

水中生化需氧量檢測方法

中華民國 114 年 6 月 25 日環部授研字第 1145107756 號公告

自中華民國 114 年 10 月 15 日生效

NIEA W510.56B

一、方法概要

水樣在 20°C 恆溫培養箱中暗處培養 5 天後，測定水樣中好氧性微生物在此期間氧化水中物質所消耗之溶氧（Dissolved oxygen，簡稱 DO），即可求得 5 天之生化需氧量（Biochemical oxygen demand，簡稱 BOD₅）。

二、適用範圍

本方法適用於地面水體（註 1）、地下水、放流水及廢（污）水中生化需氧量檢測。

三、干擾

- （一）酸性或鹼性之水樣會造成誤差，應使用氫氧化鈉或硫酸調整之。
- （二）水樣中若含餘氯會造成誤差，可以使用亞硫酸鈉排除干擾。
- （三）水樣中若含氟離子、六價鉻離子、重金屬及其他毒性化學物質均會造成干擾，必須經過適當處理，否則不適宜生化需氧量之測定。
- （四）水樣中溶氧若過飽和會造成誤差。可將水溫調整至 20 °C ± 3°C，再通入空氣或充分搖動以去除干擾。
- （五）水樣中無機物質如硫化物及亞鐵離子之氧化作用會消耗溶氧而造成誤差；此外，水樣中還原態氮之氧化作用亦會消耗溶氧而造成誤差，可使用硝化抑制劑以避免氧化作用。
- （六）水樣中若含肉眼可見之生物，應去除之。

四、設備與材料

- （一）BOD 瓶：60 mL 或更大容量之玻璃瓶（以 300 mL 具玻璃塞及喇叭狀口之 BOD 瓶為佳）。使用前應以清潔劑洗淨，然後以試劑水淋洗乾淨並晾乾。

- (二) 恆溫培養箱：溫度可控制在 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，並可避光以預防 BOD 瓶中藻類行光合作用而導致水樣溶氧增加。
- (三) 高壓滅菌釜：溫度能保持在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ （壓力約 15 lb/in^2 或 1.1 kg/cm^2 ）滅菌 15 分鐘以上。
- (四) 溶氧測定裝置：參照「水中溶氧檢測方法—碘定量法(NIEA W422.5)」或「水中溶氧檢測方法—電極法(NIEA W455.5)」
(註 2)。

五、試劑

除非另有規範，否則必須是分析試藥級；配製體積得視使用需求，依試藥配製比例配製適當體積，若有沈澱或生物滋長跡象時即應捨棄。

- (一) 試劑水：電阻率 $16\text{ M}\Omega\text{-cm}$ 以上。
- (二) 磷酸鹽緩衝溶液：溶解 8.5 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)、21.75 g 磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)、33.4 g 磷酸氫二鈉 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 及 1.7 g 氯化銨 (NH_4Cl) 於約 500 mL 試劑水中，再以試劑水定容至 1 L，此溶液 pH 值應為 7.2，無需任何調整。或者，溶解 42.5 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 及 1.7 g 氯化銨 (NH_4Cl) 於約 700 mL 試劑水中，以 10 M 氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 7.2，再以試劑水定容至 1 L。
- (三) 硫酸鎂溶液：溶解 22.5 g 硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 於適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L。
- (四) 氯化鈣溶液：溶解 27.5 g 氯化鈣 (CaCl_2) 於適量試劑水中，再以試劑水定容並稀釋至 1 L。
- (五) 氯化鐵溶液：溶解 0.25 g 氯化鐵 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 於適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L。
- (六) 硫酸溶液，0.5 M：緩緩加 28 mL 濃硫酸於攪拌之適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L (註 3)。
- (七) 氫氧化鈉溶液，1 M：溶解 40 g 氫氧化鈉於適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L。
- (八) 氫氧化鈉溶液，10 M：溶解 40 g 氫氧化鈉於適量試劑水中，再以試劑水定容至 100 mL。

- (九) 亞硫酸鈉溶液，0.0125 M：溶解 1.575 g 亞硫酸鈉 (Na_2SO_3) 於 適量試劑水中，再以試劑水定容至 1L。此溶液不穩定，須於使用當日配製。
- (十) 硝化抑制劑：使用 2-氯-6-(三氯甲基)吡啶 (2-Chloro-6-(trichloromethyl) pyridine，簡稱 TCMP) 或 TCMP 市售品。
- (十一) 葡萄糖—麩胺酸溶液：葡萄糖 (Glucose) 及麩胺酸 (Glutamic acid) 經 $103\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 烘乾至少 1 小時後，溶解 0.1500 g 葡萄糖及 0.1500 g 麩胺酸於 適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L。此溶液滅菌 (過濾滅菌或 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高溫高壓滅菌 15 分鐘) 後貯存於 $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 下，可保存 3 個月，若溶液無法維持在無菌狀態，應於使用前配製。
- (十二) 碘化鉀溶液：溶解 10 g 碘化鉀於適量試劑水中，再以試劑水定容至 100 mL。
- (十三) 源水：水樣稀釋用，可使用去離子水、蒸餾水、經去氯後之自來水或天然水。

六、採樣與保存

水樣在採集後迄分析之保存期間內，可能會因微生物分解有機物質而降低 BOD 值。水樣若在採樣後 2 小時內開始分析，可不需冷藏，若採樣後無法在 2 小時內開始分析，則水樣應冷藏於 大於 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 至 $6\text{ }^\circ\text{C}$ 以下暗處，並儘可能在 6 小時內分析，但無論如何，水樣應於採樣後 48 小時內進行分析。

七、步驟

(一) 準備程序

1. 水樣前處理

- (1) 所有水樣均須確認 pH 值，若未介於 6.0 至 8.0 範圍內，調整水樣溫度至 $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ 後，以 0.5 M 硫酸或 1 M 氫氧化鈉溶液將水樣之 pH 值調整為 6.5 至 7.5，所加入硫酸或氫氧化鈉溶液體積不可稀釋樣品超過 0.5%。所有經調整 pH 值之水樣均須植菌。
- (2) 含餘氯之水樣：水樣應儘可能在加氯消毒前採集，以避免水樣中含有餘氯。若水樣含有餘氯，可添加亞硫酸鈉溶液去除

之。亞硫酸鈉溶液使用量可由下述試驗結果來決定：在每 1000 mL 中性水樣中加入 10 mL 1 + 1 醋酸溶液（或 1 + 50 硫酸溶液）及 10 mL 碘化鉀溶液，混合均勻後，以 0.0125 M 亞硫酸鈉溶液滴定，當碘和澱粉指示劑所形成之藍色複合物消失時即為滴定終點。在中性水樣中依比例添加上述試驗所得之亞硫酸鈉溶液用量，混合 10 至 20 分鐘後，檢查水樣是否仍含有餘氯（註 4）。所有加氯/去氯之水樣均須植菌。

- (3) 含毒性物質之水樣：某些工業廢水如電鍍廢水含有毒金屬，此類水樣需經過特殊處理。
- (4) 含過飽和溶氧之水樣：低溫或發生光合作用之水樣，在 20°C 之溶氧可能過飽和，可將水溫調整至 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，再通入乾淨且經過濾之空氣或充分搖動以驅出過飽和溶氧。
- (5) 含過氧化氫之水樣：一些採集於造紙廠或紡織廠之工業漂白程序水樣含有過氧化氫，會造成水樣中溶氧濃度過飽和。此類水樣可於開口容器中充分混合一段時間（混合時間視過氧化氫含量，可能需 1 小時至 2 小時），以消耗水樣中過氧化氫。在混合過程中可觀測樣品中溶氧濃度變化或以過氧化氫試紙確認過氧化氫之去除率，當停止混合後 30 分鐘內溶氧不再增加，可視為過氧化氫已完全反應。

2. 源水之選擇及貯存

水樣稀釋用之源水須確認不含重金屬（特別是銅）及毒性物質如餘氯等。應使用乾淨容器保存，以確保源水品質。源水可以一直貯存至使用，只要其所製備之稀釋水空白值符合九、（二）所規定之品質管制範圍，此貯存可以改善某些源水之品質，但對某些源水則可能因微生物滋長而導致品質退化。

3. 菌種準備

使用於植菌之菌種必須含有對水樣中生物可分解性有機物質具氧化能力之微生物。家庭污水、廢水生物處理廠未經加氯或其他方式消毒之放流水及排放口之表面廢污水，均含有理想的微生物。某些未經處理之工業廢水、消毒過之廢水、高溫廢水或 pH 值小於 6 或大於 8.5 之廢水中微生物均不足，這些水樣均須添加適量菌種。理想菌種來源為廢水生物處理系統內之混合液或其放流水，若無法取得，可採用家庭污水為菌種來源，使用前須先在室溫下靜置使其澄清，靜置時間應在 1 小時以上，

但最長不超過 36 小時，取用時應取上層液。若使用廢水生物處理系統內之混合液或其放流水時，採集後應加入硝化抑制劑。

某些水樣可能含有無法由家庭污水來源之菌種以正常速率分解之有機物質，此時應使用廢水生物處理系統內之混合液或其未經消毒之放流水做為菌種來源。若無生物處理設備，則取用放流口下方 3 公里至 8 公里處之水。若此菌種來源亦無法取得時，可以在實驗室內自行培養或使用市售菌種。實驗室內自行培養菌種時，以土壤懸浮物、活性污泥或市售菌種做為初始菌種，於經沈澱之家庭污水連續曝氣培養，並且每日增加少量污水添加量。然後以此菌種測定葡萄糖—麩胺酸溶液之 BOD 值，直至測值隨時間增加達到一穩定值且在 $198 \text{ mg/L} \pm 30.5 \text{ mg/L}$ 範圍內，此即表示菌種培養成功。

(二) 檢測程序

1. 稀釋水製備

取適量體積之源水於適當容器中，在使用於 BOD 檢測前，確認溶氧濃度至少 7.5 mg/L ，若溶氧濃度不足，則搖晃或通入經過濾且不含有機物質之空氣，或亦可將源水置於具棉花塞蓋之瓶內，保存足夠時間，使其溶氧達 7.5 mg/L 。每 1 L 源水中，加入磷酸鹽緩衝溶液、硫酸鎂溶液、氯化鈣溶液及氯化鐵溶液各 1 mL，充分混合並調整溫度至 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。稀釋水應於使用前製備，除非貯存之稀釋水空白值符合九、(二)所規定之品質管制範圍。若稀釋水空白值超出品質管制範圍，應純化改良或改用其他源水，不可為使稀釋水空白值落入管制範圍中，而添加氧化劑或將稀釋水暴露於紫外線中。

2. 水樣溫度調整

水樣於稀釋前，應調整溫度至 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

3. 水樣稀釋

原則上，稀釋後之水樣，經培養 5 天後，殘餘溶氧在 1.0 mg/L 以上，且溶氧消耗量大於 2.0 mg/L 時可靠性最大。以稀釋水將水樣稀釋成至少 3 個稀釋倍數，估計稀釋水樣經培養 5 天後，可導致殘餘溶氧在 1.0 mg/L 以上，且溶氧消耗量至少 2.0 mg/L 。一般可由水樣測得之 COD 值來推算其 BOD 值及稀釋濃度。通常各種水樣之稀釋濃度為：嚴重污染之工業廢水 0.0%

至 1.0 %；未經處理及經沈澱之廢水 1 % 至 5 %；生物處理過之放流水 5 % 至 25 %；受污染之河川水 25 % 至 100 %。水樣之稀釋方法有兩種，可先用定量容器稀釋後再裝入 BOD 瓶，或直接在 BOD 瓶中稀釋。

- (1) 以定量容器稀釋水樣：取欲稀釋體積之水樣置於量筒或定量瓶中，水樣取樣前應充分混合，以避免固體物沈降漏失，以稀釋水裝填至 2/3 滿，並應避免氣泡進入，添加適量之菌種及硝化抑制劑，最後以稀釋水稀釋至最終體積。以虹吸管將稀釋水樣吸入所需數量之 BOD 瓶中，注意在轉移的過程中，小心避免固體物於量筒或定量瓶中沈降。
- (2) 直接在 BOD 瓶中稀釋水樣：取欲稀釋體積之水樣置於 BOD 瓶中，以稀釋水裝填至約 2/3 滿，於個別 BOD 瓶中添加適量之菌種及硝化抑制劑，再以稀釋水填滿 BOD 瓶，如此，當塞入瓶蓋時，即可將所有空氣排出，而無氣泡殘留於 BOD 瓶內。當水樣之稀釋比率大於 1：100 時，水樣應先以量瓶做初步稀釋，然後再以 BOD 瓶做最後稀釋。稀釋後 BOD 瓶中水樣體積若超過 67%，稀釋水樣中之營養鹽可能不足而影響菌種活性，此時，直接於 BOD 瓶中以 1 mL/L (0.30 mL/300 mL BOD 瓶) 比例加入營養鹽、礦物質與緩衝溶液。

4. 菌種添加

若水樣需要植菌，於水樣做最後稀釋前添加於稀釋容器或 BOD 瓶中，若廢水樣品在稀釋前含有毒性物質，不可將菌種直接添加於廢水樣品中。一般而言，300 mL BOD 瓶中添加 1 mL 至 3 mL 沈降後之原水或初級放流水，或 1 mL 至 2 mL 1：10 稀釋之活性污泥混合液，將可提供適量之微生物。菌種使用前不可過濾，在菌種轉移過程中需攪動，以確保每一 BOD 瓶中所添加之微生物量相同。加入每一 BOD 瓶中菌種所導致之溶氧消耗量應介於 0.6 mg/L 至 1.0 mg/L 範圍內，但所加入菌種量應調整至使葡萄糖－麩胺酸溶液之 BOD 值落在 198 mg/L ± 30.5 mg/L 範圍內。

5. 硝化抑制劑添加

需要添加硝化抑制劑之水樣，至少包括經生物處理之放流水、添加以生物處理之放流水作為菌種來源之水樣及河川水等；所有添加硝化抑制劑之樣品皆須植菌，並記錄硝化抑制劑之添加量。

每 1 L 稀釋水樣添加 10 mg TCMP，或添加 3 mg TCMP 於 300 mL BOD 瓶內，且於樣品初步稀釋後及以稀釋水做最後稀釋前加入，在稀釋水樣未裝 2/3 滿前不可添加 TCMP 於 BOD 瓶內。純的 TCMP 溶解速率可能很慢，若未混合完全可能浮在樣品表面。有些市售之 TCMP 較易溶於水樣，但其純度可能不是 100%，需調整其用量。

6. BOD 瓶水封

為避免在培養期間空氣進入 BOD 瓶中，應將 BOD 瓶水封，其方式為添加稀釋水或源水於已加蓋玻璃塞之 BOD 瓶喇叭狀口。水封後應以紙、塑膠類杯狀物或薄金屬套覆蓋 BOD 瓶之喇叭狀口，以減少培養期間水分蒸發（註 5）。

7. 初始溶氧測定

將稀釋水樣、重複分析水樣、植菌控制、稀釋水空白及葡萄糖－麩胺酸溶液等樣品依照碘定量法(NIEA W422.5)七、(一) 1~4 步驟或依電極法(NIEA W455.5)進行初始溶氧測定。水樣稀釋後應於 30 分鐘內測定初始溶氧。若使用電極法，於初始溶氧測定後，以稀釋水樣或稀釋水填滿 BOD 瓶以取代被置換之溶液，緊密蓋上瓶蓋後水封；若使用碘定量法，則每一稀釋水樣須裝兩個 BOD 瓶，取其中一瓶測定初始溶氧，另一瓶則緊密蓋上瓶蓋後水封。

8. 水樣培養

將水封後樣品置於 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之恆溫培養箱內培養。培養期間應避光，以避免藻類行光合作用而導致水樣之溶氧增加。

9. 最終溶氧測定

於恆溫培養箱培養 5 天±6 小時後，再將稀釋水樣、重複分析水樣、植菌控制、稀釋水空白及葡萄糖－麩胺酸溶液依照碘定量法七、(一) 1~4 步驟或依電極法測定最終溶氧。

八、結果處理

- (一) 將溶氧消耗量大於 2.0 mg/L 且殘餘溶氧在 1.0 mg/L 以上之稀釋水樣，依下列公式計算生化需氧量。

$$\text{BOD}_5(\text{mg/L}) = \frac{(D_1 - D_2) - (S)V_s}{P}$$

D_1 ：稀釋水樣之初始溶氧(mg/L)

D_2 ：稀釋水樣經 20 °C 培養 5 天後之溶氧(mg/L)

S ：每一 BOD 瓶中，每 mL 菌種之溶氧消耗量(ΔDO /mL)，若水樣未植菌， $S=0$

V_s ：每一 BOD 瓶中菌種體積(mL)

P ：水樣體積(mL)/稀釋水樣之最終體積(mL)

若水樣有多個稀釋濃度符合溶氧消耗量大於 2.0 mg/L 且殘餘溶氧在 1.0 mg/L 以上，且較高稀釋濃度之水樣不含毒性跡象和明顯異常情況，在合理範圍內以平均值出具報告。

(二) 當未稀釋水樣（除添加植種、營養源、礦物質和緩衝溶液外不進行任何水樣稀釋）之溶氧消耗量小於 2.0 mg/L，且加入每一 BOD 瓶中菌種所導致之溶氧消耗量介於 0.6 mg/L 至 1.0 mg/L 範圍內，則可帶入公式計算並出具報告（若計算得 BOD_5 小於 0.1 mg/L，則以 BOD_5 小於 0.1 mg/L 出具報告）。

九、品質管制

(一) 植菌控制：若稀釋水樣有植菌，則須做植菌控制。所謂植菌控制即是將菌種當成水樣測定其 BOD 值。以稀釋水將菌種稀釋成至少 3 個稀釋倍數，理想狀況下，經培養 5 天後，最大稀釋倍數要導致至少 2.0 mg/L 之溶氧消耗，且最小稀釋倍數之殘餘溶氧在 1 mg/L 以上。使用斜率法或比例法計算每 mL 菌種之溶氧消耗量。

1.斜率法：溶氧消耗量大於 2.0 mg/L 且殘餘溶氧在 1.0 mg/L 以上之植菌控制，以溶氧消耗量(mg/L)對應菌種體積(mL)作圖，可呈現線性關係，其斜率表示每 mL 菌種之溶氧消耗量，而截距則為稀釋水之溶氧消耗量，其值必須小於 0.2 mg/L。

2.比例法：溶氧消耗量大於 2.0 mg/L 且殘餘溶氧在 1.0 mg/L 以上之植菌控制，將溶氧消耗量(mg/L)除以菌種體積(mL)並求其平均值。

不同稀釋倍數所求得之每 mL 菌種之溶氧消耗量，若最大及最小

值之相對差異百分比大於 30% 時，表示菌種中可能含有有毒物質或較大顆粒，此時必須確認或更換菌種來源。

- (二) 稀釋水空白分析：每批次或每 10 個樣品至少執行一次稀釋水空白分析。稀釋水空白應含營養鹽、礦物質和緩衝溶液，但不添加菌種及硝化抑制劑。於培養前及培養後（20 °C，5 天）測定溶氧，其溶氧消耗量不應超過 0.2 mg/L，最好在 0.1 mg/L 以下。
- (三) 葡萄糖—麩胺酸溶液查核分析：每批次或每 10 個樣品至少執行一次葡萄糖—麩胺酸溶液查核分析。於 3 個 BOD 瓶中各加入適量葡萄糖—麩胺酸溶液，使每個 BOD 瓶含 3.0 mg 葡萄糖/L 及 3.0 mg 麩胺酸/L（6 mL 葡萄糖—麩胺酸溶液/300 mL BOD 瓶），於 20 °C \pm 1 °C 培養 5 天後，依八、結果處理計算葡萄糖—麩胺酸溶液 BOD 值。3 瓶之 BOD 平均值應在 198 mg/L \pm 30.5 mg/L 範圍內。
- (四) 重複樣品分析：每批次或每 10 個樣品至少執行一次重複樣品分析，其相對差異百分比應在 20 % 以內。

十、精密度與準確度

(一) 國內單一實驗室測定葡萄糖—麩胺酸溶液之結果如下表所示：

葡萄糖—麩胺酸溶液 (mg/L)	葡萄糖—麩胺酸 溶液之統計 BOD值(mg/L)	月回收濃度 平均值 (mg/L)	月標準偏差 平均值 (mg/L)	二重複分 析樣品數	分析 月數
300	198 \pm 30.5*	189	8.7	58	14

資料來源：行政院環境保護署環境檢驗所例行檢驗之資料。

* 該統計值請參考十、精密度與準確度（三）。

(二) 單一實驗室測定葡萄糖—麩胺酸溶液之結果如下表所示：

葡萄糖—麩胺酸溶液(mg/L)	葡萄糖—麩胺酸 溶液之統計 BOD值(mg/L)	月回收濃度 平均值 (mg/L)	月標準偏差 平均值 (mg/L)	三重複分 析樣品數	分析 月數

300	198±30.5*	204	10.4	421	14
-----	-----------	-----	------	-----	----

資料來源：同本文之參考資料（一）。

* 該統計值請參考十、精密度與準確度（三）。

- (三) 實驗室間比測：在一系列的比測中，每次邀請 2 間至 112 間實驗室（包括許多檢驗員及許多菌種來源），測定葡萄糖與麩胺酸 1：1 混合之合成水樣在培養 5 天後之 BOD 值，合成水樣之濃度範圍為 3.3 mg/L 至 231 mg/L。所得之平均值 \bar{X} 及標準偏差 S 之回歸方程式如下：

$$\bar{X} = 0.658 \times \text{添加濃度}(\text{mg/L}) + 0.280 \text{ mg/L}$$

$$S = 0.100 \times \text{添加濃度}(\text{mg/L}) + 0.547 \text{ mg/L}$$

以 300 mg/L 葡萄糖—麩胺酸溶液經培養 5 天為例，代入上式，其 BOD 之平均值 \bar{X} 為 198 mg/L，標準偏差 S 為 30.5 mg/L。（資料來源：同本文之參考資料（一））

十一、參考資料

- (一) APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Biochemical Oxygen Demand Method 5210B, 2022。
- (二) 行政院環境保護署，水質檢測方法，水中溶氧檢測方法—碘定量法，W422.53B。
- (三) 行政院環境保護署，水質檢測方法，水中溶氧檢測方法—電極法，W455.52C。

註 1：本方法驗證範圍未包含海域地面水體。

註 2：本文引用之所有公告方法編碼，以環境部最新公告者為準。

註 3：需注意配製過程中會產生大量熱。

註 4：過量之亞硫酸鈉溶液會形成需氧量，並會慢慢地與經氯化水樣中可能存在之有機氯胺化合物起反應。

註 5：為減少誤差，宜使用經校正或內部檢查體積且編碼相同之 BOD 瓶及瓶蓋。若瓶蓋無編碼，可自行刻記