INSO
19072
1st.Edition
2014

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۹۰۷۲
چاپ اول
۱۳۹۳

کیفیت آب - تعیین سینتیک اثرات مهارکنندگی رسوب، جامدات دیگر و نمونه‌های رنگی بر نورافشانی باکتری *ویبریوفیشری* (آزمون سینتیک باکتری‌های نورافشان)

Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)

ICS:13.060.60

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه-بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2 - International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« کیفیت آب – تعیین سینتیک اثرات مهارکنندگی رسوب، جامدات دیگر و نمونه- های رنگی بر نورافشانی باکتری ویبریوفیشری (آزمون سینتیک باکتری- های نورافشان)»

رئیس :	**سمت و/ یا نمایندگی**
داوری، کامبیز (دکترای میکروبیولوژی)	دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج
دبیر :	
آغه‌میری، اسرین (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان کردستان
اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
آغه‌میری، اوین (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	کارشناس
باغیانی، هما (لیسانس شیمی کاربردی)	اداره کل استاندارد استان یزد
جانی‌قربان، محترم (فوق لیسانس شیمی فیزیک)	اداره کل استاندارد استان اصفهان
شکوه فرد، ملیحه (دکترای میکروبیولوژی)	کارشناس
فلاح، مهین (کارشناس میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان خوزستان
یزدانی، ژیلا (فوق لیسانس شیمی فیزیک)	اداره کل استاندارد استان کردستان

فهرست مندرجات

عنوان		صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد		ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد		ج
پیش گفتار		ه
مقدمه		و
۱	هدف	۱
۲	دامنه کاربرد	۱
۳	مراجع الزامی	۱
۴	اصطلاحات و تعریف	۲
۵	اصول آزمون	۳
۶	مداخله‌گرها	۵
۷	واکنش‌گرها و مواد	۵
۸	وسایل لازم	۷
۹	نمونه‌برداری و پیش‌تصفیه نمونه‌ها	۷
۱۰	روش آزمون	۹
۱۱	ارزیابی	۱۰
۱۲	بیان نتایج	۱۳
۱۳	معیارهای اعتبارسنجی	۱۵
۱۴	گزارش آزمون	۱۵
پیوست الف (اطلاعاتی) دقت داده‌ها		۱۷
پیوست ب (اطلاعاتی) منحنی سینتیک نمونه‌های مختلف		۲۱
پیوست پ (اطلاعاتی) سری رقت		۲۲
پیوست ت (اطلاعاتی) کتاب‌نامه		۲۴

پیش‌گفتار

استاندارد "کیفیت آب - تعیین سینتیک اثرات مهارکنندگی رسوب، جامدات دیگر و نمونه‌های رنگی بر نورافشانی باکتری *ویبریوفیشری* (آزمون سینتیک باکتری‌های نورافشان)" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط سازمان ملی استاندارد ایران تهیه و تدوین شده و در سی و سومین اجلاس کمیته‌ملی استاندارد محیط زیست مورخ ۹۳/۴/۸ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان ملی استاندارد ایران، مصوّب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحوّلات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO 21338 : 2010, Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)

مقدمه

روشی که در این استاندارد آمده‌است، تغییر سینتیک باکتری‌های نورافشان است که در استاندارد ملی ایران- شماره ۹۰۴۰ مشخص‌شده است. این روش سینتیک، بر مشکلات ناشی از رنگ شدید و کدورت در نمونه‌ها، غلبه‌می‌کند. با این روش، دیگر به رسوب‌گذاری یا سانتریفوژ نمونه‌های کدر و یا تصحیح رنگ آن‌ها، همان‌طور که در استاندارد ملی ایران- شماره ۹۰۴۰ توضیح داده‌شده است، نیازی نیست.

این روش سینتیکی، از لومینومتر[1]هایی که قادر به توزیع باکتری‌های نورافشان در نمونه‌ها و اندازه‌گیری شدت نورافشانی در طی یک دوره‌ی زمانی است، استفاده می‌کند. در این روش، سوسپانسیون باکتریایی با نمونه در محفظه‌ی اندازه‌گیری لومینومتر، مخلوط و توزیع می‌شود. اتاقک‌های مناسب متعددی به‌صورت تجاری موجودند اما فقط تعداد کمی از آن‌ها قادر به خنک‌کردن محفظه‌های اندازه‌گیری تا $(۱ \pm ۱۵)^{\circ}C$، آن‌گونه که در استاندارد ملی شماره ۹۰۴۰ مشخص شده است، می‌باشند.

با این وجود، اگر سوسپانسیون باکتریایی و آزمایه‌ها در $(۱ \pm ۱۵)^{\circ}C$ در ممانعت‌کننده دمایی[2]، قبل از اندازه‌گیری و در طی مدت گرم‌خانه‌گذاری نگه‌داری شوند، درجه حرارت واقعی در طی زمان تماس، همان $(۱ \pm ۱۵)^{\circ}C$ است.

اندازه‌گیری‌های مشخص شده در این استاندارد را می‌توان با استفاده از باکتری‌های تازه تهیه شده[3]، منجمد خشک[4] یا سوسپانسیون خشک‌شده باکتری[5] انجام داد. آماده‌سازی‌های مختلف باکتریایی، بخصوص درحضور درحضور فلزات سنگین، می‌تواند نتایج متفاوتی دهد (استاندارد ملی ایران- شماره ۹۰۴۰). آزمایشگاه‌های مسؤول نتایج، فرصت انتخاب مناسب‌ترین روش آماده‌سازی باکتریایی بر اساس قضاوت کارشناس متخصص و اطلاعات مربوط‌به نمونه‌های مورد آزمون را دارند.

1 Luminometer
2 Thermo-block
3 Freshly prepared bacteria
4 Freeze-dried bacteria
5 Liquid-dried bacteria

کیفیت آب - تعیین سینتیک اثرات مهارکنندگی رسوب، جامدات دیگر و نمونه‌های رنگی بر نورافشانی باکتری *ویبریو فیشری*[1] (آزمون سینتیک باکتری‌های نورافشان)

هشدار- توصیه می‌شود کاربران این استاندارد با فعالیت‌های معمول آزمایشگاهی، آشنا باشند. این استاندارد، درصورت وجود مشکل ایمنی مرتبط با استفاده از آن، ادعایی در پرداختن به تمام مسائل ندارد. مسؤولیت برقراری شیوه‌های سلامت و ایمنی مناسب جهت اطمینان از انطباق با هرگونه شرایط نظارتی ملی به‌عهده کاربر است.

مهم- ضرورت مطلق دارد که آزمون‌های هدایت‌شده مطابق با این استاندارد ملی، توسط کارکنان مناسب آموزش‌دیده به عمل‌آید.

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین ویژگی روش تماس مستقیم سینتیک برای تعیین اثر مهارکنندگی سوسپانسیون رسوب و نمونه‌های جامد دیگر و هم‌چنین نمونه‌های مشکل‌ساز ملون یا کدر آبی بر نورافشانی باکتری دریایی *ویبریو فیشری* است (NRRL B-11177).

۲ دامنه کاربرد

این روش درموارد زیر کاربرد دارد:

الف) نمونه‌های رسوبی و سوسپانسیون آبی رسوبات (آب شیرین[2]، لب شور[3] و رسوبات آب دریا[4])

ب) پساب[5]ها (به‌خصوص کدر و رنگی)

ج) عصاره‌های آبی[6] خاک (به عنوان مثال محلول‌های حاصل از آب‌شویه[7]، خاک‌شُست[8]، صاف‌وخالص‌شده[9])، صاف‌وخالص‌شده[9])، پس‌ماند[10] جامد و مواد جامد دیگر (به‌خصوص کدر و رنگی)

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود.

---

1 *Vibrio fischeri*
2 Fresh water
3 Brackish
4 Seawater sediments
5 Effluent
6 Aqueous extract
7 Leachate
8 Eluate
9 Elutriate
10 Waste

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۹۰۴۰، کیفیت آب - تعیین اثر مهارکنندگی عوامل موجود در نمونه‌های آب بر نورافشانی باکتری *ویبریوفیشری* - قسمت۱: روش استفاده از باکتری‌های تازه تهیه‌شده

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۹۰۴۰، کیفیت آب - تعیین اثر مهارکنندگی عوامل موجود در نمونه‌های آب بر نورافشانی باکتری *ویبریوفیشری* - قسمت۲: روش استفاده از سوسپانسیون خشک‌شده باکتری

3-3 ISO 11348-3:2007, Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria

3-4 ISO 5667-16:1998, Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on biotesting of samples

3-5 ISO 5814, Water quality – Determination of dissolved oxygen - Electrochemical probe method

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می روند:

۴-۱

زمان تماس[1]

مدت زمان تماس بین یک ماده یا یک مورد با ماده یا موارد دیگر

یادآوری- زمان تماس در این آزمون، زمان دردسترس برای شاهد یا نمونه جهت تماس با باکتری آزمون است.

۴-۲

نمونه‌ی شاهد[2]

نمونه‌ای که در آزمایشگاه به‌منظور بررسی یا پایش وسیله، کارایی اندازه‌گیری و یا نظارت بر تغییرات در نمونه‌ی تحت بررسی به‌کار می‌رود.

۴-۳

1 Contact time
2 Control sample

ضریب تصحیح[1]

ضریب بدون بُعد جهت تصحیح داده‌ها برای شناخت تأثیرات اثرگذار مقادیرشان در اندازه‌گیری

یادآوری- در این آزمون، ضریب تصحیح، f_{kt} برای تصحیح شدت نورافشانی اولیه در نمونه به‌کار گرفته می‌شود.

۴-۴

مقدار پیک(قله)[2]

بیشینه‌ی سیگنال ثبت‌شده در پاسخ به یک محرک

یادآوری- در این آزمون، مقدار پیک همان بیشینه‌ی سیگنال ثبت‌شده است که بلافاصله بعد از تماس تمام باکتری‌ها با نمونه رخ می‌دهد.

۵-۴

نمونه‌ی مرجع[3]

هنگامی‌که اثر یا رفتار یک ماده از آزمون‌های قبلی (مواد مرجع)، شناخته‌شده و زمانی‌که این ماده در چارچوب یک سری آزمون به عنوان آزمایه مورد آزمایش قرارگرفته ، نمونه‌ی مرجع خوانده می‌شود.

یادآوری- به استاندارد ISO 5667-16:1998 مراجعه شود (بند ۳-۴).

۶-۴

آزمایه[4]

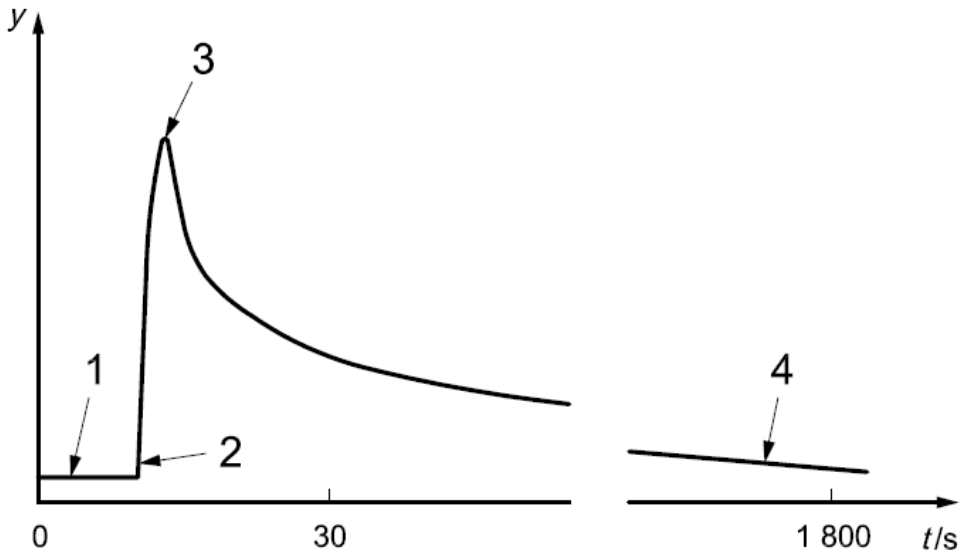
آزمایه ازطریق مراحل مختلف آماده‌سازی مختص نمونه و آزمون مانند حل‌کردن، یک‌نواخت‌سازی، رسوب‌زدایی، صاف‌کردن، خنثی‌کردن یا هوادهی، از نمونه تهیه می‌شود (بند ۳-۴).

۵ اصول آزمون

مهار نورافشانی کشت‌های *ویبریو فیشری* به‌صورت سینتیکی با دنباله‌روی نورافشانی کشت‌هایی که از ابتدای سنجش موجود بودند، اندازه‌گیری می‌شود. این امر توسط توزیع سوسپانسیون باکتری‌های نورافشان در نمونه‌ی داخل کووت[5] یا ظروف مناسب دیگر (مانند میکروتیتر پلیت[6]) که در موقعیت اندازه‌گیری درون لومینومتر موجودند، انجام می‌گیرد.

نورافشانی از لحظه‌ی توزیع سوسپانسیون باکتریایی در نمونه تا زمانی‌که به بیش‌ترین مقدار خود رسیده است و نه‌تنها در بیشینه‌ی مقدار شدت (مقدار پیک) که معمولاً در ثانیه پنجم مخلوط‌کردن رخ می‌دهد و بعد از زمان تماس min ۱۵ و min ۳۰ و یا به‌طور اختیاری min ۵، اندازه‌گیری و ثبت می‌شود (شکل ۱).

1 Correction factor
2 Peak value
3 Reference sample
4 Test sample
5 Cuvette
6 Microtiter plate



راهنما:

t زمان برحسب ثانیه

y واحد نور نسبی

۱ شروع اندازه‌گیری

۲ تزریق باکتری‌ها

۳ ثبت مقدار پیک از ۰s تا ۵s

۴ مخلوط کردن نمونه قبل از ثبت سیگنال در زمان ۳۰min

شکل ۱ – طرح نمودار کلی آزمون بر اساس سینتیک باکتری نورافشان

سوسپانسیون *ویبریوفیشری* توزیع شده و در محفظه‌ی اندازه‌گیری لومینومتر با نمونه مخلوط می‌شود.

معیار آزمون، کاهش نورافشانی است که در هر نقطه‌ی پایانی و در مقایسه با مقدار پیک و اعمال یک ضریب تصحیح f_{Kt} که از تغییرات شدت نمونه‌های شاهد در طی زمان درمعرض قرارگیری، اندازه‌گیری می‌شود. اثر مهارکنندگی نمونه به‌عنوان کم‌ترین رقت بی‌اثر (LID)[1] یا به‌عنوان غلظت مؤثر ٪۵۰ یا ٪۲۰ (EC_{20} یا EC_{50})[2]، به‌وسیله سری‌های رقت (به‌عنوان مثال همان‌طورکه در پیوست پ توضیح داده شده است) تعیین می‌شود. مقدار LID متمرکزترین بهر آزمون است که در آن مهار نورافشانی کم‌تر از ٪۲۰، آزمون می‌شود. برای سطوح بالاتر مهارکنندگی، ارتباط اثر رقت می‌تواند به‌صورت گرافیکی و یا توسط تجزیه و تحلیل آماری تعیین شود.

مهارکنندگی یک نمونه به‌صورت غلظت‌هایی که درمقایسه با نمونه شاهد نتایج کاهش نور ٪۲۰ و ٪۵۰ (EC_{20} و EC_{50}) داشته‌اند، بیان می‌شود. این مقدار در درون سری‌های رقت درون‌یابی می‌شود.

هیچ روش تصحیح اضافه‌ای جهت رنگ و کدورت موردنیاز نیست چون این عوامل به همان‌صورت در سراسر اندازه‌گیری، باقی می‌مانند.

1 Lowest ineffective dilution (LID)

2 Effective concentration (EC20 or EC50)

مهار در زمان‌های مختلف تماس و بازده غلظت‌های مختلف نمونه، داده‌های سینتیک سمی درباره‌ی نمونه را کامل می‌کند (مهار به‌صورت درصد در مقابل غلظت با متغیر زمان، بیان می‌شود) و قادر می‌سازد که در مورد ماهیت آلاینده‌های ایجاد شده، در صورت مقایسه با داده‌های موجود فرضیات ساخته شود (پیوست ب).

۶ مداخله‌گرها

مواد فرار و یا موادی که با آب رقیق‌کننده یا سوسپانسیون آزمون واکنش می‌دهند و یا در طول دوره آزمون حالت خود را تغییر می‌دهند ممکن است بر نتیجه تأثیر بگذارند و یا به تجدیدپذیری نتایج آزمون، زیان برسانند.

از آن‌جاکه اکسیژن برای نورافشانی زیستی موردنیاز است (کتاب‌نامه، بند ۱۸)، نمونه‌هایی با نیاز بالای اکسیژن (یا غلظت پایین اکسیژن)، ممکن است باعث کمبود مقدار اکسیژن شده و به‌عنوان مهارکننده عمل‌کنند. وجود مواد مغذی زیست‌تخریب‌پذیر در نمونه به راحتی می‌تواند موجب کاهش مستقل از آلاینده در تابش زیستی شود (کتاب‌نامه، بند ۱۹).

نمونه‌هایی با pH خارج از محدوده‌ی ۶ تا ۸٫۵ ، بر روی نورافشانی باکتری تاثیرگذار هستند (کتاب‌نامه، بندهای ۱۸ و ۲۰). نمونه را هنگامی‌که اثر سمیت pH مهم نیست، تنظیم کنید.

نظر به اینکه اندامگان[1] *ویبریوفیشری* مورد آزمون، یک باکتری دریایی است، آزمون نمونه‌های آب شور با روش استاندارد، اغلب منجربه تحریک اثرات نورافشانی زیستی می‌شود که می‌تواند اثرات مهارکنندگی را بپوشاند (بند ۳-۳ و پیوست ت).

غلظت نمک در نمونه‌ی اولیه، بیش از g/l ۳۰ سدیم‌کلراید و یا محتویات ترکیبات دیگر است که اسمولاریته[2] معادل می‌دهد ممکن است با افزودن عمدی[3] نمک مورد نیاز توسط آزمون منجر به بالارفتن فشار اسمزی شود. غلظت نهایی نمک در آزمونه‌ها بهتر است از اسمولاریته‌ی g/l ۳۵ محلول سدیم‌کلراید بیش‌تر نباشد تا از این اثرات جلوگیری شود.

۷ واکنش‌گرها و مواد

در حین آزمایش، تنها از واکنش‌گرها با درجه خلوص لازم شناخته‌شده و آب‌مقطر یا آب یون‌زدایی‌شده و یا آبی با خلوص معادل استفاده شود مگر این‌که نوع دیگری از واکنش‌گر یا مواد معرفی شود.

۷-۱ باکتری مورد آزمون

از یک سویه باکتری نورافشان متعلق به گونه *ویبریوفیشری* NRRL B- 11177 استفاده کنید.

سوسپانسیون‌های باکتری مورد استفاده برای اندازه‌گیری‌های سمیت، مطابق دستورالعمل استاندارد ملی ایران- شماره ۹۰۴۰ آماده می‌شوند. قبل از سنجش برای اندازه‌گیری غلظت، از سویه‌های سوسپانسیون ذخیره باکتری، سوسپانسیون را رقیق کنید (به‌عنوان مثال واریانت[4] B، بند ۳-۳).

---

1 Organism

۲ غلظت اسمزی

3 Spiking

4 Variant

۷-۲ محلول سدیم کلرید به‌عنوان رقیق‌کننده

۲۰g سدیم کلرید را در آب حل‌کنید و حجم آن‌را با آب به ۱l برسانید.

۷-۳ محلول سدیم هیدروکسید (NaOH)

محلول سدیم هیدروکساید را با غلظت ۱mol/l تهیه کنید.

۷-۴ هیدروکلریک اسید (HCl)

محلول هیدروکلریک اسید را با غلظت ۱mol/l تهیه کنید.

یادآوری- برای تنظیم pH ممکن است استفاده از اسیدها یا بازهای باغلظت بالاتر یا پایین‌تر ضروری باشد.

۷-۵ محلول جهت سوسپانسیون باکتری منجمدخشک

مواد تشکیل دهنده	مقدار (mg/l)
سدیم کلراید ($NaCl$)	۲۰
منیزیم کلراید با شش ملکول آب ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	۲٫۰۳۵
پتاسیم کلراید(KCl)	۰٫۳

مواد فوق را در آب حل‌کنید و حجم را با آب به ۱ l برسانید. محلول را در قسمت‌هایی از فریزر با دمای ۱۸°C- تا ۲۰°C- نگه‌داری کنید.

۷-۶ مواد مرجع

سه محلول مجزای مواد مرجع زیر را با رقیق‌کننده‌ی سدیم کلرید (بند ۶-۲) و بدون تنظیم pH آن جهت سوسپانسیون منجمد خشک باکتری، آماده‌کنید:

	مواد تشکیل دهنده	مقدار (mg/l)
الف)	۳ و ۵ دی‌کلروفنل ($DCP, C_6H_4OCl_2$)	۶٫۸
ب)	سولفات روی با هفت ملکول آب ($ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	۱۹٫۳۴
ج)	پتاسیم دی‌کرومات ($K_2Cr_2O_7$)	۱۰۵٫۸

غلظت در قسمت‌های الف تا ج فوق، تقریباً دو برابر مقادیر EC_{50} برای مواد مرجع مربوطه در استاندارد ISO 11348-3 (بند۳-۳) انتظار می‌رود. برای غلظت محلول‌های مواد مرجع برای باکتری‌های تازه کشت‌شده و یا سوسپانسیون باکتری خشک‌شده ، به استانداردهای مربوط مراجعه شود (بندهای ۳-۱ و ۳-۲).

یادآوری۱- ممکن است از آماده‌سازهای شیمیایی تجاری دردسترس با غلظت تعریف‌شده‌ی $ZnSO_4$ و $K_2Cr_2O_7$ برای تهیه‌ی محلول حاوی مواد مرجع استفاده‌نمود.

یادآوری۲- برای کسب اطلاعات بیش‌تر در مورد مواد مرجع، به کتاب‌نامه مراجعه‌شود (کتاب‌نامه، بند۲۲).

۸ وسایل لازم

تجهیزات معمول آزمایشگاهی و به‌ویژه وسایل زیر موردنیاز است:

۸-۱ **فریزر،** برای نگه‌داری باکتری‌های حفاظت‌شده.

۸-۲ **انکوباتور[1] یا یخچال،** جهت نگه‌داری محلول برای سوسپانسیون منجمد خشک باکتری در دمای $(۴ \pm ۳)^{\circ}C$.

۸-۳ **ترموستات کنترلی ممانعت‌کننده دمایی،** برای نگه‌داری آزمایه و سوسپانسیون باکتری *ویبریوفیشری* در دمای $(۱۵ \pm ۱)°C$. توصیه می‌شود در یک آزمون، بیشینه‌ی تغییرات دمایی $\pm ۰٫۳°C$ باشد.

۸-۴ **لومینومتر،** مجهز به دست‌کم یک توزیع‌کننده باشد (کم‌ترین مقدار حجم تزریق آن ۰٫۲ml باشد).

این ابزار باید قادر به اندازه‌گیری و ثبت نورافشانی به‌طور مداوم حداقل به مدت ۵s در فواصل ۰٫۲s یا کوتاه‌تر، باشد. تزریق و ثبت باید به‌طور هم‌زمان انجام شود.

۸-۵ **لوله‌های آزمایش، کووت‌ها، پلیت‌های آزمون** یا هر **ظرف آزمون** مناسب دیگر که از مواد شیمیایی بی‌اثر ساخته شده و متناسب با لومینومتر انتخابی باشد.

۸-۶ **pH‌سنج.**

۸-۷ **زمان‌سنج.**

۸-۸ **پی‌پت پیستون‌دار،** گنجایش اسمی ۱۰۰µl تا ۱۰۰۰µl، استاندارد ISO 8655-2 (کتاب‌نامه، بند ۳).

۸-۹ **مخلوط‌کن،** به‌طور مثال مخلوط‌کن گردابی(ورتکس) برای مخلوط‌کردن نمونه‌ها قبل از اندازه‌گیری

۸-۱۰ **هدایت‌سنج.**

۸-۱۱ **حس‌گر اکسیژن،** همان‌طور که در استاندارد ISO 5814 (بند ۳-۵) آمده است.

۸-۱۲ **الک،** اندازه‌ی اسمی چشمه‌های آن ۲mm باشد، استاندارد ISO 565 (کتاب‌نامه،بند۱).

۹ نمونه‌برداری و پیش‌تصفیه‌ی نمونه

۹-۱ نمونه‌برداری

---

۱ Incubator دستگاه قابل تنظیم دما جهت رشد و نگه‌داری ریزاندامگان

نمونه‌ها را در ظروف تمیز و بی‌اثر از نظر شیمیایی همان‌طور که در استاندارد ISO 5667-16 (بند ۳-۴) آمده‌است، قراردهید. ظروف را کاملاً پرکرده و درب‌بندی کنید. نمونه‌ها را روی یخ یا در یک یخچال یا جعبه‌ی خنک‌کننده در دمای $2^{\circ}C$ تا $5^{\circ}C$ قرار داده و درصورت امکان بلافاصله پس‌از جمع‌آوری، مورد آزمون قراردهید. درصورت لزوم نمونه‌ها را در دمای $2^{\circ}C$ تا $5^{\circ}C$ در تاریکی برای حداکثر زمان 48 h نگه‌داری کنید. اگر نمونه‌ها باید منجمد شود، آن‌ها را در دمای $(-18)^{\circ}C$ یا پایین‌تر در تاریکی تا کم‌تر از ۲ ماه نگه‌داری نمایید.

نمونه‌های فریز شده را بعد از آب شدن در حمام آب، بلافاصله آماده و اندازه‌گیری نمایید. برای ذخیره‌سازی طولانی‌مدت، ممکن است نمونه‌ها را انجماد خشک نموده و در تاریکی در دمای اتاق نگه‌داری کرد. از مواد شیمیایی به‌عنوان نگه‌دارنده استفاده نکنید. تنظیم pH و افزودن نمک را درست قبل از آزمون، انجام دهید.

۲-۹ آماده‌سازی نمونه

نمونه‌ها را الک نموده تا هرگونه ماده‌ی درشتی (مانند ریشه‌ی گیاهان و اجزای بزرگ‌تر از 2mm) از نمونه‌ها جداشود.

نمونه‌های رسوبی را در آب (مثلا ٪۲۰ کسر جرمی) با تکان‌دادن شدید (ورتکس‌کردن[1]) به‌منظور به‌دست‌آوردن سوسپانسیون‌های یک‌نواخت، معلق کنید (کتاب‌نامه، بند ۲۲). هم‌چنین در صورتی که سوسپانسیون‌ها درتمام طول اندازه‌گیری یک‌نواخت بمانند، می‌توان کسرجرمی بالاتر از ٪۲۰ را اندازه‌گیری کرد.

غلظت اکسیژن را در تمامی نمونه‌ها و سوسپانسیون‌های آبی نمونه، اندازه‌گیری کنید. غلظت اکسیژن بیش از 3mg/l برای آزمون موردنیاز است. اگر غلظت اکسیژن نمونه‌ی رقیق‌نشده کم‌تر از این مقدار باشد، می‌توان از روش‌های مناسب برای اکسیژنه‌کردن نمونه مانند هوادهی یا تکان‌دادن، استفاده نمود.

pH را در تمامی نمونه‌ها و سوسپانسیون‌های آبی نمونه، اندازه‌گیری کنید. اگر pH بین ۶ و ۸٫۵ باشد، نیاز به هیچ تنظیمی نیست. تنظیم مقدار pH با این‌حال، ممکن است ماهیت نمونه را تغییر دهد. از طرف دیگر، pH نمونه و pH سری آزمون به‌دلیل قابلیت بافری[2] محیط‌کشت، می‌تواند متفاوت باشد. ممکن است لازم باشد که آزمون‌ها را هم با تنظیم pH و هم بدون تنظیم pH نمونه‌ها، انجام داد.

درصورت لزوم، pH نمونه‌ها را به‌وسیله‌ی افزودن هیدروکلریک اسید (کتاب‌نامه، بند۶-۴) یا محلول سدیم هیدروکسید (کتاب‌نامه، بند ۶ -۳)، تنظیم کنید. بسته به هدف آزمون، pH را می‌توان تا ۰٫۲ ± ۷ یا بالاتر از ۰٫۲ ± ۸٫۵ و یا پایین‌تر از ۰٫۲ ± ۶ تنظیم نمود. غلظت هیدروکلریک اسید یا محلول سدیم هیدروکسید را به‌گونه‌ای انتخاب کنید که حجم اضافه شده بیش‌تر از ٪۵ حجم کل نباشد.

۲۰g سدیم کلراید به‌ازای هر لیتر به نمونه و یا نمونه‌ی خنثی‌شده، اضافه نمایید.

برای نمونه‌های آب شور، به استاندارد ISO 11348-3:2007 و پیوست ت مراجعه کنید.

---

1 Vortexing

۲ Buffer capacity اندازه‌گیری کمی مقاومت محلول بافر به تغییرات pH.

۱۰ روش آزمون

۱-۱۰ آماده‌سازی اولیه

۱-۱-۱۰ آماده‌سازی محلول‌های آزمون

نمونه‌های مرجع را مطابق بند ۶-۶ آماده کنید. هر سویه از باکتری‌های آزمون را بعد از دریافت نمونه‌ها، با هر سه ماده‌ی مرجع آزمایش کنید. حداقل یکی از سه ماده‌ی مرجع را با هر ویال سوسپانسیون ذخیره، دوباره آزمایش کنید.

نمونه‌ها را مطابق بند ۸-۲ آماده کنید. در اولین مجموعه از لوله‌های آزمایش (بند ۷-۵)، سری‌های رقت نمونه، نمونه‌ی مرجع (بند ۶-۶) و شاهد (بند ۶-۲) مورد نیاز را آماده کنید.

به‌صورت ردیفی، نمونه‌ها را رقیق کنید. رقت‌ها را در لوله‌های جداگانه بسازید و آن‌ها را به کووت یا پلیت‌های اندازه‌گیری منتقل نمایید. به‌طور معمول، در این آزمون، حجم‌های معادل از سوسپانسیون آزمون و نمونه (یا نمونه‌ی رقیق‌شده) با هم مخلوط شده و سطح رقت آزمون درون سری‌های $D \geq 2$ قرار می‌گیرد.

رقت حداقل که می‌تواند به‌نسبت ۱ در ۱٫۲۵ آزمون شود، با مخلوط‌کردن ۴حجم از نمونه با ۱حجم از سوسپانسیون آزمون (مثلاً ۸۰۰µl نمونه با ۲۰۰µl سوسپانسیون آزمون) به دست می‌آید. مقدار D متناظر با ۱ است. برای این مقدار D، یک سویه‌ی اضافه به‌غیر از شاهد، موردنیاز است که با اضافه‌کردن ۲۰۰µl از سوسپانسیون آزمون به ۸۰۰µl محلول سدیم‌کلرید، ساخته‌می‌شود (پیوست پ).

لوله‌های آزمایش حاوی محلول سدیم‌کلرید (بند ۶-۲) برای شاهدها، نمونه‌های مرجع (بند ۶-۶)، نمونه‌ها (بند ۸-۲) و نمونه‌های سری رقت (پیوست پ) را در دمای $(۱۵ \pm ۱)^{\circ}C$ نگه‌داری نمایید.

شرایط انجام آزمون را طوری تنظیم نمایید که بیش‌ترین مقدار تغییرات دمایی در ممانعت‌کننده دمایی در یک آزمون، بیش‌تر از $۰٫۳^{\circ}C \pm$ نباشد.

۲-۱-۱۰ آماده‌سازی سوسپانسیون‌های آزمون

سوسپانسیون ذخیره باکتریایی نورافشان را برای آزمون برطبق دستورالعمل‌ها برای باکتری‌های تازه کشت شده مطابق استاندارد ملی ایران-شماره ۱-۹۰۴۰، سوسپانسیون خشک شده مطابق استاندارد ملی ایران-شماره ۲-۹۰۴۰ یا منجمد خشک مطابق استاندارد ISO 11348-3 آماده کنید.

سوسپانسیون مورد استفاده در آزمون سینتیک را آن‌چنان‌که مشخص شده، آماده کنید برای مثال در استاندارد ISO 11348-3:2007، (بند ۸-۳-۳)، واریانت B، جایی‌که در آن سوسپانسیون آزمون در خارج از لوله‌های آزمایش تهیه می‌شود.

قبل از شروع آزمون سوسپانسیون باکتریایی بازسازی‌شده را با محلول (بند۶-۵) جهت به‌دست آوردن سوسپانسیون آزمون، رقیق‌کنید.

سوسپانسیون آزمون باکتریایی نورافشان (با غلظت سلولی تقریبی دو میلیون ۲×۱۰^{۶}cells/ml) را جهت اندازه‌گیری در دمای $(۴ \pm ۳)^{\circ}C$ نگه‌داری نمایید. سوسپانسیون بعد از نگه‌داری در یخچال به‌مدت حداقل

۳۰min آماده است و مادامی‌که معیارهای اعتبار بیان شده برای اهداف آزمون در بند ۱۲ را برآورده‌کند، می‌تواند استفاده شود.
قبل از شروع اندازه‌گیری، سوسپانسیون آزمون را در دمای (۱ ± ۱۵) °C به‌مدت حداقل ۳۰min نگه‌داری نمایید.

۱۰-۲ روش آزمون

مراقب باشید آزمون‌هایی را که دو یا سه بار در سطح رقت تکرار می‌شوند، در دمای آزمون (۱ ± ۱۵) °C انجام دهید.
حجم توزیع را از ۲۰۰µl تا ۵۰۰µl (معادل حجم نمونه) تنظیم نمایید و توزیع نخست را با سوسپانسیون آزمون باکتریایی *ویبریوفیشری* آغاز نمایید.
نمونه‌ها را به‌خوبی مخلوط نموده و حجم µl(۵۰۰ - ۲۰۰) از هر نمونه‌ی به خوبی یک‌نواخت شده را توسط پی‌پت بسته به وسیله مورد استفاده، در چاهک‌های پلیت میکروتیتر یا کووت لومینومتر قرار دهید. اگر نمونه حاوی ذرات بزرگی بود، با برش‌دادن نقطه‌ی تیز نوک پی‌پت، عملیات پی‌پت‌کردن را می‌توان تسهیل بخشید. انواع پی‌پت‌های نوک‌پهن نیز به‌طور تجاری دردسترس هستند.
کووت نمونه (یا پلیت میکروتیتر) را در لومینومتر قرار داده و اجرای آزمون را با توزیع سوسپانسیون باکتریایی *ویبریوفیشری* در درون کووت شروع کنید. بیشینه مقدار نورافشانی سوسپانسیون آزمون را در 5s اول تماس، تعیین و ثبت نمایید (دست‌کم ۵ بار اندازه‌گیری در ثانیه). بیشینه شدت نورافشانی، مقدار پیک - I_p - است.
بلافاصله بعد از اندازه‌گیری، کووت را به انکوباتور برگردانده وکووت بعدی را اندازه‌گیری کنید. این روال را برای هر نمونه و شاهد تکرار کنید. هنگامی‌که پلیت میکروتیترخوان استفاده می‌شود، آزمایش را روی سری رقت‌های آزمون و شاهد بلافاصله قبل از انتقال پلیت به انکوباتور انجام دهید. کووت‌ها را در طی گرم‌خانه‌گذاری در دمای (۱ ± ۱۵) °C نگه‌داری کنید.
بعد از min (۵، ۱۵ و۳۰) به صورت اختیاری، شدت نورافشانی (I_5 ، I_{15} ، I_{30}) را تعیین و ثبت نمایید.
نمونه‌ها را قبل‌از هر اندازه‌گیری به‌صورت دستی مخلوط کنید. این روال را برای هر نمونه و شاهد تکرارکنید.
بازه‌های۳۰ثانیه‌ای بین نمونه‌ها به‌جهت این‌که برای خواندن و تعویض کووت‌ها زمان کافی ایجاد شود، مناسب یافت شده است.

۱۱ ارزیابی

۱۱-۱ اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های نورافشان

با استفاده از معادله شماره (۱) و بر اساس اندازه‌گیری شدت نورافشانی در زمان‌های تماس min (۵، ۱۵ یا ۳۰) ضریب تصحیح - f_{kt} - را محاسبه نمایید. این ضریب برای تصحیح مقادیر اولیه‌ی - I_p - مربوط به تمامی آزمایه‌ها، می‌باشد قبل از این‌که بتوان از آن‌ها به‌عنوان مقادیر مرجع برای تعیین کاهش نورافشانی وابسته به آب استفاده کرد.

معادله (۱)
$$f_{kt} = \frac{Ikt}{Ip}$$

که در آن

I_{kt} شدت نورافشانی در نمونه‌ی شاهد بعد از زمان تماس min (۵، ۱۵ یا ۳۰) برحسب واحد نسبی نورافشانی.

I_p بیشینه شدت نورافشانی (مقدار پیک) سوسپانسیون شاهد آزمون بلافاصله بعد از توزیع باکتری‌ها در نمونه ، برحسب واحد نسبی نورافشانی

ضریب تصحیح میانگین $\bar{f}_{kt}$ را محاسبه نمایید انحراف از میانگین تکرارهای منفرد را بیابید ، با استفاده از فرمول شماره (۲) به یک رقم قابل‌توجه برحسب درصد بیان کنید.

معادله (۲) $\left[\frac{(\bar{f}_{kt} \pm f_{kt,i})}{\bar{f}_{kt}}\right] \times ۱۰۰$

که در آن $f_{kt,i}$ یکی از دو مقدار منحصر به فرد ضریب تصحیح است.

مقدار تصحیح‌شده‌ی I_p را برای کووت‌های آزمایه، I_{ct} (مقدار تصحیح‌شده شدت پیک) برحسب معادله شماره (۳) محاسبه نمایید.

معادله (۳) $I_{ct} = I_p \cdot \bar{f}_{kt}$

که در آن

$\bar{f}_{kt}$ مقدار میانگین $f_{kt,i}$ است.

I_p بیشینه شدت نورافشانی (مقدار پیک) سوسپانسیون آزمون بلافاصله پس از توزیع باکتری‌ها در نمونه، برحسب واحد نسبی نورافشانی I_t - I_{ct}

اثر مهارکنندگی آزمایه را بعد از زمان‌های تماس min (۵، ۱۵ یا ۳۰) محاسبه نمایید - H_t - برحسب درصد با استفاده از معادله شماره (۴) بیان می‌شود:

معادله (۴) $H_t = \frac{(Ict - It)}{Ict} \times ۱۰۰$

که در آن

I_{ct} مقدار تصحیح‌شده پیک شدت است که بر اساس معادله (۳) محاسبه می‌شود.

I_t شدت نورافشانی آزمایه بعد از زمان تماس min (۵، ۱۵ یا ۳۰) برحسب واحدهای نسبی نورافشانی

میانگین اثر مهارکنندگی $\bar{H}_t$ را برای هر سطح رقت، محاسبه و به‌صورت درصد بیان نمایید. اختلاف حسابی را محاسبه کنید. نقاط درصد به یک رقم قابل‌توجه بیان می‌شود

$\bar{H}_t$ (%) – Ht,i (%)

که در آن

Ht,i هر کدام از دو مقدار منفرد اثرات مهارکنندگی حداقل یک آزمایه

$\bar{H}_t$ مقدار میانگین اثر مهارکنندگی

۲-۱۱ محاسبه‌ی مقادیر EC

با استفاده از آنالیز رگرسیون خطی[1] یا غیرخطی[2] استاندارد مناسب رابطه‌ی بین اثر مهارکنندگی و غلظت را برای هر زمان تماس محاسبه کنید (کتاب‌نامه، بند ۱۹).

برای ارزیابی رابطه‌ی بین اثر و غلظت بر اساس فن رگرسیون خطی، مقدار گاما، Γ_t، (نسبت نور منحرف‌شده به مقدار نور باقی‌مانده در زمان t) را برای هر سطح رقت آزمایه بعد از زمان تماس min (۵، ۱۵ یا ۳۰)، با استفاده از معادله شماره (۵) محاسبه نمایید:

معادله (۵)
$$\Gamma t = \frac{\overline{H}_{\mathrm{t}}}{\left(۱۰۰ - \overline{H}_{\mathrm{t}}\right)}$$

که در آن $\overline{H}_{\mathrm{t}}$ میانگین H_t است که با معادله (۴) به‌دست می‌آید.

یادآوری- وقتی برای یک غلظت معین مهار نورافشانی زیستی برابر ٪۰ یا ٪۱۰۰ باشد، مقدار گاما قابل محاسبه نخواهد بود. بنابراین، معمولاً فقط مقادیر H_t بین ٪۱۰ و ٪۹۰ در محاسبه رابطه‌ی اثر- غلظت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

رابطه‌ی اثر- غلظت در یک زمان تماس داده شده اغلب می‌تواند توسط یک معادله‌ی خطی توصیف شود:

معادله (۶)
$$lg\ c_t = b\ lg\Gamma_t + lg\ a$$

که در آن

c_t جزئی از نمونه آب یا رسوب موجود در آزمایه برحسب درصد

Γ_t مطابق معادله شماره ۵

b مقدار شیب خط توصیف شده

$lg\ a$ مقدار عرض از مبدأ خط توصیف شده (طول از محور)

با استفاده از روش استاندارد حداقل مجذورات[3] به‌وسیله‌ی رگرسیون آماری، مقدار EC_{20} و EC_{50} را با حدود اطمینان توضیح داده شده، محاسبه کنید . در این معادله عوامل به شرح زیر می‌باشند:

$c_t = EC_{20t}$ در $\Gamma t = ۰/۲۵$

$c_t = EC_{50t}$ در $\Gamma t = ۱/۰۰$

برای آنالیزهای رگرسیون غیرخطی، مدل‌های متفاوتی در بسته‌های نرم‌افزاری آماری و گرافیکی موجود است. آن‌ها مشخصاً بر توابع توزیع نرمال (به‌عنوان مثال آنالیز پروبیت[4]) مبتنی بر توزیع لجستیک (به‌عنوان مثال آنالیز لاجیت[5]) و یا توزیع وایبل (به‌عنوان مثال آنالیز وایبل[6]) مبتنی هستند. اثر مهارکنندگی محاسبه‌شده H_t مستقیماً می‌تواند برای تخمین پارامترهای مؤثر در رابطه‌ی غیرخطی اثر- غلظت، مورد

1 Linear regression analysis
2 Non-linear regression analysis
۳ Least-square روشی برای محاسبه ضریب زاویه خط که در آن خطی به نقاط برازانده می‌شود که حداقل فاصله را از آن خط داشته‌باشند
4 Probit analysis
5 Logit analysis
6 Weibull analysis

استفاده قرارگیرد (کتاب‌نامه، بند۱۹) اگر یک منحنی قادر به گردکردن محدوده جفت مقادیر نباشد، مقادیر EC با استفاده از سیستم هماهنگ لگاریتمی[1] به‌صورت گرافیکی می‌تواند تخمین زده شود.

۱۲ بیان نتایج

نتایج را مطابق مثال جدول (۱) گزارش کنید.

1 Logarithmic coordinate system

جدول (۱) - مثالی از ارزیابی آزمون- نمونه : سوسپانسیون رسوبی رودخانه، ۵۰ g/l

شاهد						
سویه شاهد	سطح رقت D	مقادیر اندازه‌گیری‌شده		$f_{k30}=I_{k30}/I_p$	$\bar{f}_{k30}$	صحت آزمون انحراف میانگین [b] $\bar{f}_{k30}$ %
		I_p	I_{k30}			
۱	۲[a]	۱۳۹۳	۱۰۲۵	۰/۷۳۵۸	۰/۷۳۸۱	۰/۳۱
۲		۱۳۹۰	۱۰۲۹	۰/۷۴۰۳		

آزمون								
سویه آزمون	سطح رقتD	مقادیر اندازه‌گیری‌شده		Ic_{30}	% H_{30}	$\bar{H}_{30}$	ارزیابی آزمون انحراف از میانگین [c] امتیاز٪	Γ_{30}
		I_p	I_{30}					
۱	۲	۲۴۶	۷/۱	۱۸۱/۶	۹۶/۱	۹۵/۵۵	۰/۵	۲۱/۴۶۰
۲		۲۲۸	۸/۴	۱۶۸/۳	۹۵/۰			
۳	۴	۴۰۳	۱۳/۲	۲۹۷/۴	۹۵/۶	۹۵/۴۴	۰/۱	۲۰/۹۲۰
۴		۳۶۹	۱۳/۷	۲۹۲/۳	۹۵/۳			
۵	۸	۶۴۰	۶۶	۴۷۲/۴	۸۶/۰	۸۵/۱۵	۰/۹	۶/۴۹۲
۶		۶۴۶	۷۵	۴۷۶/۸	۸۴/۳			
۷	۱۶	۸۹۷	۲۸۰	۶۶۲/۰	۵۷/۷	۵۴/۸۰	۲/۹	۱/۳۰۵
۸		۸۹۳	۳۱۷	۶۵۹/۱	۵۱/۹			
۹	۳۲	۱۰۸۹	۵۶۲	۸۰۳/۷	۳۰/۱	۲۹/۶۴	۰/۴	۰/۴۹۴
۱۰		۱۰۶۴	۵۵۶	۷۸۵/۳	۲۹/۲			
۱۱	۶۴	۱۲۲۵	۷۴۰	۹۰۴/۱	۱۸/۲	۱۶/۰۸	۲/۱	۰/۲۰۷
۱۲		۱۱۸۸	۷۵۴	۸۷۶/۸	۱۴/۰			
۱۳	۱۲۸	۱۳۱۱	۸۶۳	۹۶۷/۶	۱۰/۸	۸/۶۱	۲/۲	۰/۰۹۴
۱۴		۱۲۶۱	۸۷۱	۹۳۰/۷	۶/۴			
ماده مرجع								
۱۵	mg/l DCP۳/۴	۹۶۶	۲۹۶	۷۱۳/۰	۵۸/۵	۵۷/۴۲	۱/۱	۱/۳۴۸
۱۶	یا ۲/۲ mg/ l Zn یا ۱۸/۷ mg/l Cr	۹۲۵	۲۹۸	۶۸۲/۷	۵۶/۳			

یادآوری۱ - در این مثال، پایین‌ترین مقدار D موردآزمون، که در آن میانگین اثر مهاری٪ ۲۰ > H_{30}، LID_{lb} = ۶۴

یادآوری۲ - در این مثال، EC_{20} = ۹۰۵ mg/l ؛ EC_{50} = ۳۴/۲ g/l (حداقل مجذورات آماری استاندارد)

یادآوری۳ - سطح رقت D = ۲ و D = ۴ از محاسبات، رد شد.

a به پیوست پ مراجعه‌کنید.

b برای سویه شاهد، انحراف از میانگین f_{k30} توسط اختلاف‌حسابی از پراکنش موازی میانگین، تقسیم بر میانگین بیان‌شده برحسب٪ (فرمول ۲) تعیین می‌شود.

c برای سویه آزمون، انحراف ازمقادیر H_{30} (برحسب ٪) اندازه‌گیری‌های موازی از میانگین به‌صورت اختلاف حسابی هرمقدار H_{30} (برحسب ٪) از میانگین $\bar{H}_{30}$ (برحسب ٪) محاسبه می‌شود (٪امتیازها نامیده‌می‌شود).

مدت زمان آزمایش را گزارش دهید.
مقادیر EC_{20},EC_{50} و روش نتیجه‌گیری این مقادیر را گزارش دهید.
کم‌ترین مقدار D آزمون‌شده‌ی متناظر با اثر مهارکنندگی، را گزارش دهید، H_{30}< ٪۲۰ ،LID_{lb} (استاندارد ISO 11348-3:2007 و پیوست ب).
روش آماده‌سازی باکتریایی مورد استفاده را گزارش دهید.

۱۳ معیارهای اعتبارسنجی

آزمون در صورتی معتبر است که :
الف) مقدار $\bar{f}_{Kt}$ برای ۳۰ min گرم‌خانه‌گذاری، بین ۰٫۶ و ۱٫۸ باشد.
ب) مقدار I_p (مقدار پیک) نمونه، بیش‌تر از ٪۵ I_p نمونه‌ی شاهد باشد.
ج) مقادیر تعیین‌شده در اندازه‌گیری موازی برای نمونه‌های شاهد و نیز برای آزمایه‌ها که در آن به‌ترتیب مقادیر LID_{lb}، EC_{20} یا EC_{50} تعیین می‌شود، بیش از ٪۳ انحراف از میانگین نداشته باشد. (به جدول (۱) و زیرنویس c مراجعه شود).
به‌دلیل وجود روش‌های مختلف آماده‌سازی باکتریایی (انجماد خشک، سوسپانسیون‌خشک شده و تازه‌تهیه شده) مقادیر مختلف EC_{50} با مواد شیمیایی مرجع، به کاربران توصیه می‌شود که معیارهای اعتبارسنجی را برای آماده‌سازی‌های باکتریایی انجام دهند.
برای سویه باکتریایی منجمد خشک دریافتی سه ماده‌ی مرجع (بند ۶-۶) در غلظت‌های زیر، بعد از ۳۰min زمان تماس سبب ٪۲۰ تا ٪۸۰ مهار در سوسپانسیون آزمون نهایی می‌شوند (به‌طور جداگانه کنترل شود که محلول‌ها خنثی نشده باشند) :
الف) ۳٫۴ mg/l ، ۳ و ۵ دی کلروفنل
ب) ۲٫۲ mg/l Zn^{2+} (معادل سولفات روی با هفت مولکول آب)
ج) ۱۸٫۷ mg/l Cr^{4+} (معادل پتاسیم دی‌کرومات)
یکی از این سه ماده‌ی مرجع (بند ۶-۶) (محلول خنثی‌نشده)، در آزمون‌های موازی هر ویال سوسپانسیون ذخیره بازسازی شده برای آزمون واقعی (بند ۲-۹) ، باعث ٪۲۰ تا ٪۸۰ مهار در ۳۰min بعد از زمان تماس می‌شود.

۱۴ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دست‌کم شامل اطلاعات زیر باشد:

۱-۱۴ روش آزمون مورد استفاده همراه با ارجاع به این استاندارد ملی؛

۲-۱۴ شناسایی (تعیین هویت) نمونه شامل نمونه‌برداری، زمان و شرایط نگه‌داری؛

۳-۱۴ pH و غلظت اکسیژن برحسب (mg/l یا درصداشباع) نمونه‌ی اصلی آب یا سوسپانسیون آبی نمونه‌ی رسوب قبل از آزمون؛

۴-۱۴ پیش‌تیمار نمونه، درصورت وجود، به‌عنوان مثال pH قبل و بعد از تنظیم؛

۵-۱۴ آماده‌سازی باکتریایی؛

۶-۱۴ منبع باکتری، شماره سویه، تاریخ دریافت و تاریخ انقضا؛

۷-۱۴ دمای نگه‌داری باکتری؛

۸-۱۴ بیان نتایج مطابق با بند ۱۱ جدول (۱)؛

۹-۱۴ تمام جزییات عملیاتی که در این استاندارد ملی نیامده یا به‌صورت اختیاری درنظر گرفته شده است، همراه با جزییات هرگونه واقعه‌ای که ممکن است برروی نتایج آزمون تاثیرگذار باشد؛

۱۰-۱۴ نتایج آزمون با مواد مرجع برای سویه باکتریایی و آزمون واقعی.

۱۱-۱۴ تاریخ انجام آزمون؛

۱۲-۱۴ نام و نام‌خانوادگی و امضا آزمون‌کننده.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

دقت داده ها

برای ارزیابی کاربردی بودن روش آزمون سمیت نمونه‌های رنگی و کدر، روشی بین آزمایشگاهی در آوریل ۲۰۰۷ سازماندهی شده است. هشت آزمایشگاه در این مقایسه شرکت داشتند. شرکت‌کنندگان، نتایج اندازه‌گیری‌ها را با استفاده از دو وسیله مختلف گزارش دادند.

الف- ۱ نمونه‌ها

چهار نمونه‌ی زیر برای شرکت‌کنندگان فرستاده شد:

الف) V1 : نمونه آب سنتزی، آلوده‌شده عمدی[1] با ۲۰mg/l از ۳ و۵ دی‌کلروفنل(ماده‌ی مرجع سمی)

ب) V2: نمونه‌ی آب رنگی رودخانه (غیرسمی)

ج) S1: نمونه‌ی رسوبی (منجمد خشک)، رسوب رودخانه از یک چوب‌بری قدیمی دریافت شده است (سمی)

د) S2: نمونه‌ی رسوبی (منجمد خشک)، رسوب رودخانه‌ی تمیز (غیرسمی)

نمونه‌ها آماده‌سازی شدند و یک‌نواختی‌شان در مرکز تحقیقات زیست‌محیطی فنلاند غربی و نیز در آزمایشگاه Kokkola بررسی شد. قبل از آزمون، نمونه‌های S_1 و S_2 با مخلوط‌سازی ۰٫۵g رسوب منجمد خشک و ۱۰ml محلول نمک، آماده‌سازی شدند.

الف-۲ روش‌های تحلیلی

آزمایشگاه	وسیله[c]
۱[a]	لومینومتر LKB-Wallac۱۲۵۱ ، لومینومتر لوله‌ای، Carousel
۲[b]	لومینومتر لوله‌ای ,Triathler
۳	سیستم تشخیص Sirius-Berthold ، لومینومتر لوله‌ای
۴	لومینومتر LKB-Wallac۱۲۵۱ ، لومینومتر لوله‌ای، Carousel
۵[b]	Plate Chameleon V، لومینومتر میکروتیتر پلیتی
۶	لومینومتر Sirius ۱۴۲، لومینومتر لوله‌ای
۷	لومینومتر۱۱۲۵۱ (Bio-Orbit)، لومینومتر لوله‌ای
۸	سیستم تشخیص Sirius-Berthold ، لومینومتر لوله‌ای
۹	لومینومتر۱۱۲۵۱ (Bio-Orbit)، لومینومتر لوله‌ای
۱۰[a]	سیستم آزمایشگاهی فلوئورسان Ascent FL، لومینومتر میکروتیتر پلیتی
a ، b شرکت‌کنندگان نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌ها را با استفاده از دو وسیله مختلف (لومینومتر لوله‌ای و پلیتی)گزارش کردند، آن‌ها به‌طور جداگانه شماره‌گذاری‌شدند .تعداد شرکت‌کنندگان = ۸، تعداد مجموعه داده = ۱۰ . c نام‌های تجاری فهرست‌شده در این ستون برای اطلاع کاربران این استاندارد ارائه شده است و به‌منزله تأییدیه استاندارد به‌شمار نمی‌آید.	

1 Spike

الف-۳ نتایج

دو شرکت‌کننده نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌ها را با استفاده از دو وسیله مختلف گزارش دادند. نتایج آزمایشگاه‌های ۲ و ۵ در ارزیابی عملکرد به‌دلیل خطا در اندازه‌گیری‌ها و محاسبات، رد شد.

خلاصه‌ای از نتایج در جدول الف-۱ و نتایج با جزییات بیش‌تر مقایسه، در جداول الف-۲، الف-۳ و الف-۴ آمده‌است.مقادیر EC_{20} و EC_{50} طبق معادله‌های (۵) و (۶) محاسبه شدند. مقدار میانگین، انحراف استاندارد و ضریب تغییرات[1] پس از رد نقاط پرت (دورافتاده)، با استفاده از آزمون Hampel محاسبه شد .

مقدار بالای میانگین به‌عنوان مقدار اختصاص‌یافته انتخاب شد. عملکرد شرکت‌کنندگان با استفاده از نمرات z ارزیابی شد. تکرارپذیری، S_w%، و تجدیدپذیری، S_b%، این روش برطبق روش آماری ANOVA از دو اندازه‌گیری موازی، آزمون‌شد (جدول الف- ۳).

همه شرکت‌کنندگان، نمونه‌های S1 و V1 را سمی و نمونه‌های S2 و V2 را غیرسمی تشخیص دادند. ارزیابی عملکرد فقط برای نمونه‌های سمی انجام شد (S1 وV1). در نمونه‌های S2 و V2، عدم مهار شدت نورافشانی، تشخیص داده شد که نشان می‌دهد نمونه‌ها غیرسمی بودند .

در این مقایسه، ٪۸۴ نتایج، قابل‌پذیرش بودند مادامی‌که انحراف ٪۳۰ برای نمونه‌ی آبی V1 و ٪۵۰ برای نمونه‌ی رسوبی S1، مجاز شمرده شدند (اکی‌والانس تا ٪۹۵ معنی‌دار است). نمونه آبی V1 به‌طور عمدی با ۳ و ۵ دی کلروفنل، به‌هدف محاسبه مقدار EC_{50} برای این ماده مرجع آلوده شد. ماده مرجع موجب مهار بین ٪۲۰ تا ٪۸۰ بعد از ۳۰min زمان تماس شد.

1 Coefficient of variation

جدول الف-۱ خلاصه ای از نتایج دریافت‌شده : مقادیر EC_{20} و EC_{50}

آزمایشگاه	V1 نمونه		V2 نمونه		S1 نمونه		S2 نمونه	
	EC_{20} %	EC_{50} %	EC_{20} mg/l	EC_{50} mg/l	EC_{20} mg/l	EC_{50} mg/l	EC_{20} mg/l	EC_{50} mg/l
۱	۹/۷	۱۴/۱	[a]۵۰ <	۵۰ <	۵۴۰	۱۵۱۶	[a]۲۵۰۰۰<	۲۵۰۰۰ <
۲	۱۱/۸	۱۷/۳	۵۰ <	۵۰ <	۲۲۶۸	۵۸۹۵	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <
۳	۹/۱	۱۲/۲	۵۰ <	۵۰ <	۱۶۶۰	۳۲۹۸	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <
۴	۱۶/۰	۲۰/۸	۵۰ <	۵۰ <	۸۱۳	۲۱۲۳	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <
۵	۱۷/۱	۲۲/۶	۵۰ <	۵۰ <	۲۵۹۳	۷۹۶۱	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <
۶	۶/۱	۱۲/۶	۵۰ <	۵۰ <	۸۳۳	۲۲۳۷	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <
۷	۱۱/۵	۱۵/۶	۵۰ <	۵۰ <	۵۴۸	۱۴۹۰	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <
۸	۸/۱	۱۱/۴	۵۰ <	۵۰ <	۸۳۳	۱۱۶۶	۱۲۵۷۲ <	۲۵۰۰۰ <
۹	۱۱/۵	۱۳/۹	۵۰ <	۵۰ <	۴۴۹	۹۱۴	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <
۱۰	۹/۹	۱۳/۹	۵۰ <	۵۰ <	۶۱۳	۲۲۱۶	۲۵۰۰۰ <	۲۵۰۰۰ <

یادآوری ۱- مقادیر، میانگین دو اندازه‌گیری از هر آزمایشگاه می‌باشد.

یادآوری ۲- نتایج از آزمایشگاه‌های ۲ و ۵ از ارزیابی عملکرد رد شده‌اند.

a بالاترین غلظت آزمون‌شده

جدول الف-۲ خلاصه‌ای از تست مهارت :مقادیر بالا

داده ها	غلظت موثر عامل			
	٪۲۰ مهار نورافشانی EC_{20}	٪۵۰ مهار نورافشانی EC_{50}	٪۲۰ مهار نورافشانی EC_{20}	٪۵۰ مهار نورافشانی EC_{50}
نمونه	V1	V1	S1	S1
واحد	٪	٪	mg/l	mg/l
مقدار تخصیص‌داده شده[a]	۹/۹	۱۳/۴	۷۰۷	۱۷۹۸
مقدار میانگین	۱۰/۴	۱۳/۹	۷۸۶	۱۸۶۷
مقدار باثبات میانگین[b]	۹/۹	۱۳/۴	۷۰۷	۱۷۹۸
مقدار میانه	۱۱/۱	۱۴/۲	۸۲۱	۲۲۰۳
انحراف استاندارد، s_{rob}، مقدار مطلق	۲/۶	۲/۱	۲۲۵	۷۰۴
انحراف استاندارد باثبات، s_{rob} ٪	۲۶/۲	۱۶/۵	۳۱/۹	۳۹/۲
شماره آزمایشگاه‌ها (شرکت‌کنندگان)	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
درصد انحراف استاندارد دوبارهدف[c]، $2s_{targ}$	۳۰	۳۰	۵۰	۵۰
مقدارz مورد قبول[d]، ٪	۶۰	۷۰	۷۰	۷۰

a Assigned value

b Robust mean value

c سطح اطمینان ٪۹۵

d مقدار z رضایت‌بخش: نتایجی در جایی که ۲ ≤ | z |

جدول الف-۳ نتایج پراکنش دوتایی: روش آماری ANOVA

داده ها	غلظت موثر عامل			
	٪۲۰ مهار نورافشانی EC_{20}	٪۵۰ مهار نورافشانی EC_{50}	٪۲۰ مهار نورافشانی EC_{20}	٪۵۰ مهار نورافشانی EC_{50}
نمونه	V1	V1	S1	S1
واحد	٪	٪	mg/l	mg/l
مقدار تخصیص‌داده شده	۹/۹	۱۳/۴	۷۰۷	۱۷۹۸
میانگین	۱۰/۴	۱۴/۳	۷۹۵	۱۸۹۳
مقدار میانه	۹/۹	۱۳/۶	۶۵۴	۱۷۱۳
تکرارپذیری خطای استاندارد، s_w، مقدار قطعی	۰/۶۸	۰/۶۶	۱۶۱	۲۳۴
تکرارپذیری خطای استاندارد، s_w، ٪	۶/۶	۴/۶	۲۰	۱۲
خطای استاندارد بین آزمایشگاهی، s_b، مقدار قطعی	۲/۹	۳/۰	۳۹۰	۷۶۲
خطای استاندارد بین آزمایشگاهی، s_b، ٪	۲۸	۲۱	۴۹	۴۰
تکرارپذیری خطا، s_t، مقدار قطعی	۳/۰	۳/۱	۴۲۲	۷۹۷
تکرارپذیری خطا، s_t، ٪	۲۹	۲۲	۵۳	۴۲
شماره آزمایشگاه	۹	۹	۸	۸

a سطح اطمینان ٪۹۵

b مقدارz رضایت‌بخش: نتایجی در جایی که $|z| \leq ۲$

جدول الف-۴ دقت داده‌ها برای باکتری‌های منجمدخشک

۳ و ۵ دی‌کلروفنل، نمونه V1	غلظت موثر عامل	
	٪۲۰ مهار نورافشانی EC_{20}	٪۵۰ مهار نورافشانی EC_{50}
آزمایشگاه	۸	۸
مجموعه داده‌ها	۱۰	۱۰
نقاط پرت	۲	۲
غلظت میانگین، $\bar{\rho}$، mg/l	۱/۹۸	۲/۷۸
تکرارپذیری انحراف استاندارد، s_R[a]، mg/l	۰/۵۷	۰/۶۱
ضریب انحراف تکرارپذیری، $C_{V,R}$[b]، ٪	۲۸/۸	۲۱/۹

[a] Reproducibility standard deviation

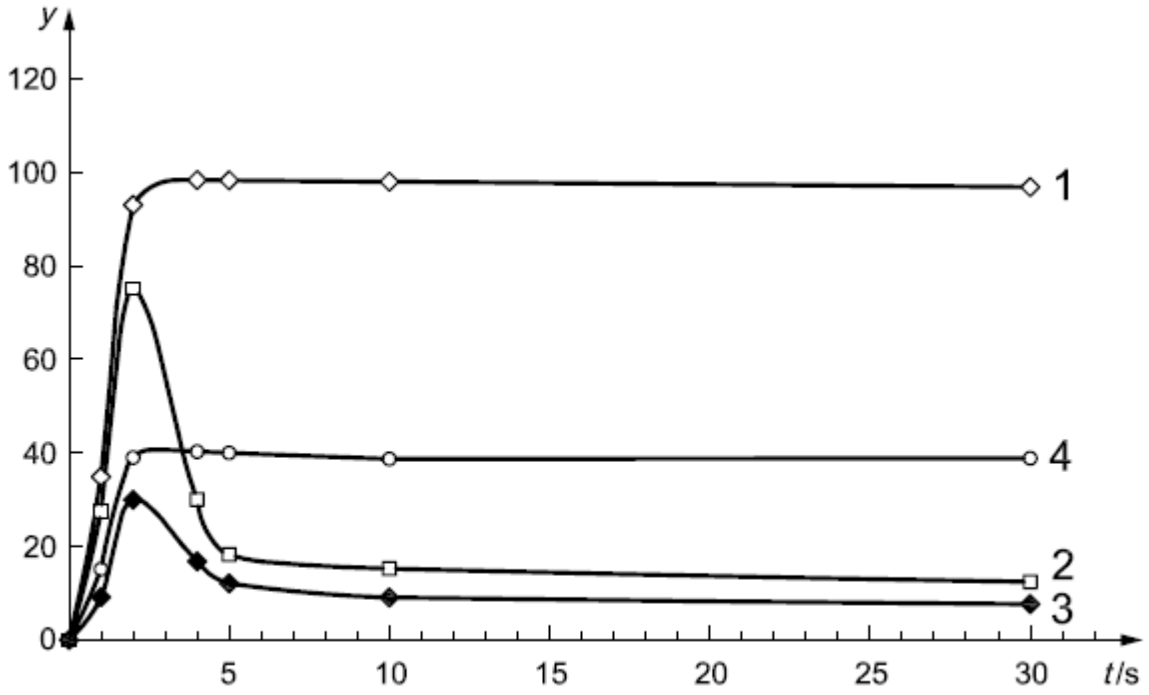
[b] Coefficient of variation of reproducibility

پیوست ب

(اطلاعاتی)

منحنی‌های فعالیت نمونه‌های مختلف

شکل ب-۱ را ببینید.



راهنما

t زمان

y واحدهای نسبی نور

۱) پاسخ از شاهد (۲٪ کسر جرمی محلولNaCl)

۲) پاسخ از DCP سمی بی‌رنگ

۳) پاسخ از نمونه خاک آلوده به نفت

۴) پاسخ از خاک غیرسمی مشابه

شکل ب-۱ رفتار سینتیکی معمول نمونه‌های جامد سمی و غیرسمی در آزمون سینتیک باکتری‌های نورافشان درثانیه‌ی ۳۰ از درمعرض قرارگرفتن [1].

1 Exposure

پیوست پ

(اطلاعاتی)

سری‌های رقت

جدول پ-۱ و شکل پ-۱ را ببینید.

جدول پ-۱ – آماده‌سازی سری‌های رقت

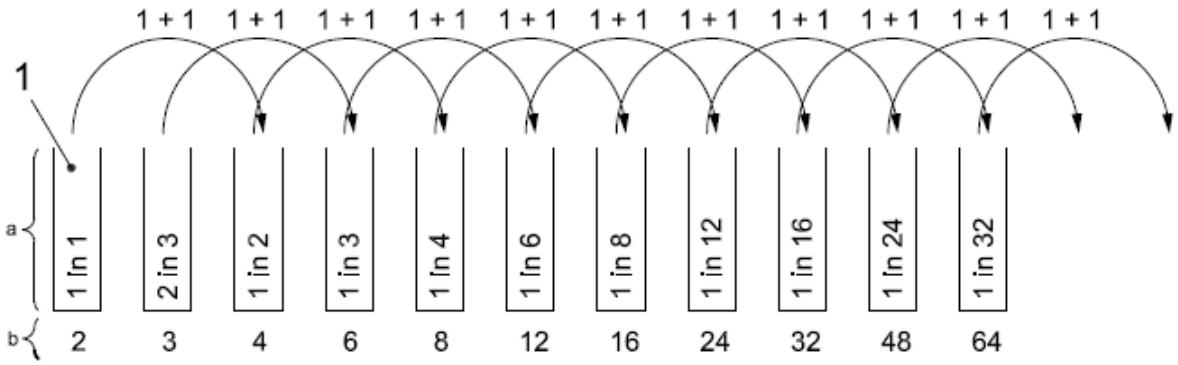
رقت	سطح رقت D	لومینومتر لوله‌ای		لومینومتر پلیتی	
		نمونه یا نمونه رقیق µl	سوسپانسیون آزمون µl	نمونه یا نمونه رقیق µl	سوسپانسیون آزمون µl
۱ ← ۱٫۲۵	۱	۸۰۰	۲۰۰	۳۲۰	۸۰
۱ ← ۲	۲	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۳	۳	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۴	۴	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۶	۶	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۸	۸	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۱۲	۱۲	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۱۶	۱۶	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۲۴	۲۴	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
۱ ← ۳۲	۳۲	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰
سری های شاهد					
$D = ۱$		۸۰۰	۲۰۰	۳۲۰	۸۰
$D \leq ۲$		۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰

یادآوری- ساده‌ترین راه آماده‌سازی این سری‌های رقت این است که برای اولین بار دو رقت سوسپانسیون ذخیره ساخت:

a) رقت ۱← ۱، به عنوان مثال، نمونه رقیق‌نشده ۳۰۰۰µl (رقت نهایی در آزمون پس از اختلاط با حجم معادل از سوسپانسیون آزمون۱← ۲ است)

b) رقت ۲ ← ۳ ، به عنوان مثال، ۲۰۰۰µl از نمونه + ۱۰۰۰µl از محلول بند ۶-۲ (رقت نهایی که در آزمون پس از مخلوط‌کردن با حجم معادل سوسپانسیون آزمون۱← ۳ است).

شکل پ-۱ سری های رقت



راهنما

۱ نمونه

a رقت نمونه برای انجام در اولین مجموعه از لوله‌های آزمون.

b سطح نهایی رقت D پس از افزایش سوسپانسیون آزمون.

پیوست ت

(اطلاعاتی)

کتاب‌نامه

[۱] استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۱۵۰۴، تجهیزات حجم‌سنجی پیستونی – قسمت ۲ : پی‌پت‌های پیستونی

[2] ISO 565, Test sieves — Metal wire cloth, perforated metal plate and electroformed sheet — Nominal sizes of openings

[3] ISO 6107-6:2004, Water quality — Vocabulary — Part 6

[4] ISO/TS 20281:2006, Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data

[5] LAPPALAINEN, J., JUVONEN, R., VAAJASAARI, K., KARP, M. A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples. Chemosphere 1999, 38, pp. 1069-1083

[6] RANTALA, P.-R., VAAJASAARI, K., JUVONEN, R., SCHULTZ, E., JOUTTI, A., MÄKELÄ-KURTTO, R. Composting of forest industry wastewater sludges for agricultural use. Water Sci. Technol. 1999, 40, pp. 11-12, pp. 187-194

[7] PÖLLUMAA, L., KAHRU, A., EISENTRÄGER, A., REIMAN, R., MALOVERYAN, A., RÄTSEP, A. Toxicological investigation of soils with the solid-phase flash assay: Comparison with other ecotoxicological tests. Altern. Lab. Anim. 2000, 28, pp. 461-472

[8] JUVONEN, R., MARTIKAINEN, E., SCHULTZ, E., JOUTTI, A., AHTIAINEN, J. LEHTOKARI, M. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily wastes. Ecotoxicol. Environ. Saf, 2000, 47, pp. 156-166

[9] LAPPALAINEN, J., JUVONEN, R., NURMI, J., KARP, M. Automated color correction method for Vibrio fischeri toxicity test: Comparison of standard and kinetic assays. Chemosphere 2001, 45, 2001, pp. 635-641

[10] DEGLI-INNOCENTI, F., BELLIA, G., TOSIN, M., KAPANEN, A., ITÄVAARA, M. Detection of toxicity released by biodegradable plastics after composting in activated vermiculite. Polym. Degradation Stability 2001, 73, pp. 101-106

[11] LYYTIKÄINEN, M. SORMUNEN, A., RISTOLA, T., JUVONEN, R., KUKKONEN, J.V.K. Toxicity of freshwater sediments in the vicinity of an old sawmill: Application of three bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001, 40, pp. 318-326

[12] BLAISE, C., GAGNÉ, F., CHÈVRE, N., HARWOOD, M., LEE, K., LAPPALAINEN, J., CHIAL, B., PERSOONE, G., DOE, K. Toxicity assessment of oil-contaminated freshwater sediments. Environ. Toxicol. 2004, 19, pp. 267-273

[13] PÖLLUMAA, L., KAHRU, A., MANUSADZIANAS, L. Biotests- and chemistry-based hazard assessment of soils, sediments and solid wastes. J. Soils Sediments 2004, 4, pp. 267-275

[14] KAHRU, A., PÖLLUMAA, L., REIMAN, R., RÄTSEP, A. Predicting the toxicity of oil-shale industry wastewater by its phenolic composition. Altern. Lab. Anim. 1999, 27, pp. 359-366

[15] KAHRU, A., PÖLLUMAA, L., REIMAN, R., RÄTSEP, A., LIIDERS, M., MALOVERYAN, A. The toxicity and biodegradability of eight main phenolic

compounds characteristic to the oil-shale industry wastewaters: A test battery approach. Environ. Toxicol. 2000, 15, pp. 431-442

[16] PÖLLUMAA, L., MALOVERYAN, A., TRAPIDO, M., SILLAK, H., KAHRU, A. Study of the environmental hazard caused by the oil-shale industry solid waste. Altern. Lab. Anim. 2001, 29, pp. 259-267

[17] KAHRU, A., MALOVERYAN, A., SILLAK, H., PÖLLUMAA, L. The toxicity and fate of phenolic pollutants in the contaminated soils associated with the oil-shale industry. Environ. Sci. Pollut. Res. 2002, (Spec. 1), pp. 27-33

[18] POSTMA, J.F., DE VALK, S., DUBBELDAM, M., MAAS, J.L., TONKES, M., SCHIPPER, C.A., KATER, B.J. Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2002, 53, pp. 226-237

[19] GRABERT, E., KÖSSLER, F. About the effect of nutrients on the luminescent bacteria test. In: HASTINGS, J.W., KRICKA, L.J., StANLEY, P.E., editors. Bioluminescence and chemiluminescence: Molecular reporting with photons, pp. 291-294. Chichester: Wiley, 1997

[20] KREBS, F. Toxizitätstest mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien [Toxicity test with freeze-dried bacteria]. Gewässerschutz, Wasser, Abwasser 1983, 63, pp. 173-230

[21] ENVIRONMENT CANADA (2002). Biological test method: Reference method for determining the toxicity of sediment using luminescent bacteria in a solid-phase test. Ottawa, ON: Environment Canada, 2002.60 p. (EPS 1/RM/42.)

[22] MORTIMER, M., KASEMETS, K., HEINLAAN, M., KURVET, I., KAHRU, A. High throughput kinetic Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. Toxicol. in vitro2008, 22, pp. 1412-1417