

前 言

本标准等同采用 ISO 14852:1999《水性培养液中材料最终需氧生物分解能力的测定 采用测定释放的二氧化碳的方法》(英文版)。全国塑料制品标准化中心生物可分解材料工作组在 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定了本标准。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 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。

本标准由天津丹海股份有限公司负责起草,深圳市绿维科技有限公司、武汉华丽环保科技有限公司、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、刘嘉藩、陈家琪、杨惠娣、徐凤霞、孔力、张先炳、王世和、陈学军、叶新建、毛国玉、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 采用测定释放的二氧化碳的方法

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、堆肥或土壤配制成的水性培养液中,并通过测量释放的二氧化碳量来测定试验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,本试验仪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,本方法可用于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 C)。

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以及新的生物质。

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

溶解无机碳 dissolved inorganic carbon, DIC

溶解在水中无法以特别相分离方法(如 40 000 $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$ 离心分离 15 min 或孔径 0.2 μm ~0.45 μm 过滤膜过滤)而分离的无机碳。

3.5

二氧化碳理论释放量 theoretical amount of evolved carbon dioxide, $Th\text{CO}_2$

试验材料完全氧化时所能生成的二氧化碳的理论最大值,可由分子式计算得到,以每克或每毫克试验材料释放出的二氧化碳的毫克数表示($\text{mg CO}_2/\text{g}$ 或 mg 试验材料)。

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 $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$ 离心分离 15 min 或孔径 0.2 μm ~0.45 μm 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和(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试验材料的生物分解率。试验混合物包含一种无机培养基、有机碳浓度介于 100 mg/L ~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。混合物在试验烧瓶中搅拌并通以去除二氧化碳的空气,试验周期依

赖于试验材料生物分解能力,但不能超过6个月。微生物分解材料时释放出的二氧化碳可用合适的方法来测定,例如附录A、附录B所示。

生物分解程度用释放的二氧化碳量和二氧化碳理论释放量($ThCO_2$)的比来求得,以百分率表示。由生物分解曲线的平稳阶段求得试验材料的最大生物分解率。

此外,可选择性计算碳平衡量以对生物分解的过程提供附加信息(见附录C)。

与ISO 9408不一样的是,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。

特殊设备的使用会影响培养液、试验培养基的选择,这时可通过碳平衡量的计算来提高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如 45°C 。

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(pantothenic 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 _c (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 7.6)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。

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 试验烧瓶

玻璃容器(例如玻璃烧瓶),应可通入气体、摇动或搅拌,而且连接管路不能泄漏出二氧化碳。试验装置应放在恒温箱内或在恒温装置(例如水浴)中。

7.2 供气系统

能够提供流量在 50 mL/min~100 mL/min 的不含二氧化碳的空气至每个试验烧瓶中,并能保持恒定流速且偏差在 $\pm 10\%$ 范围内(见附录 A)。

7.3 测定二氧化碳用的分析仪器

用于直接测定二氧化碳,或者用碱性溶液完全吸收后再测定溶解的无机碳(dissolved organic carbon, DIC)来计算二氧化碳量(见附录 A)。如果用连续红外分析仪或气相色谱仪直接测量排放气中的二氧化碳,需要精确控制并测量空气流量。

7.4 总有机碳(TOC)及溶解有机碳(DOC)分析仪(见 ISO 8245)

7.5 分析天平(常规实验室装置)

7.6 离心机或带有薄膜过滤器(孔径 $0.45 \mu\text{m}$)的过滤装置

此装置不会明显地吸附和释放有机碳。

7.7 pH 计(常规实验室装置)

7.8 电磁搅拌器或振荡装置(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并含有足够的碳以使其产生的二氧化碳的量能足以被所使用的分析系统检测到。从化学式计算总有机碳(TOC)或通过适当的分析技术(例如按照 ISO 8245 进行元素分析或测定)来测定总有机碳(TOC)含量,并计算出二氧化碳理论释放量($Th\text{CO}_2$)。试验材料的浓度应使总有机碳(TOC)含量至少为 100 mg/L,试验材料的最大用量由通入试验系统的氧气量和所使用的试验培养基来限定。当使用优化试验培养基时(6.2.2),试验材料的浓度应使总有机碳(TOC)含量不超过 2 000 mg/L,即碳氮比(C:N)约为 40:1。如果试验材料的浓度更高时,应增加试验培养基中氮的浓度。

注: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 $250 \mu\text{m}$ 。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,在评估聚合物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。

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,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 C),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 活性污泥于搅拌器,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(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,把滤液倒入试验容器中,以得到菌种浓度(V/V)为 1%~5%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

至少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。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)。

将烧瓶与无二氧化碳的供气系统(见附录 A)相连,在试验温度下进行培养,并连续地向烧瓶鼓风,以吹除系统中的二氧化碳。在高温时应使用适当的装置防止液体的侵入或流失。在整个试验过程中通过电磁搅拌器或振荡器进行搅拌。如果发现有过多的泡沫,则改为边搅拌边从顶部注入空气。在预通风阶段结束后,将各烧瓶的空气排出口与二氧化碳捕集或测量系统相连。

如果要测定碳平衡量(见附录 C),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。

按表 1 所示,将试验材料、参比材料和负控制材料分别加到相应的烧瓶中,向烧瓶内通入不含二氧化碳的空气,开始试验。要保证整个试验过程中都有足够的氧气。通气的流量一般在 50 mL/min~100 mL/min。

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(1#) | + | - | + |
| F_T 试验瓶(2#) | + | - | + |
| F_B 空白瓶(1#) | - | - | + |
| F_B 空白瓶(2#) | - | - | + |
| 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) | - | + | + |

按照释放出的二氧化碳速率,在固定间隔时间内,使用合适的、足够精确的方法(见附录 B)测定从每个烧瓶放出的二氧化碳的量。

当测得的释放的二氧化碳量达到稳定程度(达到平稳阶段),且预计无更进一步的生物分解时,可认为试验已经结束。试验周期最长为 6 个月。在此冗长的试验周期内应特别留意试验的技术系统(例如试验容器与连接器的密封性,必须确保二氧化碳经过且无泄漏)。

在试验的最后一天,测定 pH 值,用 1 mL 浓盐酸对所有烧瓶进行酸洗,以使碳酸盐和碳酸氢盐分解,将产生的二氧化碳从系统中吹除。连续鼓风 24 h,并测定从每个烧瓶(F_T 、 F_B 、 F_C 、……)中释放出的二氧化碳量。

9 结果的计算和表达

9.1 计算

9.1.1 试验材料的二氧化碳理论释放量

按式(1)计算二氧化碳理论释放量($ThCO_2$)单位为毫克(mg)

$$ThCO_2 = m \times X_C \times \frac{44}{12} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

m ——引入试验系统中试验材料的质量,单位为毫克(mg);

X_C ——试验材料中的含碳量,由化学式决定或由元素分析计算而得,用质量分数表示;

44 和 12——分别表示二氧化碳的相对分子质量和碳的相对原子质量。

用同样的方法计算参比材料以及试验瓶 F_1 中试验材料与参比材料混合物的二氧化碳理论释放量。

9.1.2 由释放出的二氧化碳(CO₂)量计算生物分解百分率

按式(2),计算试验瓶 F_T 的每个测量间隔的生物分解百分率 D_T (%):

$$D_T = \frac{\sum(CO_2)_T - \sum(CO_2)_B}{ThCO_2} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

$\sum(CO_2)_T$ ——从试验开始到 t 时间内从 F_T 瓶释放出的二氧化碳量,单位为毫克(mg);

$\sum(CO_2)_B$ ——从试验开始到 t 时间内从空白瓶 F_B 中释放出的二氧化碳量,单位为毫克(mg);

$ThCO_2$ ——试验材料的二氧化碳理论释放量,单位为毫克(mg)。

如果可能的话,计算与平行试验结果的平均值,用同样的方法计算培养液检测瓶中参比材料的生物分解百分率、抑制控制瓶 F_1 中的试验与参比材料混合物生物分解百分率、控制瓶 F_s 瓶及负控制瓶 F_N 中试验材料的生物分解百分率。如果需要测定碳平衡量时,可由试验中释放出的二氧化碳量及在试验过程中形成的生物质的碳含量来计算试验材料的生物分解百分率(见附录 C)。

9.2 试验结果的表达与解释

按照每个测量间隔下二氧化碳的放出量及生物分解百分率,为每个试验瓶制定一张表格,并以时间为横坐标,为每个试验瓶绘制一条二氧化碳(CO₂)释放量曲线及一条生物分解百分率曲线。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的特征。

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试验材料来进行比较。

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) 试验结束时,空白瓶 F_B 释放出的二氧化碳量不超过经验值的上限(此值取决于培养液的量。

例如,干固体 30 mg/L,实验室间试验(interlablatory test)结果显示约为 90 mg/L);

如果抑制检测瓶 F_1 (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;

如果非生物分解检测瓶 F_s (如选用时)释放出的二氧化碳量较显著(>10%)时,可能已发生了非生物分解过程;

负控制瓶 F_N (如选用时),应测不到明显的二氧化碳释放。

如果不能满足以上条件,则使用另一预先调节或预曝置的培养液重复试验。

11 试验报告

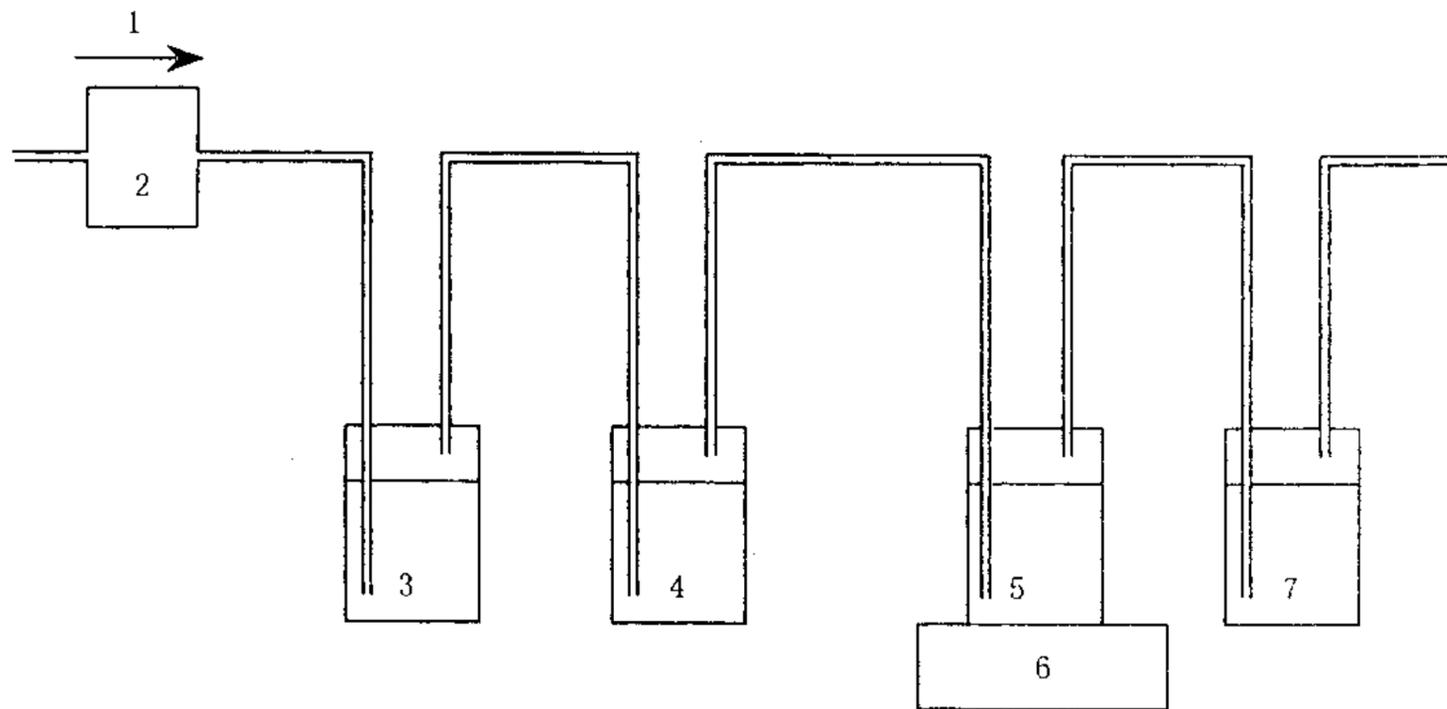
试验报告应至少包括以下内容：

- a) 依据标准；
- b) 能说明此项试验和参比材料的所有资料，包括它们的总有机碳(TOC)、二氧化碳理论释放量($ThCO_2$)、化学组成、分子式(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) 所用的分析技术，包括二氧化碳检测方式、总有机碳(TOC)，溶解有机碳(DOC)及生物质的测定方式；
- f) 试验材料及参比材料所获得的试验结果(列表和图示)，包括测得的二氧化碳累积量、生物分解百分率及这些参数对时间所做的曲线；
- 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) 试验材料中的碳转化为二氧化碳的量；
 - 2) 在培养阶段由于水溶性物质而使培养液增加的溶解有机碳(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，残余的聚合物中的碳含量；
 - 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单元(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)

释放的二氧化碳量测定系统的测试原理(示例)

试验烧瓶按图 A.1 所示顺序放置并通过输气管相连。在恒定低压下,通以流量在 50 mL/min~100 mL/min 之间不含二氧化碳的空气。记下气泡数或使用合适的流量控制器来测定空气流量。在使用压缩空气时,将空气通过盛有干燥的碱石灰的瓶子或至少两个碱液洗瓶(例如:盛有 500 mL 浓度为 10 mol/L 的 KOH 溶液),以除去二氧化碳。另外用一个烧瓶盛放 100 mL 浓度为 0.012 5 mol/L 的 Ba(OH)₂ 溶液,通过浑浊度来判定空气中是否混有二氧化碳。可在指示剂瓶与下一连接瓶之间接入一个空瓶来防止夹带进液体。如果生物分解发生,试验烧瓶中就会产生二氧化碳。产生的二氧化碳随即被连接在其后的吸收瓶吸收,测定方法见附录 B。



- 1——压缩空气;
- 2——流量控制器;
- 3——二氧化碳收集瓶(例如两个盛有强碱的洗瓶);
- 4——二氧化碳指示剂[Ba(OH)₂];
- 5——试验容器;
- 6——搅拌器;
- 7——二氧化碳收集瓶(例如两个盛有强碱的洗瓶)。

图 A.1

附录 B

(资料性附录)

释放的二氧化碳量的计算方法(示例)

B.1 通过测定溶解无机碳(DIC)来计算二氧化碳释放量

释放出的二氧化碳(CO₂)用 NaOH 吸收。

用去离子水制备浓度为 0.05 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)溶液,测定此溶液的溶解无机碳(DIC)作为空白值,当计算产生的 CO₂ 量时使用这个空白值。将试验烧瓶依次与分别装有 NaOH 溶液 100 mL 的两个吸收瓶相连,用一小弯管封闭最末端,以防止空气中的二氧化碳进入 NaOH 溶液中。在测定时,取下与试验烧瓶相连的那个吸收瓶,取出足够的样品用于测定 DIC(例如 10 mL),并用盛有新制备的 NaOH 溶液的吸收瓶替换。在实验的最后一天,在对实验溶液进行酸化处理后,测定两个吸收瓶的 DIC 值。

按(B.1)式计算产生的二氧化碳量:

$$(\text{CO}_2)_T = \frac{(\text{DIC}_T - \text{DIC}_B) \times 3.67}{10} \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

式中:

(CO₂)_T——释放出的二氧化碳量,单位为毫克(mg);

DIC_T——测得的 DIC,单位为毫克(mg);

DIC_B——由 NaOH 溶液计算得到的 DIC 空白值,单位为毫克(mg);

3.67——二氧化碳相对分子质量与碳相对原子质量的比值(44/12);

10——修正系数,因为实际使用 NaOH 的用量为 100 毫升(mL)。

B.2 用氢氧化钡[Ba(OH)₂]溶液进行滴定分析

产生的 CO₂ 与 Ba(OH)₂ 反应生成碳酸钡(BaCO₃),通过用 HCl 滴定残留的 Ba(OH)₂ 来计算释放出的 CO₂ 的量:



用去离子水或蒸馏水溶解 Ba(OH)₂ · 8H₂O 4.0 g 加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL,得到浓度为 0.012 5 mol/L 的溶液。建议在进行系列试验时,一次制备足够量的溶液,例如 5 L。滤去固体物质,用标准的盐酸(HCl)溶液进行滴定,用酚酞作为指示剂或自动滴定仪来指示终点,测出准确浓度。将清澈的 Ba(OH)₂ 溶液用密封瓶储存起来,防止其吸收空气中的二氧化碳。

将 1 mol/L(36.5 g/L)的盐酸溶液 50 mL 用去离子水和蒸馏水加水(见 6.1)稀释至 1 000 mL,得到浓度为 0.05 mol/L 的溶液。

在试验开始时,先在 3 个吸收瓶中各放入 Ba(OH)₂ 溶液 100 mL。根据试验材料的特点和用量来调节吸收液的用量。定期滴定第一个收集瓶。此项工作应按需要进行,例如当第一个收集瓶发生浑浊及第二个收集瓶出现 BaCO₃ 沉淀前进行滴定。在试验开始后可每隔 1 d 滴定 1 次,然后在达到平稳阶段后每 5 d 滴定 1 次。在取下吸收瓶时,应立即用塞子塞住瓶口,以避免空气中的 CO₂ 进入瓶中。将剩下的两个吸收瓶前移接试验烧瓶(即 2 变 1,3 变 2),并在其后再放置一个盛有新鲜 Ba(OH)₂ 溶液的吸收瓶。如果试验周期较长,则特别需要测定溶液的准确浓度。用同样的方法对盛有试验材料、参比材料的试验烧瓶及空白、抑制控制及培养液控制的试验烧瓶进行相同方式的处理。

在取下吸收瓶后,将 Ba(OH)₂ 溶液分成 2 或 3 等份,并立即用 HCl 溶液进行滴定。记下中和

Ba(OH)₂所用的 HCl 的体积。

按(B.4)式计算收集到的二氧化碳(CO₂)的质量:

$$m = \left(\frac{2c_B \times V_{B_0}}{c_A} - V_A \times \frac{V_{B_1}}{V_{B_2}} \right) \times c_A \times 22 \quad \dots\dots\dots (B.4)$$

式中:

- m*——吸收瓶中收集到的二氧化碳量,单位为毫克(mg);
- c_A*——HCl 溶液的准确浓度,单位为摩尔/升(mol/L);
- c_B*——Ba(OH)₂ 溶液的准确浓度,单位为摩尔/升(mol/L);
- V_{B₀}*
- V_{B₁}*
- V_{B₂}*
- V_A*——中和滴定时用去 HCl 的体积,单位为毫升(mL);
- 22——CO₂ 相对分子质量的一半。

当采用以下试验条件时:

- 在吸收 CO₂ 前后, Ba(OH)₂ 的体积准确为 100 mL;
- Ba(OH)₂ 溶液全部用于滴定 (*V_{B₀}* = *V_{B₁}* = *V_{B₂}*);
- Ba(OH)₂ 的准确浓度正好为 0.012 5 mol/L;
- HCl 溶液的准确浓度 *c_A* 正好为 0.05 mol/L;

按(B.5)式进行计算:

$$m = 1.1(50 - V_A) \quad \dots\dots\dots (B.5)$$

附 录 C
(资料性附录)
碳平衡量的测定

C.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耗氧量(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,比较碳总量与引入试验系统中的试验材料的有机碳含量。

C.2 实验步骤

测定释放出的二氧化碳量(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 D),也可间接测定。在第一种情况直接测定时,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。

C.3 碳平衡的计算

按式(C.1),由呼吸计测定得到的生物分解百分率 D_t 来计算引入试验系统中(碳含量 C_{MAT})的试验材料的生化氧化碳含量 C_{CO_2} (mg/L)。

$$C_{\text{CO}_2} = \frac{C_{\text{MAT}} \times D_t}{100} \quad \dots\dots\dots(\text{C.1})$$

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(C.2):

$$C_{\text{BIO}} = C_{\text{B(末)}} - C_{\text{B(始)}} \quad \dots\dots\dots(\text{C.2})$$

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(C.3):

$$C_{\text{DOC}} = \text{DOC}_{(\text{末})} - \text{DOC}_{(\text{始})} \quad \dots\dots\dots(\text{C.3})$$

测定试验结束时残留聚合物的有机碳量 C_{POL} 。

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

$$C_{CALC} = C_{BOD} + C_{BIO} + C_{DOC} + C_{POL} \dots\dots\dots (C.4)$$

C.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: $D_t = 78\%$ 。

| | $C_{B(始)}$ | $C_{B(末)}$ | C_{BIO} | $DOC_{(始)}$ | $DOC_{(末)}$ | DOC | C_{CO_2} |
|--------------|------------|------------|-----------|-------------|-------------|-------|------------|
| 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 D
(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) 将已知分子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。