

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.015 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 10/8/2018 Trang: 1/9
--	--------------------------------	---

**XÁC ĐỊNH NHU CẦU OXI SINH HÓA
SAU 5 NGÀY (BOD₅)**

Biên soạn	Xem xét	Phê duyệt
Phạm Thị Kim Cúc	Trần Thái Vũ	Trịnh Thị Minh Nguyệt

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
01	Header	Thay đổi header	04/01/2017
02	A.II	Tài liệu tham khảo	10/8/2018
03	B.III	Thực hiện phân tích	10/8/2018

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.TN.015 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 10/8/2018 Trang: 2/9</p>
---	---------------------------------------	--

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này được sử dụng để xác định BOD trong nước thải sinh hoạt, nước thải công nghiệp, nước ngầm, nước uống, nước cấp sinh hoạt, nước mặt, và nước mặn.
- Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) là 1.0 mgO₂/L. Giới hạn định lượng của phương pháp là 3.0 mgO₂/L..
- Lượng mẫu tối thiểu để thực hiện phân tích là 1000 ml.

II. Tài liệu tham khảo

- SMEWW 5210B:2017: **Phân tích BOD₅**
- SMEWW 4500-O.C: **Xác định DO bằng phương pháp chuẩn độ iod**

III. Nguyên tắc

- Mẫu được để vào trong bình đầy, có nút kín, không có bọt khí và được ủ ở nhiệt độ 20 ± 1⁰C trong 5 ngày. Đo lượng oxy hòa tan (DO) trước và sau khi ủ, BOD được tính dựa trên sự khác nhau giữa DO ban đầu và DO cuối.

IV. Lấy mẫu và bảo quản mẫu

- Mẫu để phân tích BOD có thể bị giảm trong quá trình lưu giữ, kết quả là làm cho giá trị BOD thấp đi so với thực tế. Để khắc phục ảnh hưởng này, nên thực hiện phân tích mẫu càng sớm càng tốt. Nếu chưa phân tích mẫu được ngay thì mẫu phải được giữ lạnh ở 4⁰C hay ở nhiệt độ thấp hơn. Trong trường hợp mẫu được phân tích trong vòng 2 giờ kể từ sau khi lấy mẫu thì việc làm lạnh mẫu là không cần thiết.

V. Các yếu tố gây nhiễu.

- Mẫu để phân tích BOD có thể bị giảm trong quá trình lưu giữ, kết quả là làm cho giá trị BOD thấp đi so với thực tế. Để khắc phục ảnh hưởng này, nên thực hiện phân tích mẫu càng sớm càng tốt. Cần nhiều chính phương pháp xác định nhu cầu oxy hóa học là chlorine dư. Loại bỏ bằng cách phơi mẫu ngoài ánh sáng mặt trời có khuấy liên tục trong vòng ít nhất 2 giờ.
- Nồng độ H⁺ cũng ảnh hưởng tới kết quả phân tích nên trung hòa mẫu trước khi phân tích.
- Nhiệt độ ủ có ảnh hưởng rất lớn nên không được nằm ngoài khoảng 20 ± 1⁰C.
- Dụng cụ phân tích phải thật sạch.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.015 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 10/8/2018 Trang: 3/9
--	--------------------------------	---

- Nếu mẫu nước có nitrite: loại bỏ sự cản nhiễu bằng cách thêm 3mg 2-chloro-6-(trichloro methyl) pyridine (TCMP)

VI. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.
- Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất.

1. Thiết bị, dụng cụ

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg
- Tủ ủ hoạt động ở nhiệt độ $20 \pm 1^\circ\text{C}$
- Chai ủ 300mL có miệng loe
- Buret 25mL.

2. Hóa chất

- KH_2PO_4 : Tinh khiết phân tích.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Tinh khiết phân tích.
- NH_4Cl : Tinh khiết phân tích.
- NaOH : Tinh khiết phân tích.
- CaCl_2 : Tinh khiết phân tích.
- H_2SO_4 : Tinh khiết phân tích.
- MgSO_4 : Tinh khiết phân tích.
- Nước cất 2 lần khử Ion.

3. Dung dịch hóa chất.

- Dung dịch đệm phosphate: Hòa tan 8.5g KH_2PO_4 , 21.75g K_2HPO_4 , 33.4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 1.7g NH_4Cl trong 500mL nước cất và pha loãng đến 1L. pH của dung dịch này là 7.2 mà không cần chỉnh gì thêm. Hoặc có thể

thay thế bằng 42.5g KH_2PO_4 hoặc 54.3g K_2HPO_4 trong 700mL nước cất và chỉnh pH đến 7.2 bằng dung dịch NaOH 30%.

- Dung dịch đệm magie sunphate: Hòa tan 22.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trong nước cất và pha loãng đến 1L.
- Dung dịch canxi clorua: Hòa tan 27.5g CaCl_2 trong 1000mL nước cất.
- Dung dịch sắt(III): Hòa tan 0.25g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ trong 1000mL nước cất.
- Dung dịch axít NaOH 1N: Hòa tan 40g NaOH trong 1000mL nước cất.
- Dung dịch axít H_2SO_4 1N: rút khoảng 27 mL H_2SO_4 đậm đặc vào 1000mL nước cất.
- Dung dịch natri sunfite: Hòa tan 1.575g Na_2SO_3 trong 1000mL nước. Dung dịch này không ổn định, pha khi sử dụng.
- Chất ức chế sự nitrit hóa: 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine.
- Dung dịch natri thiosulfate 0.025N: Hòa tan 5.205g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, thêm 0.4g NaOH vào 1000ml nước cất. Xác định nồng độ chính xác của dung dịch này bằng cách: Hút 5ml dung dịch chuẩn $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.1N, thêm 3ml H_2SO_4 đậm đặc, 0.5ml KI bão hòa, để trong bóng tối 5 phút và chuẩn lại bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.025N

$$\text{Nồng độ } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (N)} = \frac{V_{\text{pipet}} * N_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}{V - V_0}$$

V: thể tích $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ tiêu tốn, ml

V_0 : thể tích mẫu trắng, ml

V_{pipet} : thể tích $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (N)

4. Dung dịch chuẩn:

❖ Chuẩn bị dung dịch chuẩn

- ✓ Pha dung dịch chuẩn trung gian và dung dịch chuẩn làm việc hàng ngày trước khi phân tích. Khi pha dung dịch chuẩn trung gian và chuẩn làm việc phải lấy dung dịch chuẩn gốc ra để ở nhiệt độ phòng rồi mới được tiến hành pha.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.TN.015 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 10/8/2018 Trang: 5/9</p>
---	---------------------------------------	--

- ✓ Không được dùng pipét hút thẳng vào dung dịch chuẩn gốc mà phải đổ dung dịch đó ra cốc sạch, khô để hút. Nếu còn thừa không được đổ trở lại mà phải đổ đi.

❖ **Dung dịch chuẩn gốc**

- ✓ Sấy glucose và glutamic acid trong 1h ở 103°C để nguội trong bình hút ẩm.
- ✓ Cân 150mg glucose và 150mg glutamic acid vào nước cất và pha loãng đến 1000ml. Được dung dịch chuẩn có nồng độ 200mgO₂/l.
- ✓ Ghi các thông tin về chuẩn bị chất chuẩn vào trong sổ nhật ký pha hóa chất.
- ✓ Bảo quản lạnh ở 4°C.
- ✓ Sử dụng được trong vòng 6 tháng kể từ ngày pha.

II. **Kiểm soát QA/QC.**

Trong mỗi đợt phân tích, Nhân viên phân tích phải thực hiện phân tích các mẫu sau:

- Mẫu Blank phòng thí nghiệm: Thực hiện với các hóa chất trong phòng thí nghiệm dung để phân tích, không có mẫu và chuẩn. Để kiểm soát sự nhiễm bẩn.
- Mẫu lặp phòng thí nghiệm: Trong một lô mẫu phân tích phòng thí nghiệm phải thực hiện ít nhất một mẫu lặp.
- Mẫu QC: Sử dụng dung dịch Glucose và Glutamic pha ở trên làm mẫu kiểm soát ở nồng độ 200mgO₂/l.

III. **Thực hiện phân tích.**

1. **Chuẩn bị nước pha loãng**

- Nước pha loãng được chuẩn bị bằng cách cho thêm 1mL từng dung dịch đệm photphate, MgSO₄, CaCl₂, FeCl₃ vào mỗi lít nước cất.
- Để nước pha loãng đạt nhiệt độ 20±1 °C và làm cho bão hòa oxi bằng cách lắc hoặc sục không khí. Nồng độ oxi hòa tan trong nước pha loãng sau khi chuẩn bị phải nằm trong khoảng 7-9 mg O₂/L.
- Nếu mẫu quá bão hòa oxi tức là có nồng độ oxi cao hơn 9mg O₂/L, có thể do mẫu nước quá lạnh hoặc trong nước xảy ra quá trình quang hợp. Làm giảm độ quá bão hòa oxi bằng cách lắc hoặc sục khí mạnh. Để không bị

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.015 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 10/8/2018 Trang: 6/9
--	--------------------------------	---

mất lượng oxi trong thời gian ủ, trước khi phân tích mẫu phải được để ổn định nhiệt độ đến $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

- Không sử dụng dung dịch nước pha loãng trên nếu quá 24 giờ.

2. Dung dịch kiểm tra

- Bởi vì kết quả BOD có thể bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của những độc chất hoặc bởi việc sử dụng nguồn nguyên liệu nghèo vi khuẩn, nước chưng cất bị nhiễm đồng, và những nguồn vi sinh vật lấy từ cống rãnh thụ động. Với những nguyên nhân như trên thường làm cho kết quả BOD thấp. Vì vậy nên sử dụng hỗn hợp 150mg/L glucose và 150mg/L glutamic acid là một dung dịch kiểm tra chuẩn để kiểm tra chất lượng nước pha loãng, sự ảnh hưởng của vi sinh vật, và kỹ thuật của người phân tích.
- BOD₅ của hỗn hợp glucose 3mg/L và glutamic acid 3mg/L (tức là ứng với sự pha loãng 50 lần đối với hỗn hợp glucose 150 mg/L và glutamic acid 150mg/L) ở trong phạm vi 198 ± 30.5 .

3. Dung dịch seed

Một vài loại nước bản thân nó không đủ các vi sinh vật cần thiết như: nước thải công nghiệp chưa được xử lý, nước thải đã được khử trùng, nước có nhiệt độ quá cao hay nước có pH quá cao hoặc quá thấp thì phải dùng nước cấy được bổ sung vi sinh vật bằng cách sau:

- ✓ Lấy 1 viên seed được bán sẵn trên thị trường, hòa tan trong 500ml nước, khuấy từ trong 30 phút, sau đó để lắng.
- ✓ Thêm vào mỗi bình ủ BOD 4ml dung dịch seed trên.

4. Xử lý mẫu

- Mẫu quá acid hay kiềm: tức là pH nằm ngoài khoảng 6 - 8.5, trung hòa mẫu bằng NaOH 1N hay H₂SO₄ 1N.
- Đưa mẫu về khoảng $20 \pm 1^\circ\text{C}$ trước khi phân tích mẫu để giảm sự quá bão hòa oxi khi bảo quản mẫu lạnh ở 4°C hoặc bằng cách lắc mạnh.
- Mẫu có chứa clo đáng kể, khử clo bằng dung dịch Na₂SO₃ 0.0125N. Lượng dung dịch Na₂SO₃ cần thêm vào mẫu để khử clo được xác định như

sau: Thêm 10 mL axit acetic(1:1) hay $H_2SO_4(1:50)$ vào một lít mẫu, sau đó tiếp tục thêm 10mL KI 10% rồi định phân bằng Na_2SO_3 0.0125N cho đến điểm tương đương. Lấy thể tích dung dịch Na_2SO_3 0.0125N vừa được xác định như trên thêm vào một lít mẫu, lắc đều để yên 10 – 20 phút, kiểm tra lại nồng độ clo dư.

- Nếu mẫu nước có nitrite: loại bỏ sự cản nhiễu bằng cách thêm 3mg 2-chloro-6-(trichloro methyl) pyridine (TCMP) vào mỗi chai BOD (300mL) để cho nồng độ cuối là 10mg/L.
- Kỹ thuật pha loãng mẫu: Thực hiện sự pha loãng sao cho DO sau 5 ngày ủ ít nhất là 1mg O_2/L và lượng DO tiêu thụ ít nhất là 2 mg O_2/L . Có thể dựa vào giá trị COD để dự đoán độ pha loãng, hoặc có thể tham khảo sự pha loãng dựa trên tính chất của từng loại nước theo bảng sau:

Tính chất mẫu nước	Dự đoán độ pha loãng
Nước thải công nghiệp bị ô nhiễm nặng	< 1%
Nước thải chưa xử lý	1-5%
Nước đã được xử lý sinh học	5-25%
Nước sông bị ô nhiễm	25-100%

- Chuyển mẫu đã pha loãng vào bình ủ, lưu ý cho tràn nhẹ để các bọt khí bám trên thành bình thoát ra hết. Đậy bình tránh tạo bọt khí.
- Thực hiện một mẫu blank: sử dụng nước pha loãng không bổ sung vi sinh vật để kiểm tra chất lượng của nước cất sử dụng và những chai BOD sử dụng để ủ có đủ sạch hay không. DO tiêu thụ không được lớn hơn 0.2mg O_2/L .

5. **Xác định DO bằng phương pháp chuẩn độ**

- Tiến hành làm hai bình cho mỗi mẫu: một bình dùng để chuẩn độ DO ban đầu, bình còn lại đem ủ ở 20°C trong 5 ngày. Chuyển nhẹ mẫu đã pha loãng vào chai (nếu có). Thêm 1ml $MnSO_4$ (364g $MnSO_4.H_2O$ hòa tan trong nước cất và định mức thành 1L), 1ml alkaline I- NaN_3 (cân 500g NaOH hoặc 700g KOH và 135g NaI hoặc 150g KI hòa tan trong nước cất và định mức thành 1L, thêm 10g NaN_3 được pha trong 40ml nước), lắc cho đều, sau đó để yên đến khi kết tủa lắng được khoảng 2/3 bình thì tiếp tục cho vào 1ml H_2SO_4 đậm đặc và lắc cho đến khi kết tủa tan hoàn toàn (Nếu dung dịch chứa hàm lượng Fe > 100ppm thì tiến hành loại Fe bằng 1ml KF

(40g KF.2H₂O trong 100ml nước cất)). Bỏ 100ml dung dịch trong bình sau đó chuẩn độ lượng dung dịch còn lại bằng Na₂S₂O₃ 0.025M (cân 6.205g Na₂S₂O₃.5H₂O thêm 0.4g NaOH và định mức thành 1L) cho đến màu vàng nhạt, nhỏ vài giọt hồ tinh bột dung dịch sẽ chuyển sang màu xanh đậm, tiếp tục chuẩn độ bằng Na₂S₂O₃ cho đến khi dung dịch mất màu. Ghi nhận thể tích chuẩn độ (Vml).

- Đối với chuẩn độ 200mL, 1mL Na₂S₂O₃ 0.025N tương đương 1mgDO/L.
- Lưu ý: khi cho MnSO₄, dd alkaline I-NaN₃, ...thì đầu pipet phải nhúng ngập sâu vào dung dịch trong bình.

C. TÍNH KẾT QUẢ.

Đối với mẫu nước không cấy bổ sung vi khuẩn:

$$\text{BOD}_5, \text{mg O}_2/\text{L} = (D1 - D2) * n$$

Đối với mẫu nước không cấy bổ sung vi khuẩn:

$$\text{BOD}_5, \text{mg O}_2/\text{L} = ((D1 - D2) - (B1 - B2) * f) * n$$

Trong đó:

- D1: DO ban đầu đo trước khi ủ, mg O₂/L.
- D2: DO ban đầu 5 ngày sau khi ủ, mg O₂/L.
- n: Hệ số pha loãng mẫu
- B1: DO của nước cấy kiểm tra vi khuẩn trước khi ủ.
- B2: DO của nước cấy kiểm tra vi khuẩn sau khi ủ.
- f: Tỷ lệ (thể tích mẫu dùng cấy vi khuẩn trong mẫu phân tích/ thể tích mẫu dùng cấy vi khuẩn trong mẫu kiểm tra).

D. ĐẢM BẢO KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

- Mẫu QC nằm trong khoảng 198 ± 30.5 mgO₂/L.
- Giá trị DO₀ phải nằm trong giới hạn từ 7-9mgO₂/L
- Hệ số pha loãng của mẫu phải phù hợp để DO₅ phải có giá trị lớn hơn 2mgO₂/L.
- DO tiêu thụ của blank nước cất không được lớn hơn 0.2mgO₂/L.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong biểu mẫu BM.15.04b và BM.15.06

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.015 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 10/8/2018 Trang: 9/9
--	--------------------------------	---