

前 言

本标准等同采用 ISO 14851:1999《水性培养液中材料最终需氧生物分解能力的测定 采用测定密闭呼吸计中需氧量的方法》(英文版)。全国塑料制品标准化中心生物分解材料工作组在 1999 年~2002 年间进行了一系列实验室试验,在验证试验的基础上制订了本标准。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F 为资料性附录。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国塑料制品标准化技术委员会归口。

本标准由武汉华丽环保科技有限公司、深圳市绿维科技有限公司负责起草,天津丹海股份有限公司、宁波天安生物材料有限公司、内蒙古蒙西高新技术集团有限责任公司、国家塑料制品质量监督检验中心(北京)参加起草。

本标准主要起草人:翁云宣、王世和、张先炳、陈学军、孔 力、刘嘉藩、杨惠娣、陈家琪、叶新建、毛国玉、徐凤霞、刘彩霞。

引 言

随着塑料使用量的增加,回收和处理已变成一个热点,但塑料要完全回收是困难的。另外,一些难回收的塑料如渔具、农业用覆盖物和水溶性的聚合物等,常常从封闭的垃圾处理循环系统中泄漏到环境中去。采用可生物分解材料是解决这类环境问题的有效途径之一。被送至堆肥设备的产品或包装材料应尽可能地生物分解。所以测定这些材料可能的生物分解能力和获得在自然环境中它们生物分解能力的指标就很重要。为了规范测定水性培养液中材料最终需氧生物分解能力的方法,特制定本标准。

警告:废水、活性污泥、土壤及堆肥中可能含有潜在致病菌,因此,处理时应采取适当的防护措施。处理毒性试验化合物或性质未知的化合物时须特别小心。

水性培养液中材料最终需氧生物分解能力的测定

采用测定密闭呼吸计中需氧量的方法

1 范围

本标准规定了在试验条件下将试验材料曝置于由活性污泥、堆肥或土壤配制的水性培养液中,并通过测量密闭呼吸计内消耗的氧气量来测定材料包括含添加剂的塑料的需氧生物分解能力的方法。

如果采用未经适当处理的活性污泥作为接种物时,本试验仅模拟在自然含水环境中的生物分解过程;如果使用混合的或预曝置的接种物时,本方法可用来测定试验材料潜在的生物分解性能。

本标准采用的试验条件并不一定为产生最大生物分解性能的最佳条件,但本标准设计上是用来测定材料的潜在生物分解能力或表示自然环境中材料的生物分解性能。

通过计算碳平衡量可提高对生物分解性能评估的准确度(可选项,见附录 E)。

本方法适用于以下材料:

- 天然和(或)合成聚合物、共聚物或它们的混合物;
- 含有如增塑剂、颜料或其他化合物等添加剂的塑料材料;
- 水溶性聚合物;
- 在试验条件下,不会对接种物内微生物产生抑制作用的材料,抑制作用可应用抑制控制或其他适当方法来测得。如果试验材料对接种物有抑制作用时,可在较低的试验浓度下使用其他接种物或已预曝置的接种物。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

ISO 8245:1999 水质 总有机碳(TOC)及溶解有机碳(DOC)的测定指南

ISO 9439:1999 水质 水性培养液中有机化合物最大需氧生物分解能力的测定 二氧化碳释放试验

ISO 10634:1995 水质 用于连续测定难溶于水的有机化合物在水介质中生物分解能力培养液的配制与处理的指导原则

ISO/TR 15462:1997 水质 生物分解能力的选择性试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

最终需氧生物分解 ultimate aerobic biodegradation

在有氧条件下,有机化合物被微生物分解为二氧化碳(CO₂)、水(H₂O)及其所含元素的矿化无机盐和新的生物质。

3.2

活性污泥 activated sludge

废水好气处理时,在溶解氧的存在下,由细菌和其他微生物繁殖而产生的生物质。

3.3

活性污泥中的悬浮固体浓度 concentration of suspended solids in an activated sludge

已知体积的活性污泥经过滤或离心后,于 105℃ 下干燥至恒重所得到的固体量。

3.4

生化需氧量 biochemical oxygen demand, *BOD*

在特定条件下,试验材料在水中由于需氧生物氧化作用所消耗的溶解氧的质量浓度,以每毫克或克试验材料吸收氧气的毫克数表示(mg 吸收氧气/mg 或 g 试验材料)。

3.5

理论需氧量 theoretical oxygen demand, *ThOD*

将试验材料完全氧化所需氧气的理论最大值,可由分子式计算得到,以每毫克或克试验组分吸收氧气的毫克数表示(mg 吸收氧气/mg 或 g 试验组分)。

3.6

总有机碳 total organic carbon, *TOC*

悬浮或溶解在水中的有机物所含有的总碳量。

3.7

溶解有机碳 dissolved organic carbon, *DOC*

溶解在水中、无法以特别相分离方法(如 40 000 $m \cdot s^{-2}$ 离心分离 15 min 或孔径 0.2 $\mu m \sim 0.45 \mu m$ 过滤膜过滤)而分离的有机碳。

3.8

迟滞阶段 lag phase

从试验开始一直到微生物适应或选定了分解物,并且试验材料的生物分解程度已经增加至最大生物分解率 10% 时所需要的天数。

3.9

最大生物分解率 maximum level of biodegradation

试验中,试验材料不再发生生物分解时的生物分解程度,以百分率表示。

3.10

生物分解阶段 biodegradation phase

从迟滞阶段结束至达到最大生物分解率的 90% 时所需的天数。

3.11

平稳阶段 plateau phase

从生物分解阶段结束至试验结束时所需的天数。

3.12

预曝置 pre-exposure

在试验材料的存在下对培养液进行的预培养,目的是通过适应和(或)选择微生物来增强培养液对试验材料的生物分解能力。

3.13

前处理 pre-conditioning

在没有试验材料存在的情况下,对培养液预培养,目的是使微生物适应试验条件以提高试验效果。

4 原理

在水性系统中利用好气微生物来测定材料的生物分解率。试验混合物包含一种无机培养基、有机碳浓度介于 100 mg/L \sim 2 000 mg/L 的试验材料(碳和能量的唯一来源),以及活性污泥或堆肥或活性土壤的悬浮液制成的培养液。此混合物在呼吸计内密封烧瓶中被搅拌培养一定时间,试验周期不能超

过6个月。在烧瓶的上方用适当的吸收器吸收释放出的二氧化碳,测量生化需氧量(*BOD*),例如,通过测量在呼吸计内烧瓶中维持一个恒定体积气体所需氧的体积或自动地或人工地测量体积或压强的变化(或两者兼测),可使用附录C中的呼吸计,同时也可使用如ISO 10708里描述的两相密封瓶(见附录D)。

生物分解的水平通过生化需氧量(*BOD*)和理论需氧量(*ThOD*)的比来求得,用百分率表示。在测定*BOD*过程中必须考虑可能发生的硝化作用的影响。由生物分解曲线的平稳阶段的测定值,确定试验材料最大生物分解率。

此外,可选择性计算碳平衡量以对生物分解提供附加信息(见附录E)。

与ISO 9408不同的是,ISO 9408是使用各种不同的有机组分,而本标准特别地制订用于测定材料的生物分解能力。

特殊要求影响到培养液、试验培养基的选择时可通过碳平衡量的计算来修正生物分解能力的评价。

5 试验环境

培养应在黑暗的或弱光的密闭空间中进行,该空间应没有抑制微生物繁殖的蒸汽,并保持恒温 $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,或根据使用的培养液和被评估的环境选择其他合适的温度。

注:使用堆肥培养液时,适宜采用较高的温度。

6 试剂

使用分析纯级试剂。

6.1 蒸馏水或去离子水

不含毒性物质(特别是铜),溶解有机碳(DOC)含量 $\leq 2\text{ mg/L}$ 。

6.2 试验培养基

根据试验目的不同可选用不同的试验培养基。例如:模拟自然环境时可使用标准的试验培养基;如果试验材料浓度较高时,可使用具有较高缓冲能力和培养基浓度的优化试验培养基。

6.2.1 标准试验培养基

6.2.1.1 溶液A

溶解:

KH_2PO_4 (无水)	8.5 g;
K_2HPO_4 (无水)	21.75 g;
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33.4 g;
NH_4Cl	0.5 g

于水(见6.1)中,加水(见6.1)稀释至1 000 mL。

注:正确配制时,溶液的pH值应为7.4。

6.2.1.2 溶液B

溶解 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.5 g于水(见6.1)中,加水(见6.1)稀释至1 000 mL。

6.2.1.3 溶液C

溶解 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.4 g于水(见6.1)中,加水(见6.1)稀释至1 000 mL。

6.2.1.4 溶液D

溶解 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g于水(见6.1)中,加水(见6.1)稀释至1 000 mL。

为避免溶质析出,本溶液应在临用前配制,或在溶液中加入一滴浓HCl或一滴浓度为0.4 g/L的乙二胺四乙酸(EDTA)水溶液。

6.2.1.5 制备

在培养瓶中依次加入水(见6.1)500 mL、溶液A 10 mL和溶液B、C、D各1 mL,加水(见6.1)稀释

至 1 000 mL。

6.2.2 优化试验培养基

优化试验培养基经过高度缓冲并含较多无机营养物,在试验期间,即使试验材料总有机碳含量较高时,也应保持恒定的 pH 值。本培养基中含有磷(P)2 400 mg/L 和氮(N)50 mg/L,因此适合于含有有机碳浓度接近 2 000 mg/L 的试验材料。如果试验材料总有机碳含量更高或更低时,可增加或减少氮的含量,以维持碳氮比(C : N)为 40 : 1。

6.2.2.1 溶液 A

溶解:

KH_2PO_4 (无水)	37.5 g;
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	87.3 g;
NH_4Cl	2.0 g;

于水(见 6.1)中,加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL。

6.2.2.2 溶液 B

溶解 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.5 g 于水(见 6.1)中,加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL。

6.2.2.3 溶液 C

溶解 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.4 g 于水(见 6.1)中,加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL。

6.2.2.4 溶液 D

溶解 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g 于水(见 6.1)中,加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL。

6.2.2.5 溶液 E(微量元素溶液,可选项)

在 10 mL HCl 溶液(25%, 7.7 mol/L)中按以下顺序溶解:

ZnCl_2	70 mg;
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100 mg;
H_3BO_3	6 mg;
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	190 mg;
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 mg;
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	240 mg;
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36 mg;
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33 mg;
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	26 mg;

加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL。

6.2.2.6 溶液 F(维生素溶液,可选项)

在 100 mL 水(见 6.1)中溶解:

维生素 H(biotine)	0.6 mg;
烟酰胺(niacinamide)	2.0 mg;
对-氨基苯甲酸酯(<i>p</i> -aminobenzoate)	2.0 mg;
泛酸(pantothentic acid)	1.0 mg;
盐酸吡哆醛(pyridoxal hydrochloride)	10 mg;
维生素 B ₁₂ (cyanocobalamine)	5.0 mg;
维生素 B ₉ (folie acid)	2.0 mg;
维生素 B ₂ (riboflavin)	5.0 mg;
DL-硫辛酸(DL-thioctic acid)	5.0 mg;
二氯化硫胺(thiamine dichloride)	1.0 mg。

或使用在 100 mL 水(见 6.1)中溶解酵母萃取物 15 mg 的溶液。

使用薄膜过滤器(见 7.4)过滤溶液并灭菌。

注: 溶液 E 和 F 为可选项, 如果所用足够浓度的培养液例如活性污泥、土壤或堆肥等时, 可以不选用。建议准备 1 mL 的溶液冷藏备用。

6.2.2.7 制备

在培养瓶中先后加入水(见 6.1)800 mL、溶液 A 100 mL 和溶液 B、C、D 各 1 mL(可选项, 溶液 E 和 F 各 1 mL)中, 然后加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL, 测量其 pH 值。

注: 正确配制时, 溶液的 pH 值应为 7.0 ± 0.2 。

6.3 焦磷酸盐溶液

溶解无水 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 2.66 g 于水(见 6.1)中, 加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL。

6.4 二氧化碳吸收剂

最好为碱石灰颗粒或其他适宜的吸收剂。

7 仪器和设备

所有玻璃器皿必须清洗干净, 尤其不能含有有机物或毒性物质。

除需要实验室常用仪器外, 还需要下列装置:

7.1 密闭呼吸计

装有搅拌器和其他必需配备的试验容器(玻璃烧瓶), 并放置在恒温箱或者自动调温装置(如水浴)中, 示例见附录 C。

注: 能准确测定生化需氧量的任何呼吸计均可使用。若为自动连续测量及补氧装置, 则可避免生物分解过程中缺氧或抑制微生物活性的情形发生。也可使用两相密闭瓶取代呼吸计(见附录 D)。

7.2 分析仪器

例如测量总有机碳(TOC)和溶解有机碳(DOC)的仪器(符合 ISO 8245)。

7.3 测量硝酸盐和亚硝酸盐浓度的分析仪器

注: 建议先作定性试验确认是否有硝化反应发生。如果在试验培养基中发现有硝酸盐/亚硝酸盐时, 则需使用适当的方法如离子色谱法作定量试验。

7.4 过滤器设备

离心分离机或带有明显不吸收也不释放有机碳的过滤膜(0.45 μm 孔径)的过滤装置。

7.5 分析天平(常规实验室装置)

7.6 pH 计(常规实验室装置)

8 程序

8.1 试验材料

试验材料应已知质量且含有足量的碳, 以使产生的生化需氧量(BOD)能被使用的呼吸计检测到。由化学分子式或由元素分析测定理论需氧量($ThOD$) (见附录 A)和总有机碳(TOC) (ISO 8245)。使用的试验材料浓度至少为 100 mg/L, 相当于 $ThOD$ 170 mg/L 或 TOC 60 mg/L。只有当呼吸计具有足够灵敏度时才可使用较低的浓度。试验材料的最大浓度受供给呼吸计氧气量和所用的试验培养基的限制。当使用优化试验培养基(6.2.2)时, 试验材料浓度应使 TOC 不超过 2 000 mg/L, 即碳氮比(C:N)约为 40:1。如需要测定更高浓度时, 则增加试验培养基中的氮含量。

注 1: 如要模拟自然环境中生物分解过程时, 推荐使用标准培养基和浓度为 100 mg/L 的试验材料。

注 2: 试验材料最好为粉末状, 也可是膜、碎片、颗粒或成型制品。试验材料的形状会影响其生物分解能力。如果用不同种类的材料作比较, 最好采用相同的形状。如果试验材料为粉末或颗粒时, 应使用粒径分布窄的粒子, 建议最大粒径为 250 μm 。同时, 所使用试验仪器的尺寸大小也应以试验材料的形状而定。要保证不会由于试验条件(如选用的搅拌的型式)而出现明显的机械偏差。试验材料的加工过程(例如混合物加工成粉末)应不

会明显地影响材料的分解行为。可以选择性记录聚合物试验材料的氢(H)、氧(O)、氮(N)、磷(P)和硫(S)的含量及试验材料的相对分子质量,如利用液相色谱法(参考 ASTM D 3536:1991 或任何其他适用的标准方法)来测定。试验材料最好不含添加剂,如增塑剂。如果试验材料中确实含有此类添加剂时,在评估聚合材料本身的生物分解能力时,也需要有关添加剂的生物分解能力的资料。

有关处理难溶于水的化合物的详情,请参考难溶于水的试验材料的处理,见 ISO 10634。

8.2 参比材料

使用苯胺和/或有明确定义的可生物分解聚合物(如微结晶纤维素粉末,无灰纤维素滤纸或聚 β -羟基丁酸酯)作为正控制参比材料,总有机碳(TOC)含量、形状和尺寸都尽量和试验材料相同。

可选用与试验材料相同形状的不可生物分解的聚合物(如聚乙烯)作为负控制参比材料。

8.3 培养液的制备

培养液来自于主要处理生活污水的污水处理厂内的活性污泥。活性污泥从活性的有氧环境中获得,可用于较广范围地域多种材料的测试。另外,土壤和(或)堆肥的悬浮液也能用作培养液,对于某些试验材料来说,真菌的活性对于生物分解很重要。当需要测定废弃处理系统内的生物分解能力时,应从该系统(环境)中收集培养液。

可按 8.3.1 和 8.3.2 制备培养液,或由它们的混合物制备。如果在使用前培养液的内生呼吸量过高时,可在使用前通过通风方式稳定培养液。恒定试验温度(见 5)。

注:测定所使用培养液的菌落种数(colony-forming unit, cfu)可能很有帮助,试验用混合物最好含有 10^6 cfu/mL。

8.3.1 来源于污水处理厂的培养液

从正常运行的污水处理厂或主要处理生活污水的实验工厂收集活性污泥样品,搅拌均匀,于需氧的环境下妥善保存样品,且最好在收集的当天(至少在 72 h 内)使用。

在使用前测定悬浮物的浓度(见 ISO 11923),必要时可通过沉淀方式来浓缩污泥,以便使加入到试样中的污泥体积最小。加入合适体积污泥使最后混合物中悬浮固体浓度范围在 30 mg/L ~ 1 000 mg/L。

注 1:当模拟自然环境中的生物分解过程或当进行碳平衡量测定时(见附录 E),建议培养液中悬浮物的浓度为 30 mg/L。当固体物质会影响碳平衡量的测定时,建议按以下步骤制备培养液:取 500 mL 活性污泥于搅拌机,中速(或适宜的高速)搅拌 2 min,使其均匀。静置至上层的液体中不含大量的悬浮物(至少 30 min)。将足量的上层液体轻轻倒入测试容器中,以得到浓度(V/V)为 1%~5%的培养液。避免带入污泥粒子。

注 2:培养液可以进行前处理。但是一般不使用经过预曝置的培养液,尤其在模拟自然环境中生物分解行为的标准试验时不应使用。依照试验目的,也可使用经过预曝置的培养液,但在试验报告中应清楚地阐明(例如:生物分解百分率=X%,使用了经过预曝置的培养液)并详细说明预曝置的方式。预曝置的培养液可通过在不同的条件下在实验室进行适宜的生物分解试验来获得(见 ISO/TR 15462),也可从环境条件相近的场所(例如被污染的场所或工业废弃物处理场)中收集得到。

8.3.2 来源于土壤或堆肥的培养液

将 10 g 未经灭菌的肥沃土壤或来自于处理有机废物的堆肥厂的堆肥,放入 100 mL 试验培养基中或焦磷酸盐溶液(见 6.3)(常用于土壤微生物)中。静置 30 min,用粗糙多孔的滤纸过滤悬浮液,将滤液倒入试验容器中,以得到菌种浓度(V/V)为 1%~5%的培养液,必要时可以增加培养液的量,但这可能在建立碳平衡量时产生问题。使用堆肥可增加试验容器中真菌的数量,提高材料的生物分解能力。此时,应在试验报告中指明所用堆肥的状态(例如:熟肥,50℃热态堆肥)。

如果需要较高浓度的培养液,可在试验培养基中加入较多量的土壤或堆肥,加水(见 6.1)稀释至适当的培养浓度。

8.4 试验步骤

准备下列数量的烧瓶(试验瓶):

- a) 两个盛装试验材料的烧瓶(符号 F_T);
- b) 两个用于空白试验烧瓶(符号 F_B);

- c) 一个使用参比材料用于检测培养液活性的烧瓶(符号 F_c)；
另外,如果需要的话:
- d) 一个用于检查试验材料中可能出现的非生物分解作用或非微生物变化作用如水解的烧瓶(符号 F_s)。在 F_s 中的试验溶液应先经过灭菌,例如高压灭菌(用高压消毒锅)或加入一种适宜的毒性无机化合物来抑制微生物的活性,例如用浓度为 10 g/L 的 $HgCl_2$ 溶液,用量为 5 mL/L。如果必要时,在试验过程中加入等量的毒性物质;
- e) 一个装有与试验材料相同状态的非生物可分解聚合物(如 PE)用于负控制的烧瓶(符号 F_N)；
- f) 一个用于检查试验材料对微生物活性可能存在的抑制作用的烧瓶(符号 F_i)，应注意试验材料和参比材料中的碳与培养基中氮的比率(C:N)至少为 40:1,必要时可增加氮的量。

按表 1 中所列内容,往试验瓶中加入适量的培养液(见 8.3)。

测量瓶内的 pH 值,将其调至 pH=7。将二氧化碳吸收剂加入到呼吸计(见附录 C)的呼吸器中。按表 1 所示,往相应的实验瓶中分别加入试验材料(见 8.1)、参比材料和负控制材料(见 8.2)。如果要测定碳平衡量(见附录 E),可在培养期开始和结束时分别从每个烧瓶或从单独设置的烧瓶中取出足量已知体积的培养液用于测定溶解有机碳(DOC)和生物质。当调整最终体积或计算试验结果时要考虑到移出的体积。

把烧瓶放在恒定温度的环境中,且使所有的容器达到试验温度,连接密封试验瓶,把它们放入呼吸计中,开动搅拌器。记录仪表上必要的读数(如手动情况下),并检查耗氧记录仪是否运行正常(自动呼吸计)。也可使用附录 D 所述的两相密闭瓶。

表 1 试验材料和参比材料的最后分配表

试验瓶	试验材料	参比材料	培养液
F_T 试验瓶	+	-	+
F_T 试验瓶	+	-	+
F_B 空白瓶	-	-	+
F_B 空白瓶	-	-	+
F_c 培养液检测瓶	-	+	+
F_s 非生物分解检测瓶(可选项)	+	-	-
F_i 抑制控制瓶(可选项)	+	+	+
F_N 负控制瓶(可选项)	-	+	+

当生化需氧量(BOD)达到稳定阶段后并预计没有更进一步的生物分解时,结束试验。

最大试验周期为 6 个月。在进行长期试验时应特别注意试验系统,如试验容器与连接处的密封性等。

在试验结束时,立即测定烧瓶 F_T 中(见注)硝酸盐和亚硝酸盐的浓度,或者取适当样品保存待测。用这些值去修正由于硝化作用所产生的生物分解程度的偏差(见附录 B)。

注:烯丙基硫脲(甲醛)(allylthiourea)只有在短时间的培养液培养过程中,可抑制硝化作用,因为它是生物分解的。

因此不推荐添加烯丙基硫脲来预防硝化作用。经验表明,当不使用抑制剂时,如培养液浓度(V/V)较低[约 1%]情况下,即使在长期培养期间,也不会发生硝化作用。

9 计算与结果的表达

9.1 计算

使用适当的呼吸计,依照仪器指示的使用方法读取每个烧瓶氧气的消耗量。

按式(1)计算单位试验材料的生化需氧量(BOD_s)

$$BOD_s = \frac{BOD_t - BOD_{Bt}}{\rho_{TC}} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

BOD_s ——单位试验材料的 BOD 值,以每克试验材料的毫克数表示,单位为毫克/克(mg/g);

BOD_t ——在时间 t 时包含试验材料的烧瓶 F_T 的 BOD 值,单位为毫克/升(mg/L);

BOD_{Bt} ——在时间 t 时空白 F_B 的 BOD 值,单位为毫克/升(mg/L);

ρ_{TC} ——烧瓶 F_T 的反应混合物中试验材料的浓度,单位为毫克/升(mg/L)。

按式(2)计算生物分解百分率 D_t ,

$$D_t = \frac{BOD_s}{ThOD} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

以相同方式计算参比材料烧瓶 F_C 的 BOD 值和生物分解百分率,再计算非生物分解校正值烧瓶 F_S 、抑制控制烧瓶 F_I 和负控制烧瓶 F_N 的 BOD 值和生物分解百分率。

注: $ThOD$ 的求法见附录 A,如果硝酸盐或亚硝酸盐测得的浓度较大时,应考虑因为硝化作用引起的氧气消耗量(见附录 B)。如要计算碳平衡量,则使用附录 E 给出的资料。

9.2 结果的表达与解释

将每个烧瓶各个测定周期的 BOD 值和生物分解百分率编辑成表。对每个容器,以时间为横坐标对 BOD 与生物分解百分率作图。如果各个测量值的偏差不超过 20%,则采用平均值,否则,作出每一个堆肥容器的生物分解曲线。

生物分解率的最大值由生物分解曲线平稳阶段的平均值或最高值求得(例如:当曲线开始下降时或在平稳阶段缓慢增加时,来表征试验材料的生物分解程度)。如果已测定碳平衡量,这一测定结果则表示了总的生物分解程度。

试验材料的吸湿性和形状可能会对试验结果产生影响,因此试验尽可能选用化学结构类似的材料来进行比较。

当试验结果显示较低生物分解率时,试验材料的毒性资料可能有助于结果的解释。

10 结果的有效性

只有试验符合下列事项,才可认为有效:

- (1) 试验结束时,参比材料的生物分解百分率 > 60%;
- (2) 在试验结束时每只堆肥容器的生物分解百分率之间的相对偏差不超过 20%;
- (3) 在试验结束时空白烧瓶 F_B 的 BOD 不超过依据经验值的上限(这个值依赖于接种物的数量,例如,干固体 30 mg/L,实验室间试验(interlabatory test)结果显示 BOD 约在 60 mg/L);

如果抑制检测瓶 F_I (如选用时)的生物分解百分率 < 25%,并没有观察到试验材料有明显的生物分解状况,可以认为试验材料具有抑制性;

如果非生物分解检查瓶 F_S (如选用时)的 BOD 值较大时(大约 10%),可能已发生非生物分解过程;

负控制瓶 F_N (如选用时),应测试不到明显的 BOD 值;

如果不能满足以上条件,则使用另一预先调节或已曝置的培养液来重复本试验。

11 试验报告

试验报告应至少包括以下内容:

- a) 依据标准;
- b) 能说明此项试验和参比材料的所有资料,包括它们的有机碳(TOC)含量、理论需氧量($ThOD$)、化学组成、化学式(如果已知)、形状、状态、数量及浓度;

- c) 主要试验参数,包括试验体积、所用培养基、培养温度及最终的 pH 值;
- d) 所用培养液的来源及用量,包括预曝置的细节及所用堆肥的状态;
- e) 所使用的分析技术,包括呼吸计、TOC、硝酸盐/亚硝酸盐的测定;
- f) 试验材料和参比材料获得的所有试验结果(列表和图示),包括测得的 *BOD* 值、生物分解百分率及这些参数相对于时间参数的各自曲线和硝酸盐/亚硝酸盐浓度;
- g) 迟滞阶段、生物分解阶段所用时间、达到最大生物分解百分率所用时间以及整个试验所用时间。

如有可选项的试验时,应增列下列内容:

- h) 非生物分解检查瓶 F_s 、抑制控制瓶 F_I 及负控制瓶 F_N 的测试结果;
- i) 碳平衡量的测定结果,例如包括:
 - 1) 以 *BOD* 为基准的生物分解率,估算试验材料中碳氧化成二氧化碳的量;
 - 2) 在培养阶段由于水溶性物质而使培养液增加的 DOC 的量;
 - 3) 试验过程中生物质内有机碳的增加量;
 - 4) 试验结束时,残余聚合物中的碳含量;
 - 5) 测得的总碳量,用相对于试验材料的含碳量的百分率来表示。
- j) 经过培养的试验混合物中的菌落种数(cfu/mL);
- k) 任何其他相关数据(如:样品的初始相对分子质量,残余聚合物的相对分子质量)。

附 录 A
(资料性附录)
理论需氧量(ThOD)

A.1 ThOD 的计算

相对分子质量为 M_r 的化合物 $C_c H_h Cl_{cl} N_n S_s P_p Na_{na} O_o$, 如果已知它的化学组成或者可以经过元素分析测得时, 可用下式计算 ThOD:

$$ThOD = \frac{16(2c + 0.5(h - cl - 3n) + 3s + 2.5p + 0.5na - o)}{M_r} \dots\dots\dots(A.1)$$

此计算假设碳转化成二氧化碳, 氢转化成水, 磷转化成五氧化二磷, 硫转化成正六价氧化状态, 卤素以卤化氢形式脱除。氮磷硫的氧化物必须经过分析确认, 此计算还假设氮成为硝酸盐、亚硝酸盐, 对于硝化作用的影响见附录 B。

A.2 示例: 聚(β -羟基丁酸酯)(PHB)

综合化学式: $C_4 H_6 O_2$, $C=4$, $H=6$, $O=2$; 相对分子质量 $M_r=86$

$$ThOD = \frac{16(2 \times 4 + 0.5 \times 6 - 2)}{86} \dots\dots\dots(A.2)$$

$ThOD=1.6744 \text{ mg/mg}$ PHB= 1.6744 mg/g PHB

A.3 示例: 聚乙烯/淀粉/丙三醇的混合物

组分	化学式	ThOD/(mg/g)	组分含量		ThOD/(mg/瓶)
			质量分数/%	mg/瓶	
聚乙烯	$(C_2 H_4)_n$	3 400	50	500	1 700
淀粉	$(C_6 H_{10} O_5)_n$	1 190	40	400	476
丙三醇	$C_3 H_8 O_3$	1 200	10	100	120
总计			100	1 000	2 296

附录 B

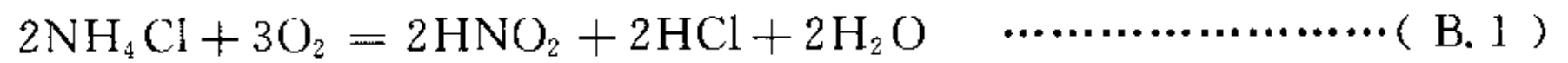
(资料性附录)

因硝化作用引起的 *BOD* 值的修正

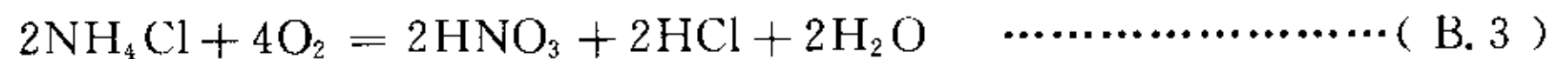
B.1 硝化作用的影响

BOD 值受硝化作用的影响,在计算含有氮的试验材料内碳氧化的生物分解率时,为避免重大误差,它们必须被修正。如果试验材料不含氮时,通常情况下,误差是可以忽略的。

铵盐和含氮试验化合物在生物分解过程中被氧化成亚硝酸盐或硝酸盐,由于反应是连续的(由不同的菌种引起的),亚硝酸盐的浓度会增加或减小,在后面的例子中产生 1 当量浓度的亚硝酸盐,化学反应如下:



合并:



从上述式中可以看出:

2 mol(28 g)氨态氮(NH_4Cl 与无机培养基混合物)氧化成亚硝酸盐,需要 3 mol(96 g)的氧(BOD_{NO_2}),即氮需氧量系数为 3.43(96/28)。

2 mol(28 g)氨态氮(NH_4Cl 与无机培养基混合物)氧化成硝酸盐,需要 4 mol(128 g)的氧(BOD_{NO_3}),即氮需氧量系数为 4.57(128/28)。

硝化作用的量可由在试验结束时测量在 F_T 瓶中培养液内硝酸盐及亚硝酸盐的浓度求得。建议先作定性试验,确认是否发生任何硝化作用,若发现有任何硝酸盐及亚硝酸盐的存在时,则需进行定量试验。

试验结束时,由氮氧化所产生的 *BOD* 部分即 BOD_N ,按式(B.4)计算,单位为 mg/L。

$$BOD_N = (\rho_{\text{NO}_3} \times 4.57) + (\rho_{\text{NO}_2} \times 3.43) \quad \dots\dots\dots(\text{B.4})$$

式中:

ρ_{NO_3} ——试验结束时 F_T 瓶中硝酸盐氮的浓度,单位为毫克/升(mg/L);

ρ_{NO_2} ——试验结束时 F_T 瓶中亚硝酸盐氮的浓度,单位为毫克/升(mg/L);

4.57——形成硝酸盐的需氧系数;

3.43——形成亚硝酸盐的需氧系数。

试验结束时,由碳氧化所产生的 *BOD* 部分,即 BOD_C ,按式(B.5)计算,单位为毫克/升(mg/L)。

$$BOD_C = BOD_G - BOD_N - BOD_{Bt} \quad \dots\dots\dots(\text{B.5})$$

式中:

BOD_G ——试验结束时在 F_T 瓶所测得的 *BOD*,单位为毫克/升(mg/L);

BOD_{Bt} ——试验结束时在 F_B 瓶所测得的 *BOD*,单位为毫克/升(mg/L)。

这里, BOD_C 相当于 BOD_t ,用于 BOD_s 和 D_t 的计算。

B.2 示例

F_T 瓶内试验材料对-氨基苯甲酸-2-乙基己基酯浓度为 100 mg/L:

ThOD 239 mg/L

在试验结束时测得 BOD_t 199 mg/L

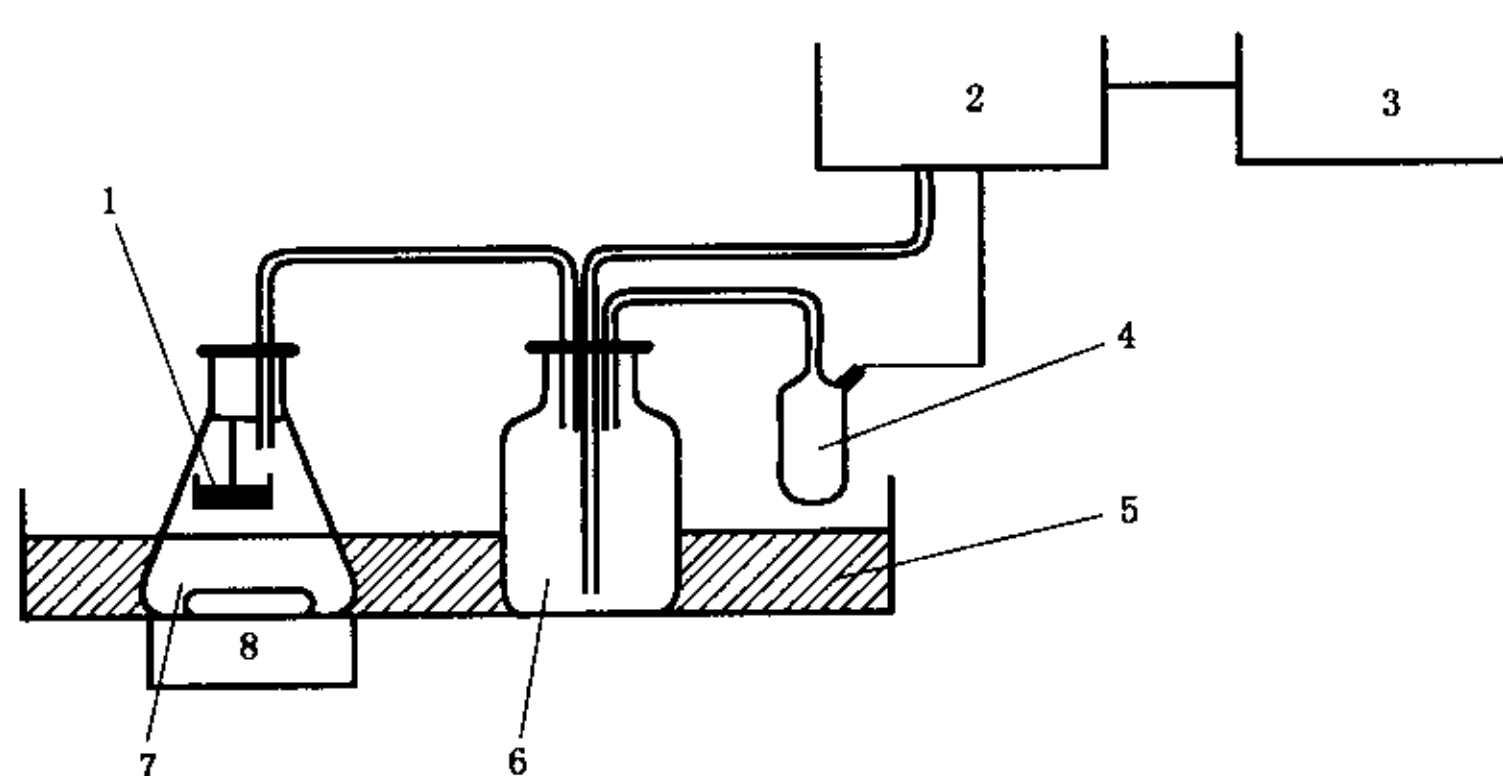
所测得空白试验 BOD_{Bt} 8 mg/L

GB/T 19276.1—2003/ISO 14851:1999

未因硝化作用作修正的 D_t	80%
在试验结束时的硝酸盐 15 mg/L	$\rho_{\text{NO}_3} = 3.5 \text{ mg/L}$
在试验结束时的亚硝酸盐 1 mg/L	$\rho_{\text{NO}_2} = 0.3 \text{ mg/L}$
在试验结束时的 BOD_N	17 mg/L
BOD_C	174 mg/L
修正硝化作用后的 D_t	73%

附 录 C
(资料性附录)
气压式密闭呼吸计原理

在温控环境(如水浴)下呼吸计放置如图 C.1 所示,包括有磁性搅拌棒的测试烧瓶和放置于顶部的吸收二氧化碳的容器,一个氧发生器,一个压力计,电磁搅拌器和一套内部监控设备和记录器(打印机、绘图仪或电脑)。试验烧瓶放置三分之一容器的试验混合物,连续搅拌确保氧在气相和液相中保持平衡,如果生物分解发生,微生物消耗氧气产生二氧化碳,二氧化碳被吸收器吸收,容器内的总压下降可由压力下降测得,并据此来应用电解补充氧气。当压力重新建立时,电解就停止,且所使用电量是正比于氧气消耗量,持续地测量,并在记录器上指示氧气消耗量。



- 1——二氧化碳吸收器;
- 2——压强计;
- 3——打印机、绘图仪或电脑;
- 4——氧气发生器;
- 5——恒温(水浴);
- 6——监测器;
- 7——测试瓶;
- 8——电磁搅拌器。

图 C.1 气压式呼吸计示意图

附录 D

(资料性附录)

呼吸计试验的两相式密闭瓶

D.1 原理

当没有呼吸计可用时,可选择使用本设备。培养液、试验材料以及参比材料在密闭瓶内于 20℃~25℃ 温度范围内摇动或搅拌,在此瓶中装有已知体积的水溶性培养基和空气,以确保氧在液相和气相中的平衡。生物分解能力用常规方法测定液相中的溶解氧的浓度而求得。在试验容器内的总耗氧量可由烧瓶和空白瓶内溶解氧浓度的差值除以正常状况下氧饱和值,再乘以最初存在于液相和气相内的总氧含量计算得到。生物分解程度可由总耗氧量除以理论需氧量(*ThOD*)计算而得,以百分率表示。

D.2 专用设备

D.2.1 密闭容器

使用密封气瓶,例如容积 200 mL~300 mL 可遮光的细口瓶(深色瓶),并附带合适的塞子(如磨口塞、丁基橡胶塞、螺丝塞),建议用瓶塞钳夹住塞子,用防水材料给每个瓶子做上标记。如不使用带有搅拌器的氧电极,就用包有聚四氟乙烯搅拌子的磁性搅拌器,可使用标准体积的烧瓶,但该批瓶子的体积与其平均容积的标准偏差在 1 mL 以下,或者也可以测定每一个编了号的瓶子的体积,精确到 1 mL。用惰性硅氧润滑脂小心涂抹瓶塞以确保密闭且容易取下。

D.2.2 氧电极

该氧电极最好安装搅拌器,测量范围为 0~10 mg/L,精确到 1%,在 1.5 min 内达到稳定状态。培养瓶的磨砂口加接上固定电极的防漏塞子,测量在循环支路管内的氧气浓度。

D.2.3 磁性搅拌棒或者搅拌装量

D.3 步骤

按第 8 节所述的步骤装备好每一个瓶子, F_T 、 F_B 、 F_C 瓶各有三个,若搅拌比摇动的效果好时,则在每一瓶子中放置一搅拌子,准备足够量的试验材料,最好是使用标准试验培养基来进行完整的试验。为确保提供充分营养物,在 A 液中的 NH_4Cl 量增加至 1.5 g/L,按照本文 8.3,培养液最好使用悬浮固体浓度为 30 mg/L 的活性污泥,混合均匀后,添加混合物于至瓶子容积的 2/3(例如 300 mL 的瓶子加到 200 mL),放置瓶子于振荡装置或搅拌它们,且在 20℃~25℃ 下培养 7 d,在此期间,细菌将使用它们的保留物质且培养液将越来越稳定。然后借助水饱和压缩空气,往瓶子中通气 15 min,测量最初氧浓度,按照 8.1 和 8.2 将试验材料和参比材料放入瓶子,试验材料的最大浓度应相当于 150 mg/L 的 *ThOD*,或相当于 90 mg/L TOC,塞紧所有瓶子的瓶塞,并继续试验。

经过 7 d(或者更短的时间)的培养后,测定每个瓶子中溶解氧的浓度。在测定过程中,将瓶子维持在培养时的温度,并维持在一恒定值($\pm 0.5^\circ C$)。按照仪器使用要求,准确校正氧电极。测定氧的时候,依次取出每个瓶子,并用手剧烈晃动 30 s 往瓶子放入搅拌子,但不搅动;拔掉塞子,迅速将氧电极插进瓶子,使氧电极的塞子紧密接触瓶子,电极尖端刚好位于液面下,以一定的速度启动搅拌器,不要形成漩涡。用相同的速度进行一系列的测试,校准电极,稳定时记录氧值,应在 2 min 内达到稳定,只有在氧气浓度大于 1.5 mg/L 时才用来计算测定结果。另外,其他用来测量在液相中溶解氧浓度的方法也可采用,例如将氧电极定位放置于密闭循环测流管中。

测量每个瓶子的 pH 值,并记录。如果 pH 值低于 6,则用 0.1 mol/L~0.5 mol/L 的氢氧化钠调整至 7.5,如果 pH 值高于 8.0,则用 0.1 mol/L~0.5 mol/L 的盐酸溶液调整至 7.5。最后以空气为扩散

器,对每一瓶子中的培养基通气 15 min,并依照上述方法再测量氧气浓度。再次塞紧瓶塞,继续培养。在试验结束时通过计算硝化作用(见附录 B)来校正所测得的 BOD 值。

D.4 结果计算

按式(D.1)计算每个瓶子中液相所测到相对的耗氧量 U_r ,

$$U_r = \frac{c_{Bt} - c_t}{c_s} \quad \dots\dots\dots(D.1)$$

式中:

c_{Bt} ——接种培养后 t 时间,空白烧瓶内溶解氧浓度平均值,单位为毫克/升(mg/L);

c_t ——接种培养后 t 时间,每一烧瓶内溶解氧浓度,单位为毫克/升(mg/L);

c_s ——溶解氧浓度饱和值,单位为毫克/升(mg/L)。

以各烧瓶在每一次通气或再次通气后测得的平均值作为饱和值 c_s ,在标准大气压力(1.013×10^5 Pa)和 20°C 温度下的理论值为 9.08 mg/L。

按式(D.2),由气相内最大的氧含量和液相氧含量在标准大气压力和 20°C 温度下计算瓶内的总氧量 O_c (mg/瓶),

$$O_c = (0.28 \times V_g) + (0.009 \times V_l) \quad \dots\dots\dots(D.2)$$

式中:

0.28——正常情况下空气中的氧浓度,单位为毫克/毫升(mg/mL);

V_g ——培养瓶中的气体体积,单位为毫升(mL);

0.009——饱和水中的氧含量,单位为毫克/毫升(mg/mL);

V_l ——培养瓶中的液体体积,单位为毫升(mL)。

通常, V_l 在试验中是常数,除非分子中有移去部分。但 V_g 可能会由于试验的瓶子不同而不同,如果不同瓶子间的差异很小,可使用恒定的 O_c 值;如果差异明显(例如 200 mL 的瓶子体积差大于 2 mL)时,则应分别计算每个瓶子的 O_c 值。如果按照所取样品的体积 V_l 减少时, V_g 则是正比的增加。

然后按式(D.3)计算吸收的氧含量 BOD,

$$BOD = U_r \times O_c \quad \dots\dots\dots(D.3)$$

按式(D.4)计算所有(n)培养阶段时耗氧量的总和 $\sum BOD$:

$$\sum BOD = BOD_1 + BOD_2 + \dots\dots + BOD_n \quad \dots\dots\dots(D.4)$$

最后,按 9.1 计算生物分解百分率。

使用适当的公式计算非生物分解和参比材料的生物分解性和抑制控制。

附录 E
(资料性附录)
碳平衡量的测定

E.1 原理

试验材料的组成通常比其他低相对分子质量的物质要复杂得多。释放出的二氧化碳量或单纯生化需氧量(BOD)的测定不足以定性和定量材料的生物分解能力。在生物分解过程中,微生物会产生新的生物质,试验材料中的一部分碳转化为生物质而不是被生物化学氧化。因此,即使在试验材料完全被生物分解的情况下,释放出的二氧化碳量和 BOD 值的分析参数相对于理论值来说,通常都不能达到 100%,推断出的不充分生物分解的试验结果也不正确。在这种情况下,测定总的碳平衡有助于来确定完全生物分解能力。这种碳平衡建立在对以下几种形式的碳求和的基础上:以二氧化碳形式释放出的碳、以新生物质形式产生的碳、转化为水溶性有机代谢物的碳、通过溶解有机碳(DOC)测出的碳及保留在未分解聚合物材料中的碳,比较碳的总量与引入试验系统中的试验材料的有机碳含量。

E.2 实验步骤

测定 BOD(见 8.4)。

在培养期开始、加入试验材料前及培养期结束时分别对培养液取样。采样时应仔细,以获得有代表性的样品。将样品用薄膜过滤器过滤或以 40 000 $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$ 速率下离心过滤。

对每一样品,使用适当的方法,分析过滤器或残渣中的生物质含量(如测量蛋白质的方法),测定生物质内的碳含量,并由生物质内的有机碳含量变化来计算转化为新的生物质的碳量。

按照 ISO 8245 测定每个样品滤液中的 DOC,并计算有机碳的增加量。如果可能,鉴别一下形成 DOC 的物质以确定是否产生水溶性代谢物。

在试验结束时,利用全部的残留样品,测定残留聚合物中的含碳量。通常这是比较困难的步骤,如果有特定的聚合物分析方法时,则可直接测定(见附录 F),也可间接测定。在直接测定时,将残留聚合物萃取、称重,根据已知的组成计算出含碳量。间接检测的一种可能的方法是对残留物进行冲洗、干燥和称量,测出总有机碳(TOC)。然后从 TOC 中减去生物质碳(见上述)得到残留聚合物中的含碳量。另一种可能的方法是准确称出残留物质量,然后用适宜的方法对它进行处理,从而破坏生物质,但不破坏聚合物(必须事先确认)。例如,用次氯酸钠除去可溶解部分,并重新称出样品质量。要确保所有的生物质都已除去,根据称得的质量计算出残留物中聚合物的含量。

E.3 碳平衡的计算

利用式(E.1),由呼吸计测得的生物分解百分率 D_t 来计算引入试验系统中(碳含量 c_{MAT})的试验材料的碳的生物需氧量 c_{BOD} (mg/L)。

$$c_{\text{BOD}} = \frac{c_{\text{MAT}} \times D_t}{100} \dots\dots\dots(\text{E.1})$$

通过比较在试验期培养开始和结束时的生物质,根据测得的生物质中的含碳量 $c_{\text{B(始)}}$ 和 $c_{\text{B(末)}}$ 来计算含试验材料的试验烧瓶中生物质碳的增加量 c_{BIO} (mg/L),见式(E.2):

$$c_{\text{BIO}} = c_{\text{B(末)}} - c_{\text{B(始)}} \dots\dots\dots(\text{E.2})$$

通过比较开始和结束时 DOC 的浓度 $\text{DOC}_{(\text{始})}$ 和 $\text{DOC}_{(\text{末})}$ 来计算在培养期中的 DOC 的增加量 c_{DOC} (mg/L),见式(E.3):

$$c_{\text{DOC}} = \text{DOC}_{(\text{始})} - \text{DOC}_{(\text{末})} \dots\dots\dots(\text{E.3})$$

测定试验结束时残余聚合物的有机碳量 c_{POL} 。

计算不同转化形式的碳占引入系统中的碳 (c_{MAT}) 的百分数, 将它们求和, 得到计算出的碳 c_{CALC} (%), 见式 (E. 4):

$$c_{CALC} = c_{BOD} + c_{BIO} + c_{DOC} + c_{POL} \quad \dots\dots\dots (E. 4)$$

E. 4 示例: 聚(β -羟基丁酸酯)(PHB)的碳平衡量

试验带入: $c_{MAT} = 600 \text{ mg/L PHB} \times 55.8\% = 334.8 \text{ mg/L 碳}$;

生物分解率: $D_t = 78\%$

	$c_B(\text{始})$	$c_B(\text{末})$	c_{BIO}	$DOC(\text{始})$	$DOC(\text{末})$	DOC	c_{BOD}
mg/L	3.2	61.0	57.8	2.0	22.0	20.0	261
$c_{MAT} / \%$			17.2			6.0	78

碳平衡量计算: $c_{CALC} = 78\% + 17\% + 6\% = 101\%$ (相对于 c_{MAT})

注 1: 选自 Püchner (1994)。

附 录 F
(资料性附录)

在生物分解试验结束后残留的不溶解于水的聚合物量的测定及聚合物相对分子质量计算

利用测量在生物分解终止时的残留水不溶性聚合物量及其相对分子质量是非常有用的。使用下列方法或其他合适的方法可用来分析不溶于水但可溶于不含水的有机溶剂的聚合物。

- (1) 将试验混合物移至漏斗中,加一适当的有机溶剂,摇动约 10 min~20 min 以萃取残余的聚合物,从液相分离层分离有机溶剂层,加新溶剂并重复上述步骤;
- (2) 合并有机萃取液,蒸发溶剂至干燥,将固体样品溶解于适量的溶剂中;
- (3) 利用微量注射器,注入高效液相色谱仪(HPLC)中,柱中填有色谱填料,开始分析并记录色谱图;
- (4) 使用校正曲线图测定聚合物的存在量;
- (5) 将已知相对分子质量的相同聚合物与试验聚合物相类似结构且已知其高相对分子质量的聚合物注入色谱仪以测定相对分子质量,滞留时间和相对分子质量的关系可由色谱图中求得,再利用此关系计算相对分子质量。

试验聚合物的绝对分子量也可使用 HPLC 和具有低角度激光扫描(LALLS)及示差折射率检测器(RI)测得。

