

سازمان حفاظت محیط زیست

بخش هیدروکربنهای نفتی و سموم آزمایشگاه مرجع

# روشهای نمونه برداری

## Sampling method

تهیه کنندگان:

اعظم صادق اسدی  
آزاده اکرام جعفری  
المیرا دارابی

نسخه:

۱۳۹۱-۰۰

## ۱-۱- اهمیت نمونه برداری

برای دستیابی به اطلاعات در سطح کیفی مطلوب و قابل اعتماد، نمونه برداری صحیح از اهمیت بالایی برخوردار است. به همین منظور نیاز به یک برنامه نمونه برداری کامل می باشد که بتواند اهداف نمونه برداری و پایش را تأمین کند. بنابراین در طراحی برنامه های نمونه برداری باید نکات زیر در نظر گرفته شود.

۱. چه آلاینده هایی اندازه گیری میشوند.
۲. چه مکانهایی انتخاب می شوند.
۳. نمونه ها در چه مکانی نگهداری می شوند.
۴. نمونه برداری در چه زمانی و چند بار انجام می شود.
۵. چه تعداد نمونه و از چه سایزی تهیه می شود.
۶. چه بافتی برای آنالیز انتخاب می شوند.

## ۱-۲- اهداف برنامه پایش

### ۱-۲-۱- سلامت عمومی

الف) از آنجایی که بخشی از هدف پایش تعیین میزان آلودگی در نمونه های مختلف از جمله مواد غذایی که با سلامت عمومی در ارتباط است میباشد، موارد ذیل در این راستا ارائه می گردد.  
الف) باید نمونه از نوعی انتخاب شود که در بازار عرضه میشود. مانند ماهی و انواع صدفهای خوراکی

- ب) نوع ارگانسیم انتخابی باید مطابق با الگوی غذایی افراد باشد.
- ج) به غیر از مواردی که الگوی مشخصی برای صید وجود دارد بقیه نمونه ها در هر زمانی از سال می توانند جمع آوری شوند.
- د) ماهیهای نمونه برداری شده باید هم اندازه با گونه موجود در بازار باشند. به طور معمول هر نمونه می تواند شامل ۱۰-۵ گونه از ماهیها و نرم تنان صدفدار بزرگ (خرچنگ) و ۵۰ گونه نرم تنان صدفدار کوچک تر (صدفهای دوکفه ای، میگو) باشد.
- ه) تنها بافتی خوراکی نیاز به آنالیز آلودگی ها دارد به این معنی که بافت ماهیچه ای در ماهی و سخت پوستان بزرگ و تمام بافت نرم در سایر نرم تنان صدفدار می تواند مورد آنالیز قرار گیرد.

### ۱-۲-۲- نقاط آلوده بحرانی

الف) نقاط بحرانی معمولاً در مصب رودخانه ها و مناطق ساحلی به جایی اطلاق می شود که محل تخلیه پسماندها می باشد. از سوی دیگر نوار ساحلی دارای نقاط مشابه مصب رودخانه ها هستند که در آنجا مواد زائد باقیمانده از کشتیها تخلیه شده و منجر به آلودگی می شود.

ب) مفیدترین موجودات جهت پایش این مناطق بی مهرگان هستند. لکن باید برای تعیین گونه جاندار مناسب مورد بررسی در فاز آبی و خاکی از نقطه نظرات کارشناسی متخصص زیست شناسی نیز استفاده نمود.

ج) تنوع فصلی منابع غذایی و دوره تخم ریزی بی مهرگان باعث ایجاد تغییراتی در وزن بدن آنها و همچنین میزان چربی و ترکیبات آن و در نهایت تغییر میزان آلودگی در بافت آنها می شود. به منظور کاهش تغییرات پیشنهاد می شود نمونه برداری قبل از دوره تخم ریزی انجام شود.

د) نمونه ها به صورت تکی و یا توده ای میتوانند آنالیز شوند. ولی اگر به صورت توده ای آنالیز شوند اطلاعات بدست آمده از آنها بر پایه تغییر سایز نخواهد بود.

ه) تمام بافت نرم بدن ارگانسم باید برای آنالیز برداشته شود.

نکته: هنگام آنالیز آلودگیهای چربی دوست اندازه گیری چربی هر نمونه بسیار مهم است. زیرا میزان چربی موجود در بدن ارگانسم بسته به منابع غذایی و سایر متغیرها در زمانهای مختلف تغییر می کند. و هر چه میزان چربی بیشتر باشد میزان بیشتری از آلودگیها در بدن آنها تجمع پیدا می کند. بنابراین برای اینکه مقایسه اطلاعات برای مناطق و زمانهای مختلف نمونه برداری با اطمینان انجام شود، باید بر اساس میزان چربی موجود در بدن آنها باشد.

### ۱-۲-۳- نقاط آلوده و نقاطی که تغییر آلودگی زمانی دارند

الف) سایتهای نمونه برداری باید شامل مصب رودخانه ها، مناطق ساحلی و توار ساحلی باشد تا اطمینان حاصل شود که مناطق آلوده و پاک هر دو بررسی شده اند.

ب) به دلیل اینکه هدف مطالعه آلودگی فعلی موجودات است هیچ محدودیتی برای انتخاب گونه مورد مطالعه وجود ندارد.

ج) جمع آوری نمونه ها باید در طول یک دوره زمانی با وقفه های کوتاه انجام شود.

د) مطالعه باید تمام محدوده سایز گونه های تحت بررسی را پوشش دهد تا تصویر واضح از یک ناحیه محیط زیستی را فراهم کند.

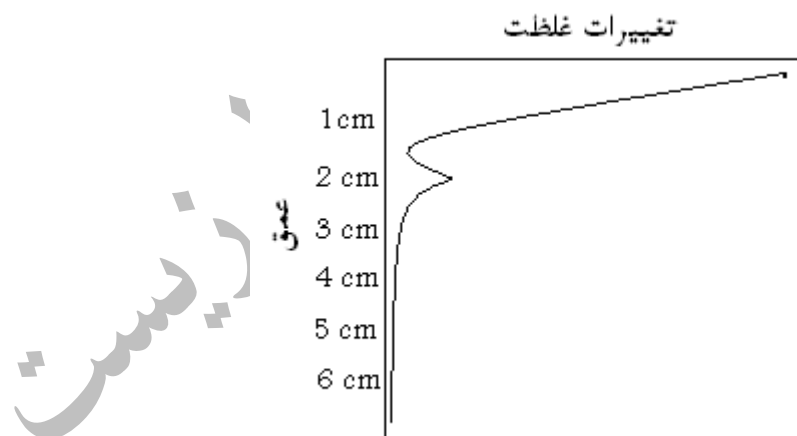
ه) برای نمونه ماهی، ماهیچه آن بهترین بافت برای آنالیز می باشد. با این وجود از جگر و بافت کلیه نیز استفاده نمود. از سوی دیگر بافت جگر، لوزالمعده و ماهیچه نیز برای مطالعه رده سخت پوستان استفاده می شود. در هر صورت به طور کلی می توان اذعان داشت از تمام بافت نرم تنان نمونه تهیه نموده و بررسی لازم صورت پذیرد.

### ۱-۳- نمونه برداری از محیطهای مختلف

#### ۱-۳-۱- نمونه برداری از خاک

با توجه به هدف نمونه برداری می توان نمونه برداری از لایه های مختلف خاک یا رسوب را انجام داد. اگر هدف از نمونه برداری طرح مطالعاتی در خصوص اندازه گیری آلودگی باشد می توان از عمقهای مختلف

خاک برشهای مناسب را تهیه و آنالیز را انجام داد. ولی به طور کلی برای تعیین میزان آلودگی خاک یک منطقه با توجه به اینکه غلظت آلاینده ها با افزایش عمق خاک کاهش می یابد از لایه های سطحی خاک نمونه برداری می شود. نمودار زیر نشان می دهد که با افزایش عمق خاک غلظت آلاینده ها کاهش می یابد.



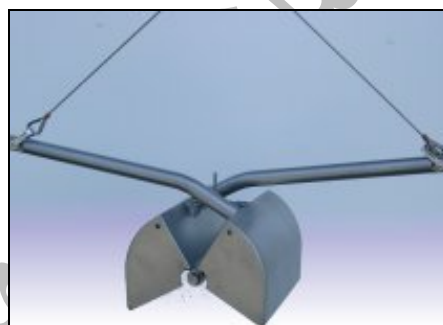
نمودار ۱-۱- منحنی تغییرات غلظت بر اساس عمق خاک

با توجه به عمق خاکی که نمونه از آن برداشته می شود می توان از دستگاههای مختلف استفاده کرد. همچنین باید به این موضوع توجه کرد که چون دستگاههای مختلف از عمقهای مختلف خاک نمونه برداری می کنند. آنالیز آنها دارای جواب یکسان نمی باشند. به عنوان مثال اگر با بیل حفاری کوچک (Small Grab) که یک دستگاه کوچک نمونه بردار است و با دست می توان از آن استفاده کرد، نمونه

بررداری انجام شود. جواب آنالیز خاک آن با جواب آنالیز همان خاک که با بیل حفاری بزرگ (Large Grab) نمونه برداری شده است متفاوت است. علت در این است که بیل حفاری بزرگ از عمق بیشتری از خاک تا حدود ۲۵ سانتی متر را برداشت می کند و در نتیجه غلظتها متفاوت است. همچنین هنگام نمونه برداری از خاک یا رسوب بهتر است از Multi Core استفاده شود. چون ممکن است آن قسمت از خاک که Core وارد آن می شود مثلاً دارای DDT باشد و قسمتهای دیگر خاک آلودگی نداشته باشد. که در زیر شکل برخی از سیستمهای موردنظر نشان داده شده است.



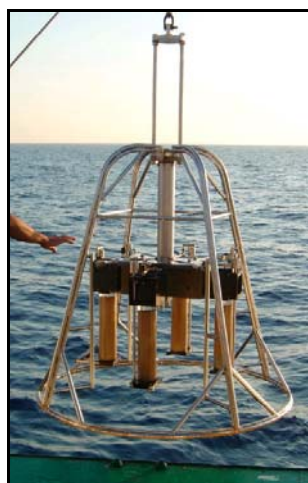
شکل ۱-۲- بیل حفاری کوچک



شکل ۱-۱- بیل حفاری بزرگ



شکل ۱-۴- Gravity Corer

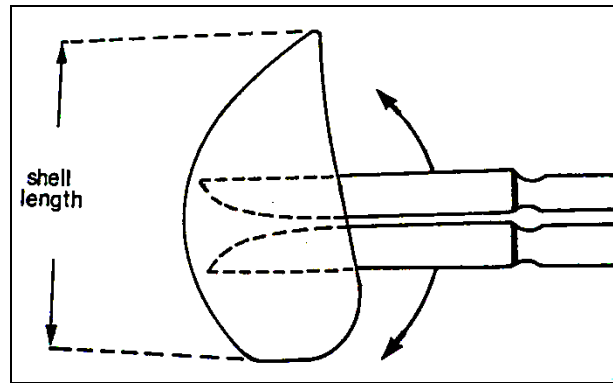


شکل ۱-۳- Multi Core

### ۱-۲-۲- نمونه برداری از Biota

برای نمونه برداری از Biota توجه به نکات زیر ضروری بنظر میرسد:

- ۱- چاقو، انبرک ها و ظروفی که استفاده می شوند باید تمیز باشند.
- ۲- بهتر است برای تسلط بهتر در انجام کار دستها هنگام نمونه برداری و آماده سازی بدون دستکش باشند (به شرط آنکه با آب و محلول شوینده و آب مقطر شسته شده باشند).



شکل ۱-۵- چاقوی برش

در ذیل انواع مختلف و موارد مرتبط به تفکیک توضیح داده می شود.

#### الف) پلانکتون ها (Planktons):

پلانکتون ها در قسمت های مختلف آب دریا زندگی می کنند. آنهایی که در سطح دریا زندگی می کنند مقدار بیشتری از سموم داخل آنها تجمع می کنند. (پلانکتون های آبی رنگ)

#### ب) صدف های خوراکی (Oysters):

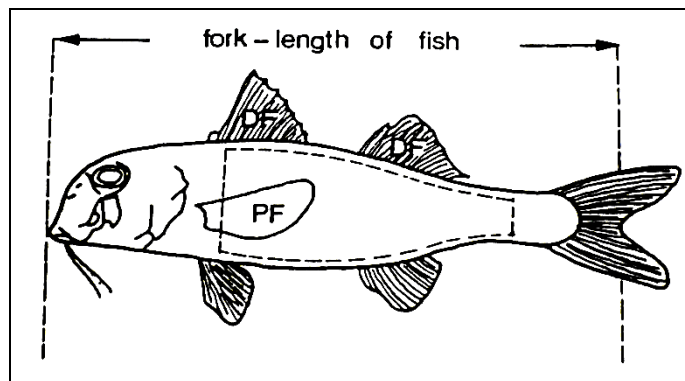
به علت کم بودن تحرک این نوع نمونه ها، بهتر است برای آنالیز آلودگی در یک منطقه مشخص از آنها استفاده شود.

#### ج) صدف های دوکفه ای باریک (Mussels):

پس از صدف های خوراکی این دسته از نمونه ها در اولویت هستند.

#### د) ماهی (Fish):

به منظور آنالیز سموم در ماهی ها باید فیله ماهی را جدا کرد چون چربی کمتری دارد. باید در نظر داشت که نباید کبد ماهی را آزمایش نمود چون چربی بالایی دارد. بهتر است برای تعیین میزان بار آلودگی در یک منطقه مشخص از ماهی استفاده نگردد، زیرا ماهی در قسمت های مختلف دریا شنا کرده و نمی تواند نشان دهنده میزان پراکنش آلودگی در یک منطقه مشخص باشد.



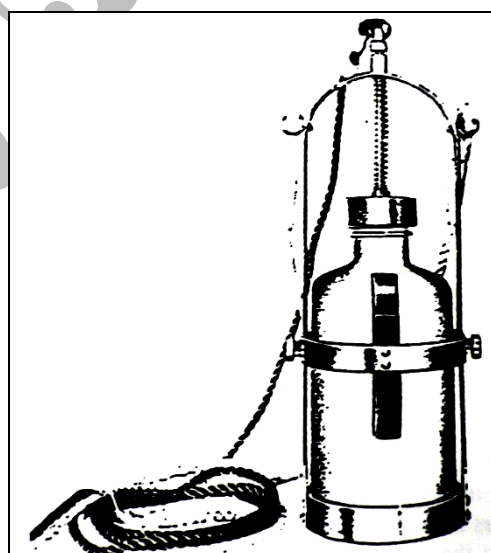
شکل ۱-۶- محل برش فیله ماهی

ه) **بنتوز (Bentos):** برای نمونه برداری از Bentos بهتر است از نمونه بردار Reineck Corer استفاده نمود.

و) **دو کفه ای ها (Bivalves):** باید نمونه را از قسمت‌های نرم صدفهای دو کفه ای تهیه کرد.

### ۱-۲-۳- نمونه برداری از آب

برای نمونه برداری از رودخانه ها و آبهای سطحی ارتفاع استاندارد، عمق یک متری آب است. بنابراین بطری نمونه بردار را به عمق یک متری فرستاده و نمونه برداری انجام شود.



شکل ۱-۷- بطری نمونه بردار آب

برای نمونه برداری از دریای آزاد به حدود ۱۵۰-۱۰۰ لیتر آب نیاز است که برای نمونه برداری آن باید از دستگاههای مخصوص استفاده شود.

در هر حال برای نمونه برداری از آب باید نکات ذیل را مورد توجه قرار داد:

۱- برای نمونه برداری از مواد آلی مانند هیدروکربنهای نفتی و کلره نباید از ظروف PVC استفاده شود. در این موارد از ظروف فلزی یا شیشه ای با رنگ زرد کهربایی (یا ظروف شیشه ای مات) که دارای درپوش تفلونی هستند و دارای حجم ۳ تا ۴ لیتر می باشند استفاده می گردد.

۲- پیشنهاد می شود از هر نمونه دوبار گرفته شود تا زمانیکه نمونه طی حمل و نقل و عملیات و ..... از بین رفت پشتیبان وجود داشته باشد.

۳- نمونه برداری در سه ارتفاع صورت پذیرد:

الف) یک متر زیر سطح آب

ب) ارتفاع متوسط و یک متر بالای بستر دریا

ج) اگر ارتفاع اجازه می دهد در ارتفاع ده متری

۴- قبل از نمونه گیری باید ظروف بصورت زیر شسته و آماده شوند: آب داغ و محلول شستشو (مایع ظرفشویی یا هر محلول شستشوی دیگر مانند\* (Extran MA®) آب، استون، هگزان (حلالی که در استخراج بکار می رود).

۵- در مورد آبهای کم عمق بین درپوش و دهانه ظرف را با فویل آلومینیومی به گونه ای ببندید که سمت مات فویل به طرف ظرف می باشد. به این طریق از ورود آلودگیهای درپوش به نمونه جلوگیری می شود. لازم به ذکر است ابتدا فویل باید توسط متانول شسته و در آن ۲۵۰ درجه سانتیگراد خشک شود. همچنین فویل را با دست نباید لمس کرد بلکه از دستکش استفاده می شود.

۶- اگر طی ۳-۴ ساعت پس از نمونه برداری استخراج ترکیبات نفتی صورت نمی گیرد، به ازای هر لیتر ۱۰ میلی لیتر مخلوط ۷ به ۳ (حجمی/حجمی) هگزان: دی کلرومتان را داخل بطری ریخته و یک دقیقه هم بزنید. در این حالت دیگر نیاز به منجمد کردن نمونه آب نیست چون حلال فوق مانع فعالیت باکتریها می شود.

\* محلول شستشو ساخت شرکت مرک



۷- از آنجائیکه معمولاً غلظت آلاینده های نفتی در آب اندک و در حد  $\mu\text{g/L}$  (ppb) است، لذا عملیات نمونه برداری و نگهداری باید به نحوی صورت پذیرد که آلودگی وارد ظرف نمونه نشود.

۸- برای حفاظت از نمونه های آب لازم است نمونه ها در تاریکی نگهداری شوند.

۹- نمونه ها را باید در اسرع وقت و بعد از نمونه برداری آنالیز نمود.

#### ۱-۴- اهمیت آماده سازی نمونه

انجام آنالیز با دقت و صحت قابل قبول بدون فرآیندهای آماده سازی مناسب امکان پذیر نخواهد بود. با آماده سازی از طریق یکسان نمودن شرایط اولیه از لحاظ عوامل متغیر فیزیکی برای تمام نمونه ها و حذف عوامل تداخلگر زمینه مناسب فراهم می شود تا آنالیز پارامترهای مورد نظر با صحت، تکرار پذیری (دقت) و تکثیر پذیری بالایی انجام گیرد. بنابراین امکان مقایسه نتایج به دست آمده با یکدیگر و انجام بررسی های مقایسه ای فراهم می شود.

برخی مراحل آماده سازی بر اساس نوع آنالیز و نوع نمونه عبارتند از:

الف) شستشوی ظروف

ب) خشک کردن

ج) آسیاب کردن

د) الک نمودن

ه) یکنواخت سازی

#### ۱-۴-۱- خشک کردن

درصد رطوبت در نمونه های مختلف (خاک، رسوب و Biota) متفاوت است. رطوبت نمونه ها با گذشت زمان و در مجاورت هوا دائماً در حال تغییر است. نتایج آنالیز باید بر اساس وزن خشک ثابت ارائه شود تا اثر این عامل متغیر حذف شده و امکان مقایسه بین نتایج به دست آمده برای نمونه های مختلف در نقاط مختلف با شرایط محیطی متفاوت فراهم آید.

#### ۱-۴-۲- وزن خشک

برای خشک کردن نمونه ها از روش انجماد (Freeze Dry) به جای حرارت (Oven Dry) استفاده می شود. استفاده از این روش به چند دلیل اصلی از جمله موارد ذیل صورت می پذیرد. یکی از این موارد بالا بودن میزان چربی موجود در نمونه های Biota است که برای خشک کردن آنها نمی توان از حرارت آن استفاده کرد. دلیل دیگری که می توان مطرح کرد فرار بودن پارامترهای مورد اندازه

گیری است. ترکیبات نفتی از جمله آروماتیک ها ترکیبات فراری هستند و اگر عمل خشک کردن با استفاده از حرارت باشد مقادیر زیادی از این ترکیبات بخار شده و نتایج آنالیز از دقت برخوردار نخواهد بود. بنابراین تمامی نمونه ها در ابتدا باید فریز درای شوند.



شکل ۱-۸- دستگاه فریز درایر

### ۱-۴-۳- تعیین وزن خشک

تعیین وزن خشک در نمونه های مختلف (خاک، رسوب و Biota) یکسان است. به طوریکه ۱-۲ گرم از نمونه را به دقت وزن کرده و داخل فریز درایر قرار می دهیم. پس از ۲۴ ساعت نمونه را بیرون آورده و آن را وزن می کنیم. مجدد ۲۴ ساعت دیگر داخل فریز درایر قرار می دهیم. سپس مجدد نمونه را از فریز درایر بیرون آورده و آن را وزن می کنیم. اگر اختلاف وزن این دو کمتر از ۰/۵ درصد باشد، وزن خشک و یا نسبت وزن خشک به وزن اولیه را مشخص می کنیم. در غیر این صورت خشک کردن یعنی قرار دادن نمونه در فریز درایر را آنقدر ادامه می دهیم تا اختلاف به کمتر از ۰/۵ درصد برسد.

$$\text{وزن خشک} \% = \frac{\text{وزن پس از قرار دادن در فریز درایر}}{\text{وزن اولیه}} \times 100$$

Reference: MOOPAM (Manual of oceanographic observations and pollutant analyses methods)