشد جلبك در كنترل زمينه تا پايان آزمون ، وجود داشته باشد .

الف. ۱٦ گزارش آزمون

علاوه بر الزامات آمده در بند ۱۳ ، گزارش آزمون بايد شامل موارد زير نيز باشد :

الف. ۱٦-۱ ماهيت نمونه مورد آزمون (براي مثال : پسآب ، فاضلاب) ،

1- Biomass

الف. ١٦-٢ منشاء نمونه مورد آزمون ،

الف. ١٦-٣ نشانه گذاري ،

الف. ١٦-٤ روش نمونه برداري ،

الف. ١٦-٥ تاريخ نمونه برداري و جمع آوري نمونه ،

الف. ١٦-٦ نحوه نگهداري نمونه ،

الف. ١٦-٧ مدت زمان در معرض گذاري ،

الف. ١٦-٨ ظهور اثر بازدارنده ،

الف. ١٦-٩ پيش تصفيه (براي مثال : ته نشين كردن ، صاف كردن ، سانتريفيوژ ، تنظيم pH)

الف. ١٦-10 نقطه پايان آزمون ،

الف. ١٦-١١ روش محاسبه نتايج .

پيوست ب

(اطلاعاتي)

1- BRAIN, P. and COUSENS, R. An equation to describe dose-response where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, 29,1989, pp.93–96

2- HANSTVEIT, A. and OLDERSMA, H. Evaluation of the results of the second ISO interladoratory study with an algal toxicity test . ISO/TC 147/SC 5/WG 5, N.43. Prerared for the International Standards Organization by Nederlands Nrmalisation Instituut, Delft, Netherlands, 1981

3- HANSTVEIT, A. O. Evaluation of the results of the third ISO-interlaboratory study with an algal toxicity test . ISO/TC 147/SC 5/WG 5, 64. Prerared for the International Standards Organization by Nederlands Nrmalisation Instituut, Delft, Netherlands, 1982

4- ISO/TS 20281, Water qualiy- Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

www.abpsoil.com

ابنیه پایدار سبز

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

7617

Water quality -Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae

1st. Revision