

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6226:2012**

**ISO 8192:2007**

Xuất bản lần 2

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – PHÉP THỬ SỰ ỨC CHẾ KHẢ  
NĂNG TIÊU THỤ OXY CỦA BÙN HOẠT HÓA DÙNG ĐỂ OXY  
HÓA CÁC HỢP CHẤT CACBON VÀ AMONI**

*Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for  
carbonaceous and ammonium oxidation*

HÀ NỘI – 2012

**Lời nói đầu**

TCVN 6226:2012 thay thế TCVN 6226:1996

TCVN 6226:2012 hoàn toàn tương đương với ISO 8192:2007

TCVN 6226:2012 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố

## Lời giới thiệu

Phương pháp này đưa ra thông tin để đánh giá độc tính tiềm ẩn của các chất, hỗn hợp và nước thải với bùn hoạt hóa có thể giúp ích trong việc ước tính ảnh hưởng của chất thải lên quần thể vi khuẩn hỗn hợp trong môi trường nước, đặc biệt trong hệ thống xử lý sinh học ưa khí. Sự nhạy cảm về sự tiêu thụ oxy của một số quần thể nhỏ trong cộng thể vi khuẩn với sự ức chế gây bởi một số loại hóa chất, một số loại nước thải là không giống nhau và những hiệu ứng chọn lọc có thể ảnh hưởng tới kết quả của phép thử.

Có hai nhóm vi sinh vật chủ yếu tiêu thụ oxy tổng trong bùn hoạt hóa: sinh vật dị dưỡng chủ yếu làm phá vỡ chuỗi cacbon cơ bản (sự oxy hóa cacbon) và sinh vật nitrat hóa tự dưỡng làm oxy hóa amoni thành nitrat (sự nitrat hóa).

Tiêu chuẩn này có thể được sử dụng để đánh giá độc tính của các chất tới sự tiêu thụ oxy tổng (tức là kết hợp sự oxy hóa cacbon và sự nitrat hóa) hoặc, bằng thêm một cách cẩn trọng một chất ức chế quá trình nitrat hóa đặc trưng, cũng để đánh giá độc tính của các chất tới thành phần chứa cacbon và thành phần nitrat hóa riêng rẽ.

Để xác định sự ức chế nitrat hóa theo phương pháp này, cần bùn hoạt hóa có quá trình nitrat hóa vừa đủ. Chỉ thị của sự nitrat hóa có thể được điều tra thêm bằng áp dụng ISO 9509<sup>[4]</sup>.

Người sử dụng phương pháp này phải nhận thức được các vấn đề đặc thù phụ thuộc vào quy định của điều kiện bổ sung bên lề.

Tác dụng ức chế của chất thử có thể được sử dụng cả hai thành phần hoặc có thể được sử dụng chủ yếu trên chỉ một trong hai. Sự nitrat hóa là quá trình thường dễ bị ức chế chọn lọc.

## **Chất lượng nước – Phép thử sự ức chế khả năng tiêu thụ oxy của bùn hoạt hóa dùng để oxy hóa các hợp chất cacbon và amoni**

*Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation*

**CẢNH BÁO** – Người sử dụng tiêu chuẩn này cần phải thành thạo với các thực hành trong phòng thí nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không đề cập tới mọi vấn đề an toàn liên quan đến người sử dụng. Trách nhiệm của người sử dụng là phải xác lập thực hành về an toàn, bảo đảm sức khỏe phù hợp với các qui định của quốc gia.

**QUAN TRỌNG** – Chỉ những nhân viên đã qua đào tạo thích hợp mới được phép tiến hành phép thử theo tiêu chuẩn này.

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đánh giá ảnh hưởng ức chế của một vật liệu thử lên khả năng tiêu thụ oxy của các vi sinh vật trong bùn hoạt hóa.

Phương pháp này nhằm giới thiệu những điều kiện trong các trạm xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học. Phương pháp này cung cấp thông tin về tác dụng ức chế hoặc kích thích của chất thử tới các vi sinh vật của bùn hoạt hóa sau một thời gian tiếp xúc ngắn (thường là 30 min tới 180 min hoặc hơn nữa).

Phương pháp này có thể áp dụng để thử nước, nước thải, hóa chất tinh khiết và các hợp chất hỗn hợp. Liên quan đến hóa chất, phương pháp này ưu tiên cho những chất tan trong điều kiện thử. Cần đặc biệt cẩn thận với các chất ít hòa tan trong nước, chất có khả năng bay hơi cao và những vật liệu tiêu thụ phi sinh vật hoặc tạo ra oxy.

### **2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*



## TCVN 6226:2012

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ sau:

#### 3.1

##### **Bùn hoạt hóa (activated sludge)**

Sinh khối tích tụ (kết tủa) được tạo ra trong xử lý nước thải do sự phát triển của vi khuẩn và các vi sinh vật khác khi có mặt oxy.

[TCVN 8184-1:2009 (ISO 6107-1:2004)<sup>[3]</sup>, định nghĩa 2].

#### 3.2

##### **Nồng độ chất rắn lơ lửng của bùn hoạt hóa (concentration of suspended solids of an activated sludge)**

Lượng chất rắn thu được bằng cách lọc hoặc ly tâm một thể tích bùn hoạt hóa đã biết và sấy khô ở khoảng 105 °C tới khối lượng không đổi.

[TCVN 6917:2001 (ISO 9888:1999)<sup>[6]</sup>, định nghĩa 3.4].

#### 3.3

##### **Tốc độ tiêu thụ oxy (oxygen consumption rate)**

Lượng oxy bị tiêu thụ bởi các vi sinh vật trong bùn hoạt hóa trên một đơn vị thể tích bùn, tính bằng đơn vị thời gian.

CHÚ THÍCH: Đại lượng này được tính bằng miligam trên lít trên giờ [mg/(L.h)].

#### 3.4

##### **Tốc độ tiêu thụ oxy đặc trưng (specific oxygen consumption rate)**

Lượng oxy bị tiêu thụ bởi các vi sinh vật trong bùn hoạt hóa trên đơn vị khối lượng bùn khô (chất rắn lơ lửng), tính bằng đơn vị thời gian.

CHÚ THÍCH: Đại lượng này được tính bằng miligam trên gam trên giờ [mg/(g.h)].

#### 3.5

##### **Sự ức chế khả năng tiêu thụ oxy (inhibition of oxygen consumption)**

Sự giảm tốc độ tiêu thụ oxy của bùn hoạt hóa cùng với (a) chất phân hủy(s) khi có mặt chất thử, được so sánh với hỗn hợp tương tự mà không có chất thử.

CHÚ THÍCH 1: Đại lượng này tính bằng phần trăm.

CHÚ THÍCH 2: Trong trường hợp không có chất nền, một số hóa chất (ví dụ tách liên kết của quá trình phosphoryl hóa) có thể làm tăng sự tiêu thụ oxy.

#### 3.6

##### **Khoảng độc (toxic range)**

Khoảng nồng độ của chất thử gây ra sự ức chế từ 0 % đến 100 %.

## 3.6

**Khoảng độc (toxic range)**

Khoảng nồng độ của chất thử gây ra sự ức chế từ 0 % đến 100 %.

## 3.7

**EC<sub>50</sub>**

Nồng độ hiệu dụng của chất thử gây ra sự ức chế tiêu thụ oxy được tính hoặc nội suy là bằng 50 % khả năng tiêu thụ oxy so với mẫu trắng kiểm tra.

## 3.8

**Sự nitrat hóa (nitrification)**

Sự oxy hóa các hợp chất amoni bằng các vi khuẩn.

CHÚ THÍCH: Thông thường, sản phẩm trung gian của sự oxy hóa là nitrit và sản phẩm cuối cùng là nitrat.

[TCVN 8184-1:2009 (ISO 6107-1:2004)<sup>[3]</sup>, định nghĩa 49].

## 4 Nguyên tắc

Khi có mặt các chất dễ phân hủy sinh học, bùn hoạt hóa tiêu thụ oxy ở tốc độ cao hơn khi không có chất dễ phân hủy sinh học, tùy thuộc vào nồng độ vi sinh vật và nhiều yếu tố khác. Việc thêm một chất thử ở nồng độ gây độc dẫn đến làm giảm tốc độ tiêu thụ oxy. Sử dụng điện cực oxy để đo tốc độ này. Phần trăm ức chế sự tiêu thụ oxy được đánh giá bằng cách so sánh tốc độ này với tốc độ của hỗn hợp đối chứng không chứa chất thử.

Kiểm tra độ nhạy của bùn hoạt hóa bằng một chất đối chứng phù hợp. Ức chế sự tiêu thụ oxy gây ra bởi tất cả các vi sinh vật trong bùn, các vi sinh vật dị dưỡng và sự oxy hóa của muối amoni do các vi sinh vật tạo đạm có thể được thể hiện riêng rẽ bằng các phép đo tốc độ tiêu thụ khi có hoặc không có *N*-allylthiourea (ATU), chất ức chế đặc trưng cho sự oxy hóa của amoni thành nitrit bằng các vi khuẩn nitrat hóa bước đầu. Sự khác nhau giữa hai giá trị là do sự nitrat hóa và do vi sinh vật dị dưỡng khi có allylthiourea. Có thể phát hiện bất kỳ một sự tiêu thụ oxy do quá trình phi sinh vật bằng cách xác định tốc độ của hỗn hợp của chất thử, môi trường tổng hợp và nước, nhưng không có bùn hoạt hóa.

Trong các trường hợp nhất định (hiếm gặp), có thể đo được sự tiêu thụ oxy phi sinh vật do một chất thử có tính khử mạnh gây ra. Trong những trường hợp như vậy, cần thử phi sinh vật để phân biệt giữa tiêu thụ oxy do chất thử và tiêu thụ oxy do hô hấp của vi khuẩn. Phép đối chứng về sự tiêu thụ oxy phi sinh vật có thể được chuẩn bị bằng cách không cho vi sinh vật nuôi cấy vào các hỗn hợp thử, hoặc bằng gây độc vi sinh vật nuôi cấy dùng dung dịch thủy ngân (II) clorua.

## 5 Thuốc thử, môi trường và vi sinh vật nuôi cấy

Chỉ sử dụng các thuốc thử đã chứng nhận cấp phân tích.

## TCVN 6226:2012

**5.1 Nước**, đạt loại 1 như qui định trong TCVN 4851 (ISO 3696), nước cất đã hòa tan hoặc nước đã loại ion có chứa cacbon hữu cơ hòa tan (DOC) nhỏ hơn 1 mg/L.

### 5.2 Chất ức chế sự nitrat hóa đặc trưng, *N*-allylthioure (ATU)

Hòa tan 2,50 g *N*-allylthioure (ATU) vào trong 1 000 mL nước (5.1). Thêm 2,32 mL dung dịch gốc này vào 500 mL mẫu cho nồng độ cuối cùng là 11,6 mg/L ( $10^{-4}$  mol/L).

### 5.3 Dung dịch thủy ngân (II) clorua

Nếu cần (xem Điều 4), chuẩn bị một dung dịch có 0,10 g thủy ngân (II) clorua ( $HgCl_2$ ) pha trong 10 mL nước (5.1).

**CẢNH BÁO** – Áp dụng các biện pháp để phòng an toàn nghiêm ngặt và biện pháp thải bỏ chất thải đặc biệt khi dùng các muối của thủy ngân trong phòng thí nghiệm. Không khuyến khích việc thử phi sinh học dùng thủy ngân (II) clorua.

### 5.4 Chất chống bọt, không có silicon.

### 5.5 Chất đối chứng, dung dịch gốc.

Chuẩn bị một dung dịch chứa 1,00 g 3,5-diclophenol (3,5-DCP) pha trong 1 000 mL nước (5.1). Sử dụng nước ấm và/hoặc máy siêu âm để gia tăng sự hòa tan và sau khi dung dịch đã nguội tới nhiệt độ phòng, điều chỉnh thể tích dung dịch đạt tới 1000 mL.

Có thể sử dụng *N*-metylanilin thay thế như chất đối chứng, đặc biệt là đối với sự ức chế sự nitrat hóa. Khi sử dụng chất này, chuẩn bị một dung dịch chứa 1,00 g *N*-metylanilin (MNA) pha trong 1000 mL nước (5.1).

### 5.6 Môi trường thử, nước cống tổng hợp 1 (gấp 100 lần nước cống môi trường OECD).

Pepton	16 g
Cao thịt	11 g
Ure [ $CO(NH_2)_2$ ]	3 g
Natri clorua (NaCl)	0,7 g
Canxi clorua ngậm hai phân tử nước ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	0,4 g
Magie sunphat ngậm bảy phân tử nước ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,2 g
Kali anhydrit monohydrophosphat ( $K_2HPO_4$ )	2,8 g
Nước (5.1)	1 L

pH của môi trường tổng hợp này phải đạt  $7,5 \pm 0,5$ .

Nếu không sử dụng ngay môi trường tổng hợp đã chuẩn bị, thì bảo quản môi trường tổng hợp này trong tối ở  $0^\circ C$  đến  $4^\circ C$ , không quá 1 tuần.

### 5.7 Chất thử, dung dịch gốc

Chất thử có thể là hóa chất tinh khiết, hỗn hợp hóa chất, sản phẩm hòa học, hoặc nước thải.

Chuẩn bị một dung dịch gốc chất thử trong nước (5.1) ở một nồng độ thích hợp, ví dụ 1 g/L hoặc 10 g/L. Có thể dùng nước thải mà không pha loãng.

Với các chất không tan, có thể chuẩn bị dung dịch huyền phù hoặc dung dịch phân tán, hoặc thêm trực tiếp chất thử vào bình thử. Cần thận để đảm bảo rằng cồng đồng nhất cồng tốt. Đối với xử lý các chất hòa tan, xem ví dụ trong TCVN 6918 (ISO 10634)<sup>[7]</sup>.

### 5.8 Vi sinh vật nuôi cấy

Nói chung, bùn hoạt hóa phải được lấy từ lối ra của bể sục khí (nơi mà nồng độ chất nền là thấp nhất) của một trạm xử lý nước thải, chủ yếu xử lý nước thải sinh hoạt, và đang hoạt động hiệu quả. Tùy theo mục đích của phép thử, có thể sử dụng bất kỳ loại bùn hoạt hóa nào kể cả bùn tạo ra trong phòng thí nghiệm và bùn tạo ra trong nước thải công nghiệp có nồng độ chất rắn lơ lửng phù hợp, ví dụ từ 2 g/L đến 4 g/L. Tuy nhiên, bùn hoạt hóa từ các trạm xử lý khác nhau có thể có đặc tính và độ nhạy khác nhau.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị dụng cụ phòng thí nghiệm thông thường, và các dụng cụ sau (xem Phụ lục A).

**6.1 Bình thử:** nên sử dụng bình nhu cầu oxy sinh hóa (BOD) 250 mL đến 300 mL hoặc bình Erlenmeyer có nắp (xem Hình A.1). Hoặc cũng có thể sử dụng bình thử lớn hơn (xem Hình A.2).

Khi sử dụng bình BOD để đo oxy cần chuẩn bị một bộ chỉnh lưu thích hợp để gắn điện cực oxy với cổ của các bình thử (xem Hình A.1). Để tránh bị chất lỏng tràn ra khi đưa điện cực oxy vào, nên cấm trước một phễu hoặc một ống thủy tinh qua, hoặc sử dụng bình có miệng loe.

**6.2 Thiết bị đo nồng độ oxy:** bao gồm một điện cực oxy thích hợp, một ngăn chứa mẫu và một bộ ghi (xem Hình A.2).

**6.3 Khuấy từ,** được bọc vật liệu trơ.

### 6.4 Thiết bị sục khí

Nếu cần cho khí nén qua màng lọc thích hợp để loại bỏ bụi và dầu, sau đó đi qua một bình chứa nước sạch để làm ẩm không khí. Sục khí bình thử bằng pipet Pasteur, hoặc bằng thiết bị sục khí khác mà không hấp phụ hóa chất.

### 6.5 pH-met

**6.6 Máy li tâm,** loại thông thường, có khả năng 10 000 m/s<sup>2</sup>.

**6.7 Thiết bị dụng cụ dùng cho nuôi cấy bùn hoạt hóa nitrat hóa** (xem Phụ lục B).

## **7 Môi trường thử**

Tiến hành phép thử ở nhiệt độ trong khoảng  $(22 \pm 2)$  °C và trong khí quyển không có bụi và hơi độc.

## **8 Cách tiến hành**

### **8.1 Khái quát**

Toàn bộ quy trình thử được nêu trong Phụ lục C.

Quy trình được áp dụng cho bùn nitrat hóa khác với quy trình áp dụng cho bùn không nitrat hóa. Vì vậy, nên kiểm tra bùn hoạt hóa về hoạt tính nitrat hóa của bùn (xem Phụ lục C).

Chỉ sử dụng bùn nitrat hóa khi cần để xác định ảnh hưởng của chất thử lên sự nitrat hóa. Không yêu cầu sử dụng bùn nitrat hóa nếu chỉ xác định sự hô hấp dị dưỡng.

Để kiểm tra hoạt tính nitrat hóa của bùn, áp dụng phép thử nitrat hóa (8.8) và tính tốc độ của sự nitrat hóa, nếu cần, theo 9.2.

Phép thử sơ bộ này chỉ để như một phép thử công cụ tìm kiếm cho phép thử chính thức sau.

Xem 8.9 về phác thảo phép thử sơ bộ này.

### **8.2 Loại bỏ bọt**

Có thể phát sinh khó khăn nếu xảy ra tạo bọt trong quá trình ủ, đến mức bọt và các chất rắn của bùn bám trên bọt, được đẩy ra khỏi bình sục khí. Đôi khi, sự tạo bọt có thể đơn giản là do có nước thải tổng hợp, nhưng sự tạo bọt có thể dự đoán trước nếu chất thử là, hoặc có chứa, chất hoạt động bề mặt. Sự thoát các chất rắn của bùn từ các hỗn hợp thử sẽ dẫn tới tốc độ hô hấp tổng hợp thấp, nguyên nhân này có thể được diễn giải nhằm với kết quả của sự ức chế. Hơn nữa, việc sục khí dung dịch chất hoạt động bề mặt làm đậm đặc chất hoạt động bề mặt trong lớp bọt, hiện tượng mất bọt khỏi hệ thống thử sẽ làm nồng độ tiếp xúc thấp đi.

Nếu tạo bọt, thêm chất chống bọt (5.4) như tương silicon không có chất hoạt động bề mặt. Nếu gặp khó khăn do có nước thải tổng hợp, thay đổi nồng độ nước thải (5.6) bằng các chất chống bọt (5.4) ở tỉ lệ 50 µl/L. Nếu bọt được sinh ra do chất thử, cần xác định số lượng chất loại bọt (bằng cách sử dụng pipet Pasteur nhỏ một vài giọt) cần thiết để làm giảm bọt với nồng độ chất thử cao nhất, sau đó xử lý tất cả bình sục khí riêng lẻ như nhau (kể cả việc xử lý, ví dụ, bình mẫu trắng kiểm tra và bình đối chứng là những bình không có bọt).

### **8.3 Chuẩn bị vi sinh vật nuôi cấy**

Khi cần, loại bỏ những hạt thô bằng cách để lắng một thời gian ngắn, ví dụ 15 min, và gạn lớp chất rắn mịn phía trên để sử dụng. Cách khác, có thể đồng nhất bùn bằng sử dụng máy trộn trong vài giây. Khi cần, loại bỏ những hạt thô bằng rây thích hợp.

Có thể rửa bùn như sau: đầu tiên li tâm (6.6) bùn khoảng 10 min ở tốc độ khoảng 10 000 m/s<sup>2</sup> và gạn bỏ lớp chất lỏng trên bề mặt. Tái tạo lại bùn trong nước vôi không có clo, tách bùn tái tạo này bằng cách li tâm lại và sau đó lặp lại quá trình rửa và li tâm nếu cần. Xác định khối lượng khô của một thể tích bùn đã biết trước. Cuối cùng tái tạo lại bùn trong nước vôi không có clo để thu được nồng độ bùn hoạt hóa như yêu cầu, khoảng 3 g/L chất rắn.

Sau khi điều chỉnh nồng độ chất rắn lơ lửng, tiếp tục sục khí bùn hoạt hóa và, nếu có thể, sử dụng bùn hoạt hóa trong vòng 24 h sau khi lấy mẫu. Nếu không thể sử dụng trong 24 h sau khi lấy, thì bùn hoạt hóa có thể nuôi dưỡng thêm một ngày bằng môi trường tổng hợp (xem 5.6) ở tốc độ không quá 50 mL trên lít trên ngày, sự thay đổi là không đáng kể trong hoạt tính cuối cùng của bùn và sự nitrat hóa, nếu hình thức ban đầu, không bị mất. Cách khác, sự thay đổi trong hoạt tính có thể giảm tối thiểu bằng cách làm lạnh bùn hoạt hóa ở 4 °C trong 4 ngày mà không cần nuôi dưỡng [13]. Trong tất cả các trường hợp, nguồn gốc, nồng độ của bùn, mọi cách xử lý sơ bộ và duy trì bùn hoạt hóa phải được ghi trong báo cáo thử. Kiến thức đầy đủ về những thay đổi có thể xảy ra đối với bùn trong quá trình bảo quản. Ví thể, mọi quá trình bảo quản và/hoặc xử lý bùn phải như nhau đối với tất cả các mẫu nghiên cứu trong cuộc điều tra nghiên cứu.

**CẢNH BÁO – Bùn tạo ra trong phòng thí nghiệm có thể kém hoạt tính hơn, có ít thành phần chất nền hơn thành phần của bùn từ trạm xử lý nước thải.**

#### 8.4 Hỗn hợp thử

Ủ hỗn hợp thử dưới các điều kiện sục khí cưỡng bức. Bắt đầu ủ (sục khí) cho mỗi đợt chuẩn bị với tiếp xúc ban đầu giữa vi sinh vật nuôi cấy bùn hoạt hóa với các thành phần khác của hỗn hợp, và hoàn thành sau thời gian tiếp xúc qui định khi tốc độ suy giảm của nồng độ oxy hòa tan được đo.

Khả năng của thiết bị được sử dụng để đo tốc độ tiêu thụ oxy quyết định cách thức mà theo đó việc ủ bắt đầu. Ví dụ, nếu thiết bị chỉ gồm một đầu đo đơn, thì phép đo được thực hiện riêng lẻ. Trong trường hợp này, chuẩn bị một vài hỗn hợp yêu cầu cho phép thử, nhưng giữ lại vi sinh vật nuôi cấy, thêm vi sinh vật vào từng bình và bắt đầu ủ lần lượt, trong khoảng thời gian đã định, ví dụ 10 min đến 15 min.

Ngoài ra, hệ thống đo có thể bao gồm nhiều đầu đo rất thuận tiện cho nhiều phép đo đồng thời, trong trường hợp này vi sinh vật nuôi cấy có thể được thêm vào ở cùng thời điểm cho tương ứng với các nhóm bình.

Nồng độ bùn hoạt hóa trong các hỗn hợp thử thường chứa chất rắn lơ lửng 1 500 mg/L. Đo sự tiêu thụ oxy sau khi ủ 30 min. Nếu cần thông tin sau khoảng thời gian dài hơn, thì có thể đo sau khi ủ 180 min. Tùy thuộc vào mục đích của phép thử, thời gian ủ vẫn có thể kéo dài thêm, ví dụ tới 27 h. Đối với phép thử kéo dài 27 h, thêm môi trường tổng hợp (5.6) sau khi ủ 24 h (không có môi trường tổng hợp) và sục khí thêm khoảng 3 h. Sự kéo dài thời gian thử này phải được ghi rõ trong báo cáo thử.

**CHÚ THÍCH:** Thông thường, thời gian ủ khoảng 30 min là đủ. Có thể phải ủ trong thời gian dài hơn, ví dụ, yêu cầu đối với chất ít hòa tan trong nước. Thời gian ủ kéo dài sẽ làm tăng thêm công việc.

## TCVN 6226:2012

Chuẩn bị các bình thử (6.1) hỗn hợp,  $F_T$ , chứa nước pha loãng (5.1), môi trường tổng hợp (5.6) và chất thử (5.7), để thu được các nồng độ đã biết khác nhau như yêu cầu. Xem Bảng D.1 trong Phụ lục D về ví dụ thể tích của các thành phần. Điều chỉnh pH tới  $7,5 \pm 0,5$ , pha loãng bằng nước và thêm vi sinh vật nuôi cấy (5.8) để thu được các thể tích cuối cùng bằng nhau. Nếu là thử ảnh hưởng ức chế của pH, thì không điều chỉnh pH.

### 8.5 Hỗn hợp đối chứng

Thông thường, đối với hầu hết các trường hợp, chuẩn bị hỗn hợp,  $F_R$ , với chất đối chứng thích hợp (5.5) theo đúng cách như trong 8.4 (xem 8.10.2).

### 8.6 Mẫu trắng kiểm tra

Tiến hành thử ít nhất một mẫu trắng,  $F_B$ , có chứa thể tích bùn hoạt hóa và môi trường tổng hợp như với hỗn hợp thử, nhưng không có chất thử. Pha loãng bằng nước tới thể tích như hỗn hợp thử.

### 8.7 Thử phi sinh vật

Nếu cần, (ví dụ một chất thử đã biết hoặc nghi ngờ có tính khử mạnh), chuẩn bị hỗn hợp,  $F_A$ , để đo sự tiêu thụ oxy phi sinh vật. Các hỗn hợp này chứa lượng chất thử, môi trường tổng hợp và nước như trong hỗn hợp thử, nhưng không chứa bùn hoạt hóa. Nếu cần, thêm chất ức chế như thủy ngân clorua để phòng ngừa sự tiêu thụ oxy sinh học, ví dụ dung dịch  $HgCl_2$  (5.3) 1,0 mL/L.

### 8.8 Thử sự nitrat hóa

Chuẩn bị hỗn hợp, ( $F_B$ ) như trong mẫu trắng kiểm tra (8.6) và hỗn hợp thử bổ sung ( $F_N$ ) nhưng hỗn hợp này cũng chứa ATU 11,6 mg/L (5.2). Sục khí và ủ trong 30 min (8.4) và sau đó đo tốc độ tiêu thụ oxy (8.12) và tính tốc độ tiêu thụ oxy do sự nitrat hóa (như trong 9.2).

### 8.9 Thử sơ bộ

Phép thử sơ bộ giúp ước lượng khoảng nồng độ cần thiết trong một phép thử chính thức để xác định sự ức chế tiêu thụ oxy. Cách khác, nếu không có sự ức chế tiêu thụ oxy trong phép thử sơ bộ thì có thể chứng minh rằng phép thử chính thức là không cần thiết.

Tiến hành phép thử (8.10.2, 8.10.3) sử dụng ít nhất ba nồng độ chất thử (5.7), ví dụ 1,0 mg/L; 10 mg/L; và 100 mg/L, một mẫu trắng kiểm tra (8.6) và, nếu cần, một phép thử phi sinh vật (8.7) có chất thử ở nồng độ cao nhất (xem ví dụ trong Phụ lục D, Bảng D.1).

Trong trường hợp lý tưởng, nồng độ thấp nhất của chất thử được sử dụng phải không có ảnh hưởng đến sự tiêu thụ oxy.

Tính tốc độ tiêu thụ oxy (9.1) và tốc độ nitrat hóa (9.2), nếu có liên quan; và tính phần trăm ức chế (9.3).

CHÚ THÍCH: Tùy thuộc vào mục đích của phép thử, cũng có khả năng xác định độ độc của một nồng độ giới hạn, ví dụ 100 mg/L, mà nồng độ này bao trùm toàn bộ dự đoán thực tế cho chất thử đang quan tâm. Nếu không có dấu hiệu ảnh hưởng độc tính đáng kể tại nồng độ này, thì không cần thực hiện phép thử thêm tại các nồng độ thấp hơn hoặc nồng độ cao hơn.

## 8.10 Phép thử chính thức

### 8.10.1 Khái quát

Có thể xác định sự ức chế của ba sự tiêu thụ oxy khác nhau, cụ thể là: sự ức chế tiêu thụ oxy tổng, sự ức chế tiêu thụ oxy dị dưỡng, và sự ức chế tiêu thụ oxy do sự nitrat hóa. Đối với sự tiêu thụ tổng số, chuẩn bị hỗn hợp phản ứng như trong 8.10.2, trong khi đó, đối với hai sự ức chế tiêu thụ oxy còn lại, chuẩn bị các hỗn hợp như trong 8.10.2 và cả trong 8.10.3.

### 8.10.2 Ức chế sự hấp thụ oxy tổng

Tiến hành phép thử với khoảng nồng độ được suy luận từ thử sơ bộ. Cần thử ít nhất với năm nồng độ theo thang logarit và kể cả mẫu trắng kiểm tra. Không cần lặp lại thử phi sinh vật nếu thử sơ bộ cho thấy không có sự tiêu thụ oxy do quá trình phi sinh vật nào. Tuy nhiên, nếu xảy ra sự tiêu thụ oxy đáng kể, thì phải thử phi sinh vật cho mỗi nồng độ của chất thử.

Sử dụng chất đối chứng [ví dụ 3,5-diclophenol hoặc *N*-metylanilin (5.5)] để kiểm tra độ nhạy của bùn. Khi có thể, kiểm tra độ nhạy đối với mỗi loạt phép thử.

CHÚ THÍCH: Độ nhạy của bùn hoạt hóa được biết là sự dao động [13], giữa các yếu tố khác nhau, theo cách duy trì bùn trong phòng thí nghiệm trong khoảng thời gian từ khi lấy mẫu/chuẩn bị mẫu đến khi sử dụng. Vì thế, không được phép dựa vào tín hiệu phản hồi của chất ức chế đối chứng thu được trong các trường hợp khác, với bùn hoạt hóa từ cùng một nguồn hoặc cùng một mẻ.

### 8.10.3 Phân biệt giữa ức chế hô hấp dị dưỡng và sự nitrat hóa liên kết với sự tiêu thụ oxy

Sử dụng chất ức chế sự nitrat hóa đặc trưng, ATU, có thể những ảnh hưởng ức chế của chất thử lên sự oxy hóa dị dưỡng được đánh giá trực tiếp, và, bằng cách lấy tốc độ tiêu thụ oxy tổng (không có ATU) trừ đi tốc độ tiêu thụ oxy khi có mặt ATU, có thể tính được những ảnh hưởng lên tốc độ nitrat hóa (xem Phụ lục C).

Chuẩn bị hai dãy hỗn hợp phản ứng như trong 8.10.2, nhưng thêm ATU vào một dãy hỗn hợp để cho nồng độ cuối cùng là 11,6 mg/L (5.2), khi đó ức chế hoàn toàn sự nitrat hóa. Tốc độ tiêu thụ oxy của các hỗn hợp trong dãy còn lại chỉ đo sự oxy hóa dị dưỡng, và sự chênh lệch giữa từng giá trị tương ứng của hai dãy hỗn hợp cho giá trị tiêu thụ oxy do nitrat hóa.

Nếu không biết liệu có xảy ra nitrat hóa bùn hoạt hóa hay không, thì chuẩn bị một bình mẫu trắng kiểm tra ( $F_B$ , 8.6) và hỗn hợp thứ hai (được biểu thị  $F_N$ ) có chứa ATU ở nồng độ 11,6 mg/L như trong 8.8. Sục khí trong cốc khoảng 30 min và sau đó xác định tốc độ tiêu thụ oxy. Sự oxy hóa của amoni được chỉ thị nếu tốc độ trong bình  $F_B$  cao hơn đáng kể so với tốc độ đo được trong bình  $F_N$ .

CHÚ THÍCH: ATU có nồng độ 11,6 mg/L sẽ gây ức chế hoàn toàn quá trình nitrat hóa ít nhất qua 180 min.

## 8.11 Ủ

Sục khí tất cả các hỗn hợp (8.4 đến 8.9) để cho oxy càng gần bão hòa càng tốt, nhưng chú ý không để quá bão hòa. Cần khuấy để trộn kỹ trong bình ủ. Đảm bảo rằng tất cả các hỗn hợp có cùng nhiệt độ gần như nhau ( $22 \pm 2$ ) °C và nhiệt độ này không được thay đổi đáng kể trong quá trình thử.



## **TCVN 6226:2012**

Chọn trong vòng 180 min tùy ý. Đối với các chất ít hòa tan trong nước, nên để thời gian đủ để xảy ra tiếp xúc hiệu quả. Thông thường, bùn hoạt hóa vẫn hô hấp nhiều trong nước thải tổng hợp sau thời gian này. Nếu không, phải lặp lại phép thử sử dụng môi trường đã làm giàu với thể tích lớn hơn.

Cũng có thể kéo dài quá trình ủ tới 27 h. Chi tiết xem Tài liệu viện dẫn [13].

### **8.12 Đo tốc độ tiêu thụ oxy**

Sau 30 min từ khi bắt đầu ủ hỗn hợp đầu tiên, chuyển mẫu từ bình sục khí đầu tiên sang bình thử (6.1) và đo ngay, tốc độ giảm nồng độ oxy hòa tan, sử dụng đầu đo oxy (6.2). Lặp lại quy trình với mẫu của mỗi hỗn hợp, sau thời gian sục khí khoảng 30 min và, nếu cần, 180 min. Cần khuấy để đảm bảo rằng tín hiệu phản hồi của đầu đo có độ trễ là nhỏ nhất tới sự thay đổi nồng độ oxy, và đảm bảo phép đo oxy tái lập và thường xuyên trong bình đo.

Ví dụ, đặt mẫu vào ngăn đo hình trụ dung tích khoảng 20 mL và phù hợp với điện cực oxy và khuấy từ. Trong trường hợp này, thể tích của hỗn hợp có thể bị giảm xuống khoảng 200 mL (từ 500 mL, Bảng D.1). Trước khi bắt đầu một phép đo mới, làm sạch ngăn bằng nước vòi. Ví dụ về thiết bị đo, xem Hình A.2 trong Phụ lục A.

Cách khác, sử dụng mẫu để làm đầy bình BOD phù hợp với khuấy từ (6.3). Đưa đầu đo oxy có bộ chỉnh lưu ngoài vào cổ bình và bắt đầu khuấy từ (ví dụ, xem Hình A.1).

Đo và liên tục ghi lại nồng độ oxy hòa tan trong khoảng 5 min đến 10 min, hoặc cho đến khi nồng độ oxy giảm xuống dưới 1 mg/L. Sau đó lấy điện cực ra, đưa hỗn hợp trở lại bình sục khí và tiếp tục sục khí và khuấy. Lặp lại quy trình này với các mẫu trong từng bình thử một cách lần lượt để thu được một dãy các số đọc được thực hiện sau 30 min cho tất cả các hỗn hợp thử. Nếu cần có thêm thông tin sau thời gian tiếp xúc được kéo dài, lặp lại quy trình sau khi bắt đầu ủ 180 min.

## **9 Tính toán và biểu thị kết quả**

### **9.1 Tính tốc độ tiêu thụ oxy**

Tính tốc độ tiêu thụ oxy của các hỗn hợp thử từ các giá trị đo được, ví dụ, từ phần tuyến tính của đồ thị nồng độ oxy theo thời gian, giới hạn tính toán lý tưởng của nồng độ oxy từ 2,0 mg/L đến 7,0 mg/L vì nồng độ cao hơn và thấp hơn có thể ảnh hưởng lên chính tốc độ tiêu thụ oxy của hỗn hợp. Sự chệch trong dải nồng độ bên dưới hoặc bên trên các giá trị này đôi khi không thể tránh được và cần thiết, ví dụ, nếu sự hô hấp bị ngăn cản mạnh và vì vậy xảy ra rất chậm, hoặc nếu bùn hoạt hóa hô hấp quá nhanh. Điều này có thể chấp nhận được, nếu các phần mở rộng của đồ thị tiêu thụ là thẳng và gradien của đồ thị không thay đổi vì chúng đi qua nồng độ  $O_2$  2,0 mg/L hoặc 7,0 mg/L. Những đoạn cong của đồ thị cho thấy hệ thống đo đang được ổn định hoặc tốc độ tiêu thụ đang thay đổi và không phải sử dụng để tính toán tốc độ hô hấp. Tốc độ tiêu thụ oxy được tính theo miligam trên lít trên giờ, hoặc miligam trên gam trên giờ.

Tốc độ tiêu thụ oxy,  $R$ , tính theo miligam trên lít trên giờ, có thể được tính hoặc được nội suy từ phần tuyến tính của đồ thị giảm oxy được ghi lại theo Công thức (1):

$$R = [(\rho_1 - \rho_2) / \Delta t] \times 60 \quad (1)$$

trong đó:

$\rho_1$  là nồng độ oxy tại thời điểm bắt đầu của đoạn đồ thị tuyến tính đã chọn, tính bằng miligam trên lít (mg/L);

$\rho_2$  là nồng độ oxy tại thời điểm kết thúc của đoạn đồ thị tuyến tính đã chọn, tính bằng miligam trên lít (mg/L);

$\Delta t$  là khoảng thời gian giữa hai phép đo, tính bằng phút (min).

Tốc độ hô hấp đặc trưng ( $R_s$ ) được biểu thị bằng lượng oxy đã tiêu thụ trên khối lượng khô của bùn trên giờ theo Công thức (2):

$$R_s = R / \rho_{ss} \quad (2)$$

trong đó:

$\rho_{ss}$  là nồng độ chất rắn lơ lửng trong hỗn hợp thử, tính bằng gam trên lít (g/L).

Giá trị 20 mg/(g.h) được lấy làm chuẩn cứ của tính đúng đắn (xem Điều 10).

Chỉ số khác nhau của  $R$ , có thể được kết hợp, được giải thích như sau:

- S tốc độ đặc trưng
- T tốc độ hô hấp tổng
- N tốc độ do hô hấp từ sự natri hóa
- H tốc độ do hô hấp dị dưỡng
- A tốc độ do quá trình phi sinh vật.
- B tốc độ dựa trên thử mẫu trắng.

## 9.2 Tính tốc độ của quá trình nitrat hóa

Sự liên kết của quá trình hô hấp tổng, hô hấp nitrat hóa và hô hấp dị dưỡng được nêu bằng Công thức (3):

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

$R_N$  là tốc độ tiêu thụ oxy do sự nitrat hóa, tính bằng miligam trên lít và giờ (mg/L.h);

$R_T$  là tốc độ tiêu thụ oxy đã đo được của mẫu trắng kiểm tra (không có ATU) ( $F_B$ ), tính bằng miligam trên lít và giờ (mg/L.h);

## TCVN 6226:2012

$R_H$  là tốc độ tiêu thụ oxy đã đo của mẫu trắng kiểm tra có thêm ATU ( $F_N$ ), tính bằng miligam trên lít và giờ (mg/L.h).

Liên kết này là hợp lệ đối với các giá trị mẫu trắng ( $R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}$ ), thử phi sinh vật ( $R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}$ ) và mẫu thử với chất thử ( $R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}$ ) (mg/g.h), và được tính theo Công thức (4) đến Công thức (6):

$$R_{NS} = R_N / \rho_{SS} \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T / \rho_{SS} \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H / \rho_{SS} \quad (6)$$

Nếu  $R_N$  là không đáng kể (ví dụ < 5 %  $R_T$  trong mẫu trắng kiểm tra) thì có thể được giả định rằng tốc độ tiêu thụ oxy dị dưỡng bằng tiêu thụ tổng, và không xảy ra sự nitrat hóa. Do đó, chỉ một bộ bình thử (8.10.2) cần tiến hành cho phép thử chính thức. Nếu  $R_N$  là đáng kể (ví dụ > 5 %  $R_T$  trong mẫu trắng kiểm tra), thì hai bộ bình thử cần được tiến hành (8.10.3) để đo sự ức chế tổng, tốc độ tiêu thụ oxy dị dưỡng và tiêu thụ oxy do sự nitrat hóa.

Trong cách tương tự, xác định sự tiêu thụ oxy với nồng độ chất thử khác.

### 9.3 Tính phần trăm ức chế

Phần trăm ức chế,  $I$ , của sự tiêu thụ oxy tổng tại mỗi nồng độ của chất thử được tính bằng Công thức (7):

$$I = [1 - (R_T - R_{TA}) / R_{TB}] \times 100 \% \quad (7)$$

Tương tự, phần trăm ức chế tiêu thụ oxy dị dưỡng,  $I_H$ , tại mỗi nồng độ được tính bằng Công thức (8):

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA}) / R_{HB}] \times 100 \% \quad (8)$$

Cuối cùng, phần trăm ức chế tiêu thụ oxy do sự nitrat hóa,  $I_N$ , tại mỗi nồng độ được tính theo Công thức (9)

$$I_N = [1 - (R_T - R_H) / (R_{TB} - R_{HB})] \times 100 \% \quad (9)$$

Vẽ đường biểu diễn phần trăm sự ức chế khả năng tiêu thụ oxy theo logarit nồng độ chất thử (xem ví dụ đường cong ức chế trong Phụ lục E). Đường cong ức chế được vẽ cho từng khoảng thời gian sục khí, ví dụ sau 30 min và 180 min. Từ đồ thị, tính hoặc nội suy nồng độ chất thử gây ra sự ức chế 50 % khả năng tiêu thụ oxy ( $EC_{50}$ ).

Nếu số liệu phù hợp có sẵn, giới hạn tin cậy 95 % của  $EC_{50}$ , độ dốc của đường cong và các giá trị thích hợp để đánh dấu thời điểm bắt đầu (ví dụ  $EC_{10}$  và  $EC_{20}$ ) và kết thúc của khoảng ức chế (ví dụ  $EC_{80}$  và  $EC_{90}$ ) có thể được tính hoặc được nội suy.

Do khả năng biến đổi thường quan sát được trong kết quả, nên có thể trong nhiều trường hợp thể hiện kết quả theo thứ tự độ lớn, ví dụ:

EC<sub>50</sub> < 1 mg/L

EC<sub>50</sub> 1 mg/L đến 10 mg/L

EC<sub>50</sub> 10 mg/L đến 100 mg/L

EC<sub>50</sub> > 100 mg/L.

#### 9.4 Biểu thị kết quả

Khi sử dụng bùn nitrat hóa, có thể gây ra sự phức tạp vì đôi khi độ nhạy của vi sinh vật nitrat hóa khác nhau. Vì vậy, ví dụ, đường cong hô hấp có thể có hai pha, giá trị EC<sub>50</sub> có thể thấp hơn đáng kể và đường biểu diễn nồng độ-ức chế có thể bị méo. Thêm vào đó, có thể xảy ra sự thay đổi trong hoạt động của tập hợp sự nitrat hóa của mẫu bùn từ đánh giá sơ bộ và cuộc điều tra chính thức tiếp theo, sự thay đổi này làm tăng mâu thuẫn ngẫu nhiên của hai dãy kết quả trong cùng một phép thử. Có thể phân loại những cản trở này bằng cách đo tốc độ tiêu thụ oxy, trong trường hợp có và không có chất ức chế sự nitrat hóa đặc trưng trong hỗn hợp thử. Sự phân loại này đưa đến một số thuận lợi đối với diễn giải kết quả. Thứ nhất, khẳng định xem có hay không có sự nitrat hóa của mẫu bùn. Thứ hai, định lượng những đóng góp của sự nitrat hóa (nếu có) tới sự tiêu thụ oxy tổng thể, và thứ ba, tạo điều kiện thuận lợi cho việc đánh giá cả tính độc do oxy tự dưỡng và do oxy dị dưỡng trong một phép thử.

Kết quả của chất bay hơi sẽ được diễn giải thận trọng và có khả năng đánh giá không đúng mức mọi ảnh hưởng ức chế vì khó duy trì được nồng độ ban đầu.

Kết quả của chất không hòa tan tương tự sẽ được xử lý thận trọng và không thể định lượng dễ dàng; ngược lại, các ảnh hưởng ức chế có thể được ước lượng sai nếu nồng độ của hợp chất trong dung dịch thay đổi vì bất cứ lý do gì. Dựa trên xem xét quá trình lắng đọng trong giai đoạn lắng sơ bộ của toàn bộ quá trình xử lý có thể phù hợp hơn với chất thử không hòa tan đối với ức chế quá trình tạo khí của bùn kỵ khí (xem ISO 13641-1<sup>[10]</sup>).

Các kết quả từ phép thử này chỉ được xem như là một hướng dẫn về khả năng gây độc của chất thử, vì bùn của các nguồn khác nhau có thành phần và nồng độ vi khuẩn khác nhau. Hơn nữa, phép thử trong phòng thí nghiệm không thể mô phỏng thực sự các điều kiện môi trường. Ví dụ, không tính đến sự thích ứng dài hạn của các vi sinh vật trong bùn hoạt hóa với chất thử, hoặc chất mà có thể hấp phụ lên bùn và dựa trên nồng độ độc qua khoảng thời gian dài hơn thời gian cho phép trong phép thử<sup>[14]</sup>. Với mục đích này, thời gian ủ có thể được kéo dài hơn, ví dụ tới 27 h<sup>[13]</sup>. Những yếu tố này có thể được nghiên cứu bằng áp dụng của các phép thử mô phỏng thích hợp. Toàn bộ phép thử phân hủy sinh học tiêu chuẩn được nêu trong ISO/TR 15462<sup>[11]</sup>. Thông tin chung về thử sinh học, xem ISO 5667-16.

## 10 Tính đúng đắn của kết quả

Khi có thể, kiểm tra độ nhạy của bùn hoạt hóa bằng chất đối chứng.

Trong phép thử liên phòng thí nghiệm được tiến hành vào tháng bảy năm 2004 sử dụng bùn hoạt hóa lấy từ nước thải sinh hoạt, số liệu độ đúng (Bảng 1) và khoảng hợp lý (Bảng 2) thu được với chất đối chứng 3,5-diclorophenol và *N*-metylanilin (chỉ dùng cho sự ức chế nitrat hóa)

**Bảng 1 – Số liệu độ đúng đối với 3,5-diclorophenol và *N*-metylanilin**

Thông số	Giá trị trung bình mg/L	Độ lệch chuẩn mg/L	Khoảng tin cậy 95 % của giá trị trung bình mg/L	Số phép thử thực hiện
<b>3,5-Diclorophenol, thời gian ủ 30 min</b>				
Sự hô hấp tổng EC <sub>50</sub>	9,8	6,5	7,1 đến 12,6	24
Sự hô hấp dị dưỡng EC <sub>50</sub>	20,3	8,6	16,3 đến 24,3	20
Sự hô hấp do sự nitrat hóa EC <sub>50</sub>	4,6	4,7	2,3 đến 6,9	19
<b>3,5-Diclorophenol, thời gian ủ 180 min</b>				
Sự hô hấp tổng EC <sub>50</sub>	9,3	3,7	7,2 đến 11,3	15
Sự hô hấp dị dưỡng EC <sub>50</sub>	19,3	7,7	14,1 đến 24,4	11
Sự hô hấp do sự nitrat hóa EC <sub>50</sub>	4,3	2,6	2,3 đến 6,3	9
<b><i>N</i>-metylanilin, thời gian ủ 30 min</b>				
Sự hô hấp do sự nitrat hóa EC <sub>50</sub>	1,50	0,44	1,13 đến 1,87	8
<b><i>N</i>-metylanilin, thời gian ủ 180 min</b>				
Sự hô hấp do sự nitrat hóa EC <sub>50</sub>	3,74	2,24	1,87 đến 5,61	8

Bảng 2 – Khoảng hợp lý dự kiến cho các giá trị  $EC_{50}$ 

Chất đối chứng	Khoảng thời gian thử min	Thông số	Khoảng hợp lý dự kiến mg/L
3,5-Dichlorophenol	30	Hô hấp tổng	2 đến 25
3,5-Dichlorophenol	180	Hô hấp tổng	2 đến 25
3,5-Dichlorophenol	30	Hô hấp dị dưỡng	5 đến 40
3,5-Dichlorophenol	180	Hô hấp dị dưỡng	5 đến 40
3,5-Dichlorophenol	30	Hô hấp do sự nitrat hóa	0,1 đến 10
3,5-Dichlorophenol	180	Hô hấp do sự nitrat hóa	0,1 đến 10
N-metylanilin	30	Hô hấp do sự nitrat hóa	0,1 đến 5
N-metylanilin	180	Hô hấp do sự nitrat hóa	0,1 đến 5

Nếu  $EC_{50}$  của chất đối chứng không nằm trong khoảng dự kiến, thì lặp lại phép thử với bùn hoạt hóa từ nguồn khác.

Khi tốc độ tiêu thụ oxy tổng của mẫu trắng kiểm tra nhỏ hơn 20 mg/g khối lượng khô trên giờ thu được, các kết quả là giả. Trong trường hợp các giá trị thấp như vậy, lặp lại phép thử với bùn hoạt hóa đã đã được rửa trước khi sử dụng (8.3) hoặc sử dụng bùn từ nguồn khác.

## 11 Báo cáo thử nghiệm

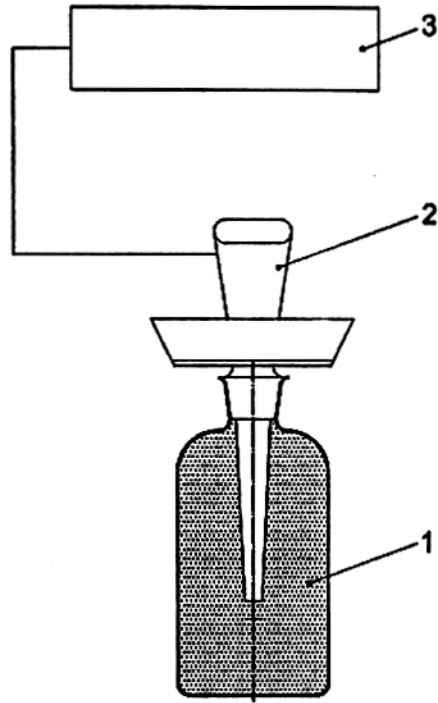
Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất thông tin sau:

- Viện dẫn tiêu chuẩn này TCVN 6226:2012 (ISO 8192:2007);
- Tên, đặc tính và bản chất của chất thử;
- Nguồn, nồng độ, cách xử lý sơ bộ và duy trì bùn hoạt hóa;
- Nhiệt độ thử;
- Tên của chất đối chứng và kết quả của phép đo sự ức chế với chất này ( $EC_{50}$ ), bắt đầu ức chế tổng, ức chế dị dưỡng và/hoặc ức chế sự nitrat hóa;
- Kiểm tra hóa lý tốc độ tiêu thụ oxy phi sinh vật (nếu cần);
- Kết quả thử, đặc biệt là  $EC_{50}$  và nếu có thể, các số liệu thống kê khác (xem Điều 10), bắt đầu ức chế tổng, ức chế dị dưỡng và/hoặc ức chế sự nitrat hóa;
- Tất cả số liệu đo được và đường cong ức chế (xem Điều 10 và Phụ lục E);
- Tất cả hiện tượng quan sát và những sai khác so với quy trình chuẩn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

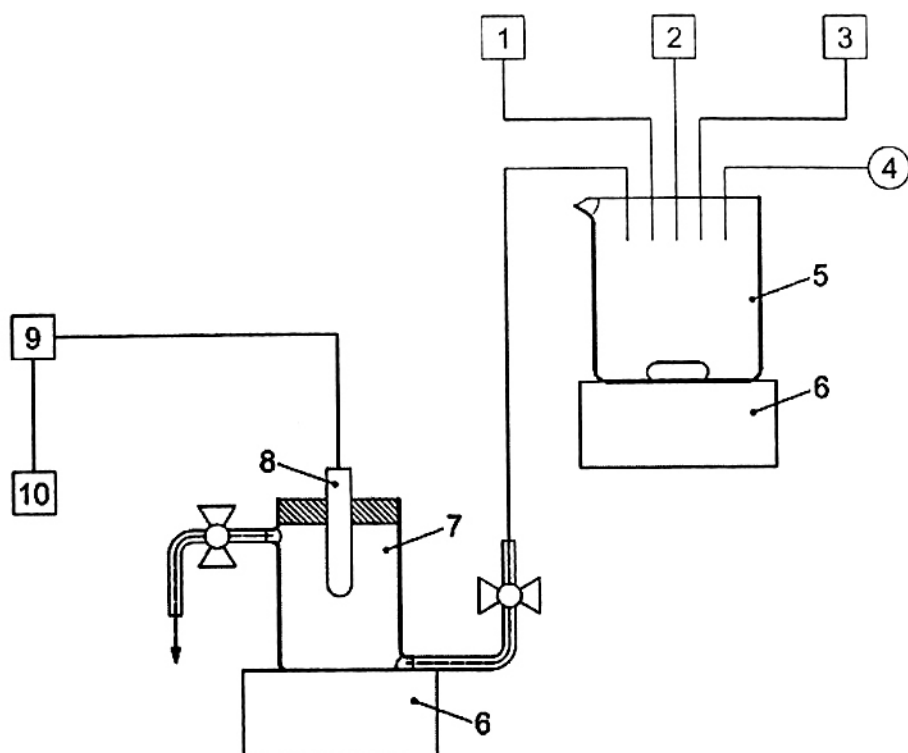
Ví dụ về các thiết bị đo



CHÚ DẪN

- 1 Bình thử
- 2 Điện cực oxy
- 3 Thiết bị đo oxy

Hình A.1 – Thiết bị để đo nồng độ oxy với bình BOD là bình thử

**CHÚ DẪN**

- 1 Bùn hoạt hóa
- 2 Môi trường tổng hợp
- 3 Chất thử
- 4 Không khí
- 5 Bình trộn
- 6 Máy khuấy từ
- 7 Ngăn đo oxy
- 8 Điện cực oxy
- 9 Thiết bị đo oxy
- 10 Bộ ghi

**Hình A.2 – Sơ đồ thiết bị đo nồng độ oxy**



**Phụ lục B**  
(Tham khảo)

**Thiết bị, dụng cụ để nuôi cấy bùn hoạt hóa nitrat hóa**

**B.1 Khái quát**

Vi sinh nitrat hóa sẽ trở nên phổ biến hơn tại các trạm xử lý nước thải do Quy chế của Cộng đồng Châu Âu trở nên có hiệu lực, nên sẽ dễ dàng hơn để tìm bùn nitrat hóa. Nếu không tìm được bùn hoạt hóa, thì Phụ lục này mô tả ví dụ về một hệ thống (thiết bị Husmann có hai bộ lắng thứ cấp) mà có thể được dùng để tạo thành bùn hoạt hóa nitrat hóa trong phòng thí nghiệm, để cung cấp nguồn vi sinh vật nuôi cấy cho phép thử ức chế. Thiết bị Husmann cũng có thể được vận hành một cách đơn giản, trực tiếp chỉ với một bộ lắng thứ cấp (bể lắng).

**B.2 Nguyên tắc**

Thiết bị nuôi cấy bao gồm bộ Husmann mở rộng và bộ Husmann bổ sung (xem TCVN 6826 (ISO 11733)[8]) gồm một bể sục khí và hai bộ lắng thứ cấp được nối với nhau. Sức chứa của hệ thống phải đủ để cung cấp lượng bùn hoạt hóa vừa đủ để sử dụng cho phép thử ức chế. Dòng nước thải được định lượng bằng cách bơm trực tiếp vào bể hoạt tính nơi mà Nước thải và bùn hoạt hóa được khuấy và sục khí liên tục. Sử dụng ống khuếch tán để tạo bọt khí. Hỗn hợp bùn hoạt hóa/nước thải đi qua để lắng thứ nhất nơi mà phần lớn bùn hoạt hóa được tách ra từ nước thải được xử lý. Sau đó tiếp tục tách trong để lắng thứ hai. Bùn hoạt hóa lắng xuống trong các bể lắng và được hoàn lưu lại bể sục khí như bùn hoàn lưu, bằng cách sử dụng khí nâng hoặc bơm nhu động.

Dòng nước thải đô thị tốt hơn nên được pha loãng với nước vôi, nếu cần, để hòa tan nồng độ cacbon hữu cơ (DOC) khoảng 50 mg/L và bổ sung muối khoáng và, nếu cần bổ sung dung dịch men chiết. Cần bổ sung muối khoáng để phòng ngừa thiếu các chất dinh dưỡng đơn lẻ. Cung cấp  $\text{NH}_4\text{Cl}$  đảm bảo đủ và nồng độ amoni không đổi cho vi khuẩn nitrat hóa,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , cần như chất đệm để giữ pH trong khoảng tối ưu và  $\text{NaHCO}_3$ , được sử dụng như nguồn cacbon do vi khuẩn nitrat hóa tự dưỡng, để thiết lập đầy đủ hoạt tính nitrat hóa.

**B.3 Yêu cầu kỹ thuật**

Thể tích chất lỏng trong bể sục khí:	20 L;
Thể tích chất lỏng trong bộ lắng sơ cấp:	10 L;
Thể tích chất lỏng trong bộ lắng thứ cấp:	3 L;
Tốc độ hoàn lưu của bùn:	xấp xỉ 99 % tốc độ dòng;
Nhiệt độ vận hành:	15 °C đến 25 °C;
Ánh sáng:	điều kiện xung quanh phòng thí nghiệm.

**B.4 Dung dịch gốc dinh dưỡng**

NH <sub>4</sub> Cl	178,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	29,7 g
NaHCO <sub>3</sub>	485 g

Được hòa tan trong 5 L nước uống.

**B.5 Dung dịch men chiết (tùy chọn)**

Men chiết	100 g
-----------	-------

Được hòa tan trong 1 L nước uống.

**B.6 Thành phần của nước thải**

Để chuẩn bị lượng nước thải hàng ngày, thêm 500 mL dung dịch gốc dinh dưỡng (B.4) và 60 mL dung dịch men chiết (B.5) tùy chọn vào 30 L nước thải đô thị. Nếu nồng độ DOC của nước thải không xấp xỉ 50 mg/L, thì có thể pha loãng với nước uống hoặc cho thêm dung dịch men chiết. Thêm 24 L mỗi ngày vào bể sục khí. Thời gian lưu nước trung bình (HRT) khoảng 1,4 ngày trong hệ thống thử, hoặc 0,83 ngày trong bể sục khí.

**B.7 Tách bỏ bùn và thời gian lưu của bùn (SRT)**

Nồng độ của bùn hoạt hóa thường ở khoảng 2,5 g/L chất rắn lơ lửng. Bùn nitrat hóa được lấy ra từ hệ thống để thực hiện phép thử ức chế nitrat hóa, ví dụ 10,0 L mỗi tuần, tương ứng với lượng hao hụt tổng trung bình khoảng 24 g chất khô và SRT khoảng 25 ngày. SRT có thể được giảm xuống 10 ngày mà không làm mất hoạt tính nitrat hóa.

**B.8 Kiểm soát và bảo quản**

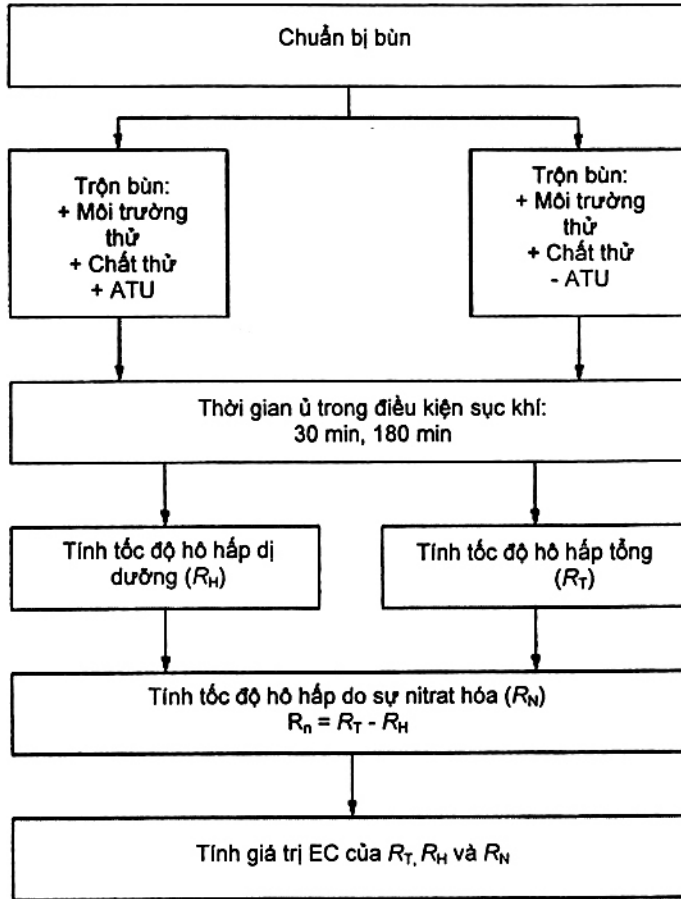
Tính năng đầy đủ của trạm xử lý nước thải trong phòng thí nghiệm phải được kiểm tra thường xuyên bằng cách đo nồng độ DOC trong dòng nước thải chưa xử lý và nước thải đã xử lý và tính mức độ (%) của sự đào thải DOC. Hoạt tính nitrat hóa của bùn cũng phải được kiểm tra thường xuyên. Việc kiểm tra này có thể được thực hiện bằng đo nồng độ amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) trong nước thải chưa xử lý và nước thải đã xử lý và tính mức độ (%) loại bỏ amoni, hoặc bằng phép thử hoạt tính nitrat hóa (xem Điều 9).

Bùn hoạt hóa nitrat hóa được tạo ra trong các điều kiện này có thể được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 °C tới một tuần mà không làm mất đáng kể hoạt tính của bùn. Bùn không phải sục khí và bình chứa phải nạp đầy tới 75 % dung tích của bình. Theo cách này, bùn hoạt hóa được bảo quản phải thích nghi được với nhiệt độ thử ức chế sự nitrat hóa (1 h đến 2 h) trước khi sử dụng.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Miêu tả khái quát quy trình thử



Hình C.1

**Phụ lục D**  
(Tham khảo)

**Hỗn hợp cho phép thử sơ bộ**

**Bảng D.1 – Ví dụ về hỗn hợp cho phép thử sơ bộ**

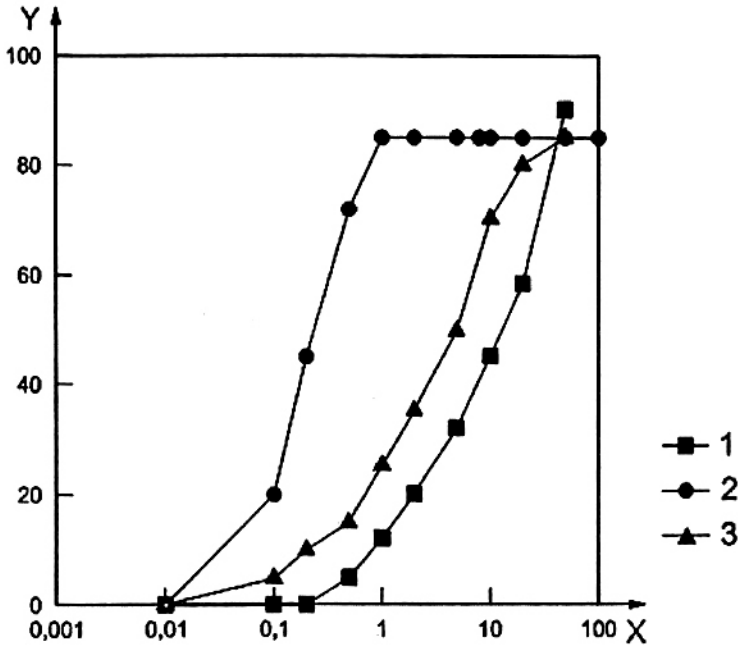
<b>Nồng độ ban đầu của thuốc thử</b>					
Dung dịch gốc chất thử (5.7)	1 g/L				
Dung dịch gốc môi trường tổng hợp (5.6)	Xem 5.6				
Bùn hoạt hóa (5.8)	3 g chất rắn lơ lửng trên lít				
<b>Thành phần của hỗn hợp</b>	<b>Bình thử<sup>a</sup></b>				
	$F_{T1}$	$F_{T2}$	$F_{T3}$	$F_B$	$F_A$
Dung dịch gốc chất thử (5.7) (mL)	0,5	5	50	0	50
Dung dịch gốc môi trường tổng hợp (5.6) (mL)	16	16	16	16	16
Bùn hoạt hóa (5.8) (mL)	250	250	250	250	0
Nước (5.1) (mL)	233,5	229	184	234	434
Thể tích tổng của hỗn hợp (mL)	500	500	500	500	500
<b>Nồng độ trong hỗn hợp</b>					
Chất thử (5.7) (mL)	1	10	100	0	100
Bùn hoạt hóa (5.8) (mg chất rắn lơ lửng trên lít)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

<sup>a</sup> Thực hiện các quy trình như nhau đối với chất đối chứng,  $F_{R1}$ ,  $F_{R2}$ .

Phụ lục E

(Tham khảo)

Ví dụ đường cong ức chế



CHÚ DẪN

X Nồng độ của 3,5-diclorophenol (mg/L)

Y Ức chế (%)

1 Ức chế hô hấp dị dưỡng

2 Ức chế sự nitrat hóa

3 Ức chế hô hấp tổng

Hình E.1 – Đường cong ức chế đối với hô hấp dị dưỡng, sự nitrat hóa và hô hấp tổng

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 5667-16, Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples
- [2] TCVN 7325 (ISO 5814), Chất lượng nước — Xác định oxy hòa tan — Phương pháp đầu đo điện hóa
- [3] TCVN 8184-1 (ISO 6107-1), Chất lượng nước — Thuật ngữ — Phần 1
- [4] ISO 9509, Water quality — Toxicity test for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms
- [5] ISO 9887, Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium — Semi-continuous activated sludge method (SCAS)
- [6] TCVN 6917 (ISO 9888), Chất lượng nước — Đánh giá sự phân hủy sinh học ưa khí cuối cùng của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước — Phép thử tĩnh (phương pháp Zahn-wellens)
- [7] TCVN 6918 (ISO 10634), Chất lượng nước — Hướng dẫn chuẩn bị và xử lý hợp chất hữu cơ ít tan trong nước để đánh giá sự phân hủy sinh học trong môi trường nước
- [8] TCVN 6826 (ISO 11733), Chất lượng nước — Xác định sự đào thải và phân hủy sinh học của các chất hữu cơ trong môi trường nước — Phép thử mô phỏng bùn hoạt hóa
- [9] TCVN 6625 (ISO 11923), Chất lượng nước — Xác định chất rắn lơ lửng bằng cách lọc qua cái lọc sợi thủy tinh
- [10] ISO 13641-1, Water quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General test
- [11] ISO/TR 15462, Water quality — Selection of tests for biodegradability
- [12] BROWN D., HITZ H.R. and SCHÄFER L. (1981) The assessment of the possible inhibitory effect of dye-stuffs on aerobic waste-water bacteria. Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3), pp. 245-261
- [13] GENDIG C., DOMOGALA G., AGNOLI F., PAGGA U. and STROTMANN U.J. (2003). Evaluation and further development of the activated sludge respiration test. *Chemosphere* 52 (1), pp. 143-149
- [14] KING E.F. and PAINTER H.A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge: variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1 (1), pp. 27-39
- [15] PAINTER H.A. (1986) Nitrification in the treatment of sewage and waste-waters. In: Nitrification. Special Publications of the Society for General Microbiology, Vol. 20. Ed: J.I. Prosser. IRL Press, Oxford, UK