

10. a 11. STANOVENÍ BIOCHEMICKÉ SPOTŘEBY KYSLÍKU PO n DNECH (BSK_n) - ZŘEĎOVACÍ METODOU

Stanovení BSK slouží k **nepřímému stanovení organických látek, které podléhají biochemickému rozkladu při aerobních podmínkách**. Protože organické látky jsou jednou z hlavních znečišťujících složek vody, patří BSK mezi důležité:

1. **ukazatele čistoty či znečištění vody**
2. **ukazatele kyslíkového režimu**
(organické látky hrají důležitou úlohu při odčerpávání rozpuštěného kyslíku z vody)

Definice:

Biochemická spotřeba kyslíku po n dnech (BSK_n) je definována jako hmotnostní koncentrace rozpuštěného kyslíku spotřebovaného za určitých podmínek biochemickou oxidací organických popř. anorganických látek ve vodě a kde n je inkubační doba (obvykle 5 dní nebo 7 dní) [1, 2]

Podstata zkoušky:

Vzorek zkoušené vody se upravuje a ředí různými objemy ředící vody s dostatečnou koncentrací rozpuštěného kyslíku případně s inokulem aerobních mikroorganismů, nitrifikace se potlačuje [1].

Inkubuje se ve tmě při teplotě 20°C po dobu 5 dní nebo 7 dní ve zcela naplněné a uzavřené lahvičce. Rozpuštěný kyslík se stanoví před inkubací a po ní. Vypočte se hmotnost kyslíku spotřebovaného 1 litrem vody, výsledky se vyjadřují tedy v mg/l. [1]

Kromě zředovací metody se používají ještě metody respirometrické (manometrické – např. aparatura OxiTop od fa. WTW) založené na principech plynoměrné analýzy. Výhodou respirometrických metod je, že lze pracovat bez ředění odpadních vod, napodobovat podmínky při biologickém čištění odpadních vod v aktivaci, sledovat snadno celý průběh BSK, vliv pH a různých počátečních koncentrací substrátu i inokula, vliv toxických látek atd. Nevýhodou proti zředovací metodě je v některých případech složitější aparatura (vysoké pořizovací náklady), méně dostupná běžným laboratorům, náročnější práce a obtížnost stanovení BSK málo znečištěných vod. Výsledky zjištěné zředovací a respirometrickou metodou nejsou vzájemně srovnatelné, protože se pracuje za odlišných podmínek.[5]

Podmínky stanovení BSK_n [4, 5]

- aby vzorek (nebo naředěný vzorek) měl na počátku inkubace obsah rozpuštěného kyslíku 8 mg/l (nejméně) až 9 mg/l. Protože rozpustnost kyslíku ve vodě je poměrně malá, musí být vzorky vody při jejím větším znečištění dostatečně zředěny (odtud zředovací metoda).
- doba n x 24 hodin (n = 5 ~ BSK₅, "pětidenní BSK" nebo n = 7 ~ BSK₇, "sedmidenní BSK"),
- teplota 20±1 °C,
- vyloučení přístupu atmosférického kyslíku a světla,
- aerobní podmínky během celé inkubace.

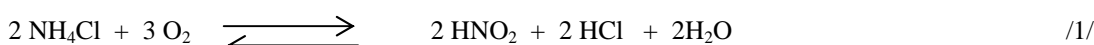
Rozsah použití: Metoda se používá při stanovení BSK₅ větších než 0,3 mg/l. Vzorky s hodnotou BSK₅ větší než 6 mg/l je nutné ředit.

Rušivé vlivy

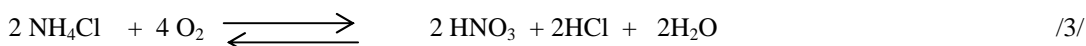
1. U vod, které **neobsahují mikroorganismy** nebo jich obsahují jen velmi málo nebo neobsahují ty mikroorganismy, které se uplatňují při aerobním rozkladu přítomných organických látek, je nutno k ředění před inkubací použít očkovanou ředící vodu. Totéž platí pro vody desinfikované nebo sterilované. Pro inokulaci lze využít inokulum z následujících zdrojů [1]:
 - a) komunální splašky, odebrané z hlavního sběrače kanalizační sítě sídlištního pásma bez významného průmyslového znečištění, s hodnotou CHSK nejvýše 300 mg/l nebo s hodnotou TOC nejvýše 100 mg/l. Tato voda se používá jako inokulum po odsazení usaditelných látek nebo po filtraci hrubým filtrem [1]
 - b) povrchová voda (tekoucí nebo stojatá) znečištěná městskými splašky
 - c) odsazený odtok z ČOV
 - d) voda odebraná pod místem vypouštění zkoušené vody, nebo voda, která obsahuje laboratorně kultivované mikroorganismy adaptované na zkoušenou vodu
 - e) komerčně dostupný očkovací materiál (inokulum)Jakost očkované ředící vody, inokula a práce analytika se kontroluje zkouškou s kontrolním roztokem směsi glukózy s kys. glutamovou. [1]
2. Odpadní vody, které jsou **silně kyselé nebo alkalické**, jejichž hodnoty pH po naředění vzorku zředovací vodou jsou menší než 6 nebo větší než 8, musí být zneutralizovány. K neutralizaci je možné použít NaOH, resp. HCl o vhodné koncentraci. Potřebné množství se zjistí alkalimetrickou, resp. acidimetrickou titrací zvláštního podílu vzorku. Extrémně alkalické, resp. kyselé vody musí být obvykle po úpravě pH ředěny inokulovanou zředovací vodou. Sraženina, která neutralizací někdy vzniká, se nebere na vědomí. [4, 5]
3. Vody **obsahující volný nebo vázaný chlor** musíme pro stanovení BSK_n nejdříve zbavit chloru a pak inokulovat. Volný a vázaný chlór ve vzorku se odstraňuje přidávkou potřebného objemu roztoku siřičitanu sodného. Dbá se na to aby siřičitan nebyl v nadbytku. [4, 5]
4. U vod **obsahujících toxické látky** v koncentracích, jejichž účinnost se projeví i po naředění vzorku, nelze stanovit správnou hodnotu BSK_n. Tyto případy musí být řešeny individuálně předběžnou úpravou vzorku, zvolenou podle druhu toxických látek. [4, 5]
5. **Látky reagující přímo s rozpuštěným kyslíkem** zvyšují výsledek stanovení. Rušivý vliv těchto látek se odstraní prodloužením doby mezi naředěním vzorku nebo mezi provzdušněním vzorku a fixací kyslíku v inkubační lázni určené ke stanovení kyslíku nultý den. V tomto případě se kyslík fixuje nebo měří až 1 hodinu po naředění nebo provzdušnění vzorku. (Týká se pouze silně znečištěných povrchových vod). [4, 5]

Poznámka [5]:

Průběh BSK může být ovlivněn nitrifikací. Litotrofní nitrifikační bakterie získávají energii oxidací amoniakálního a dusitanového dusíku podle následujících rovnic 1-3:



Celkem:



Aby stanovená hodnota BSK₅ skutečně odpovídala obecné definici BSK, tj. spotřebě kyslíku při rozkladu organických látek, a byla tak mírou pouze organického (biologicky rozložitelného) znečištění vod, je třeba použít jednoho z těchto způsobů odstranění vlivu nitrifikace:

- a) vyloučení nitrifikace početní korekcí výsledků stanovení

BSK_n se stanoví standardní zředovací metodou. Od takto stanovené hodnoty je třeba odečíst hodnotu kyslíku spotřebovaného při biochemické oxidaci amoniakálního dusíku a dusitanů na dusičnany.

- b) vyloučení nitrifikace pomocí inhibitorů nitrifikace

Při podmínkách stanovení BSK_n standardní zředovací metodou můžeme při inkubaci vzorku zamezit nitrifikaci přidávkou inhibitorů nitrifikace. Jako inhibitory nitrifikace je možno použít allylthiomocovinu nebo 2-chlor-6-(trichlormethyl)pyridin. Obě látky inhibují enzymy produkované mikroby rodu *Nitrosomonas*, avšak mikroby rodu *Nitrobacter* nejsou ovlivněny, a proto dusitaný přítomný ve vzorku mohou být oxidovány. Z hlediska spotřeby kyslíku při nitrifikaci je spotřeba na oxidaci dusitanů přítomných ve vzorku zanedbatelná, poněvadž obsah dusitanů ve vodách je obvykle velmi nízký a specifická spotřeba kyslíku na oxidaci dusitanů na dusičnany je asi 3krát menší než spotřeba kyslíku na oxidaci amoniakálního dusíku na dusitaný.

6. Stanovení mohou podstatně ovlivnit **nečistoty** ulpělé v inkubačních lahvích (zejména po jodometrickém stanovení kyslíku) a nečistoty ve vodě v miskách, umístěných v termostatu a sloužících jako vodní uzávěr lahviček (kyslíkovém). Veškeré sklo používané pro stanovení BSK_n musí být udržované ve vysoké čistotě [4,5].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Zadání: S předloženým vzorkem povrchové nebo odpadní vody proveďte stanovení BSK_n. Ředění vzorku odhadněte na základě hodnoty CHSK (tab. 1) s tím, že u dobře biologicky rozložitelných látek dosahuje BSK_n nejvýše 2/3 hodnoty CHSK.

Vzorky: povrchová voda (odběr - Dřevnice)
vlastní vzorek

Odběr, úprava a uchování vzorku před rozbořem [4]:

Pokud vzorek odebrané povrchové nebo odpadní vody **obsahuje hrubě dispergované látky**, je vhodné ho těchto látek zbavit a to ihned při odběru přelitím přes síto s otvory o straně nebo průměru 1 mm. Ke stanovení BSK_n se použijí vzorky homogenizované, odsazené nebo filtrované. O předběžné úpravě vzorků rozhoduje účel rozboru a charakter analyzované vody. [4]

Déle skladovaný (>24 h) vzorek již nemá smysl analyzovat. Vzorek do laboratoře se dopravuje v chladicí brašně a než bude zpracován se uchová při teplotě od 0°C do 4°C v naplněných a hermeticky uzavřených lahvích.

Chemikálie a roztoky [1]:

Destilovaná voda k přípravě roztoků a zředovací vody

Čerstvě připravená destilovaná voda se provzdušňuje přibližně 24 hodin, uchovává nasycena vzdušným kyslíkem a chrání před znečištěním. Zásobní skleněné láhve na destilovanou vodu se nesmí používat k jiným účelům (ani k přípravě zředovací vody).

Roztoky solí (již připraveny)

Fosforečnanový tlumivý roztok pH 7,2:

8,5 g KH_2PO_4 ; 21,75 g K_2HPO_4 ; 33,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1,7 g NH_4Cl se rozpustí v destilované vodě a doplní do 1000 ml.

Síran hořečnatý, roztok:

22,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v destilované vodě a doplní do 1000 ml.

Chlorid vápenatý, roztok:

27,5 g CaCl_2 se rozpustí v destilované vodě a doplní do 1000 ml.

Chlorid železitý, roztok:

0,25 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v destilované vodě a doplní do 1000 ml.

Zředovací voda (1 L)

K cca 800 ml destilované vody o teplotě 20°C **nasycené vzdušným kyslíkem** se přidá po 1 ml fosforečnanového tlumivého roztoku a roztoků MgSO_4 , CaCl_2 a FeCl_3 . Poté se doplní provzdušněnou destilovanou vodou po rysku. Připravuje se v den použití a kontroluje se slepým pokusem. Ředící voda se použije do 24 h po přípravě zbytek se vylije.

Pomůcky:

- Inkubační láhve - kyslíkové láhve tzv. kyslíkovky.
- Biologický termostat s nastavitelnou teplotou (20±1°C)
- Běžné laboratorní sklo na přípravu ředěných vzorků.
- Kyslíková elektroda CellOx (WTW) a Oximetr (WTW)

Pracovní postup:

DBEJTE NA VYSOKOU ČISTOTU VEŠKERÉHO LABORATORNÍHO SKLA !!!

Slepý pokus:

Zředovací vodou se naplní čtyři inkubační láhve, které se uchovají v termostatu spolu se vzorky a rozpuštěný kyslík se stanoví „n“ den. Rozdíl průměrů koncentrace kyslíku nultý a n den nesmí převyšovat 0,5 mg/l. Vyšší hodnota ukazuje na nedodržení předepsaných podmínek. Slepý pokus se připravuje současně se vzorky.

Vlastní stanovení [4, 5]:

- podzemní nebo říční vody (resp. vzorky s BSK₅ do 6 mg/l)*
 - vzorek vytemperujte na teplotu 20°C
 - vzorek musí být nasycen vzdušným kyslíkem (1,5 l cca 20 min intenzivního provzdušňování)

b) odpadní vody nebo biologicky čištěné splašky (resp. vzorky s BSK₅ nad 6 mg/l)

- vzorek vytemperujte na teplotu 20°C
- vzorek musí být nasycen vzdušným kyslíkem (1,5 l cca 20 min intenzivního provzdušňování)
- podle očekávané hodnoty BSK se vzorek připravuje v jednom nebo více ředěních (do 500 ml OB) podle tab. 1.

Tab. 1 Ředění vzorků vod ke stanovení BSK₅ a zaokrouhlování výsledků [5]

Ředění R		Rozsah stanovení BSK ₅ (mg/l)	CHSK _{Cr} (mg/l)	Zaokrouhlení výsledků (mg/l)
1	neředěný	0 - 6	0 - 10	0,1
0,5	2x	4 - 12	4 - 20	0,2
0,2	5x	10 - 20	10 - 30	0,5
0,1	10x	20 - 60	20 - 100	1
0,05	20x	40 - 120	40 - 170	2
0,02	50x	100 - 300	100 - 550	5
0,01	100x	200 - 600	200 - 900	10

1. pro sl. pokus a v připraveném vzorku se stanoví rozpuštěný kyslík **nultý den** – viz. měření koncentrace rozpuštěného kyslíku.
2. pro sl. pokus – 4 inkubační láhve,
pro každý vzorek a jeho ředění – 2 inkubační lahve (kyslíkovou).

Každá láhev se předem vypláchne asi 30 ml vzorku nebo zředěného vzorku. Inkubační lahve se uzavřou zátkou tak, aby uvnitř lahve nezůstaly žádné vzduchové bublinky. Poté se inkubační lahve uloží do termostatu. Inkubační lahve - kyslíkovky se ukládají zátkou dolů do plochých misek naplněných destilovanou vodou tak, aby jejich hrdla byla ponořena do vody, tvořící vodní uzávěr. Po inkubaci 5x nebo 7x 24 hodin ve tmě při teplotě 20°C se v inkubačních láhvích stanoví rozpuštěný kyslík. [5]

Měření koncentrace rozpuštěného kyslíku se provádí pomocí membránové kyslíkové elektrody Cellox (WTW) a přístroje Oximetr (WTW) podle pokynů vedoucího

Měření rozpuštěného kyslíku

3. Do vysoké kádinky o objemu cca 150 ml nadávkujte vzorek vody (**vodu nalévejte opatrně a pomalu po stěnách kádinky, tak aby nedocházelo k nežádoucímu provzdušnění**) a vložte magnetické míchadlo. Kádinku se vzorkem postavte na míchačku.
4. Kyslíkovou elektrodu ponořte do měřeného vzorku tak, aby její konec s membránou byl cca 6 cm pod hladinou vody poté zapněte míchání.
5. Po dosažení stabilního signálu si zaznamenejte hodnotu koncentrace kyslíku ve vzorku v mg/l
6. Elektrodu vytáhněte z měřeného vzorku a důkladně opláchněte destilovanou vodou. Měrnou nádobku vyprázdněte a vypláchněte destilovanou vodou.

Ukončení práce:

Inkubační lahvičky je nutné důkladně vyčistit následujícím postupem:

1. lahvičky (kyslíkovky) se důkladně mechanicky vyčistí a vymyjí pitnou vodou se saponátem
2. důkladně se vypláchnou pitnou vodou
3. poté se vypláchnou roztokem 1% HCl
4. a na závěr se důkladně vypláchnou destilovanou vodou a dají do sušárny na sklo

Výpočet a hodnocení [1,5]:

Platnost zkoušky pro neředěné vzorky:

koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vzorku po n-denní inkubaci byla nejméně 3 mg/l,

Platnost zkoušky pro ředěné vzorky (tzv. výběrová kritéria pro spotřebu kyslíku – rovnice 4)

$$\frac{c_1}{3} \leq (c_1 - c_2) \leq \frac{2 \cdot c_1}{3} \quad /4/$$

2. výpočet biochemické spotřeby kyslíku po n dnech (BSK_n) – rovnice 5 a 6

n-denní biochemická spotřeba kyslíku se vypočte podle rovnice:

a) neředěný vzorek $BSK_n = c_1 - c_2 \quad /5/$

b) ředěný vzorek

$$BSK_n = \frac{c_1 - c_2 - [c_{SL} \cdot (1 - R)]}{R} \quad /6/$$

kde c_1 a c_2 mají stejný význam jako v rovnici 4

c_1 koncentrace rozpuštěného kyslíku nultý den [mg/l]

c_2 koncentrace rozpuštěného kyslíku po n dnech (průměr dvou stanovení) [mg/l]

c_{SL} rozdíl obsahu rozpuštěného kyslíku mezi nultým a n dnem inkubace slepého pokusu – zředovací vody [mg/l]

R ředění - poměr objemu vzorku k objemu připravené směsi vzorku se zředovací vodou

Vyhodnocení: pomocí relevantních informačních materiálů [6] proved'te klasifikaci jakosti vámi analyzovaného vzorku vody

Literatura:

- [1] ČSN EN 1899-1 Jakost vod – Stanovení biochemické spotřeby kyslíku po n dnech (BSKn) – Část 1: Zředovací a očkovací metoda s přidavkem allylthiomocoviny, Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1999, Třídící znak 1899-1
- [2] ČSN EN 1899-2 Jakost vod Stanovení biochemické spotřeby kyslíku po n dnech (BSKn) – Část 2: Metoda pro neředěné vzorky Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1999, Třídící znak 1899-2
- [3] ČSN 75 7221 Jakost vod - Klasifikace jakosti povrchových vod. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1998, Třídící znak 757221
- [4] HORÁKOVÁ, Marta. *Analytika vody*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000, 283 s. ISBN 8070803916.
- [5] ŘEZNIČKOVÁ, Iveta, Jaromír HOFFMANN a Jan RŮŽIČKA. *Technologická cvičení z ochrany prostředí*. Vyd. 1. Zlín: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2000, 91 s. ISBN 8021417099.
- [6] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009, 579 s. ISBN 978-80-7080-701-9