



中华人民共和国国家标准

GB/T 21803—2008

化学品 快速生物降解性 DOC 消减试验

Chemicals—Ready biodegradability—
DOC die-away test

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品 快 速 生 物 降 解 性
DOC 消 减 试 验

GB/T 21803—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 17 千字

2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

*

书号:155066·1-32294 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21803-2008

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 301A(1992 年)《DOC 消减试验》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改:

——将计量单位改为我国法定计量单位。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:环境保护部化学品登记中心。

本标准参加起草单位:环境保护部南京环境科学研究所、上海市检测中心、上海市环境科学研究院。

本标准主要起草人:孙锦业、刘纯新、胡征、刘济宁、单正军、陈晓倩、沈根祥。

化学品 快速生物降解性 DOC 消减试验

1 范围

本标准规定了化学品快速生物降解性 DOC 消减试验的方法概述、试验准备、试验程序、质量保证与质量控制、数据与报告。

本标准适用于测试非挥发、水中溶解度不低于 100 mg/L 的化学品的快速生物降解性。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

快速生物降解性 ready biodegradability

受试物在限定时间内与接种物接触表现出的生物降解能力。

2.2

初级生物降解 primary biodegradation

受试物在生物作用下化学结构发生变化致使特性丧失的过程。

2.3

溶解性有机碳 dissolved organic carbon, DOC

溶液中有有机碳的含量,常指通过 0.45 μm 滤膜过滤后液体中的有机碳含量,或经 4 000 r/min 转速离心 15 min 后上清液中的有机碳含量。

2.4

停滞期 lag phase

试验开始到降解率达到 10% 的时期。

2.5

十天观察期 10-d window

生物降解率达到 10% 之后的 10 d 试验时间。

2.6

降解期 degradation phase

停滞期结束到降解率达到最大降解率的 90% 的时期。

3 受试物信息

- a) 分子式和结构式;
- b) 水中溶解度;
- c) 蒸气压;
- d) 碳含量;
- e) 纯度;
- f) 主要成分组成比例;
- g) 吸附性;
- h) 微生物毒性。

4 方法概述

4.1 原理

在一定体积已接种的无机培养基中,以受试物(10 mg/L~40 mg/L,以 DOC 计)作为唯一的有机碳源,在温度为 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、黑暗或散射光条件下曝气培养。28 d 培养期间,以固定时间间隔测定 DOC,用 DOC 去除浓度计算受试物快速生物降解率。另外,通过化学分析测定试验开始和结束时受试物浓度,可以确定受试物的初级生物降解性。

4.2 参比物

本标准推荐苯胺(新蒸馏)、醋酸钠或苯甲酸钠作为参比物。若使用其他参比物,试验报告中应加以说明。

5 试验准备

5.1 设备

试验中应配备下列设备:

- a) 圆锥形烧瓶(250 mL~2 L);
- b) 振荡器($\pm 2^{\circ}\text{C}$);
- c) 微孔滤膜过滤器;
- d) DOC 分析仪;
- e) 溶解氧测定仪;
- f) 离心机。

5.2 接种物

5.2.1 接种物选择

接种物可以来自活性污泥、污水处理厂出水、地表水和土壤,或以上几种的混合物。

5.2.2 活性污泥接种物

活性污泥采自污水处理厂或主要处理生活污水的中试规模的处理装置曝气池中的新鲜污泥样品,并保持有氧状态。在通过细过滤网去除粗糙的颗粒后,沉淀或离心分离(如:1 100 g,离心 10 min)将浮在表面上的杂质除去。污泥可用试验培养基进行清洗,使活性污泥在试验培养基中质量浓度为 3 g/L~5 g/L,保持有氧培养直至使用。

当污泥中可能含有抑制剂时,应清洗。将污泥与试验培养基充分混合后沉淀或离心分离后再悬浮,去掉悬浮物,再用试验培养基悬浮洗过的污泥。重复这一操作直到污泥中认为不含酶和抑制剂。试验前从悬浮污泥中抽取一份样品,确定活性污泥的干重。

也可用匀浆器以中等速度将活性污泥搅拌 2 min,使其均质化(3 g/L~5 g/L),沉淀 30 min 或更长(如有需要)。与试验培养基按大约 10 mL/L 的比例,轻轻倒出液体作为接种物。

5.2.3 其他来源的接种物

接种物也可采自污水处理厂或主要处理生活污水的中试装置的二级出水。采集一个新鲜样品并在运输中保持有氧状态。样品沉淀 1 h 或用粗滤纸过滤后,保持上清液或滤出液在有氧状态直至使用。每升培养基可添加 100 mL 该接种物。

接种物的另一个来源是地表水。收集一份地表水样品,如河水、湖水并保持有氧状态直至使用。如有必要,可通过过滤或离心将接种物浓缩。

5.2.4 接种物预处理

如有需要,接种物可在试验条件下预处理,但不是对受试物的预驯化。预处理包括在试验培养基(不添加受试物)中对活性污泥或在试验温度下对二级出水曝气培养 5 d~7 d。

5.3 试验用水

为避免较高空白值,应使用去除毒性物质(如 Cu^{2+})的高纯度去离子水或蒸馏水,确保有机碳含量小于或等于受试物浓度的 10%,对于每组系列试验使用同一批水。

5.4 培养基

5.4.1 培养基贮备液

用分析纯试剂制备下列贮备液:

- 磷酸缓冲液:称取 8.50 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、21.75 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、33.40 g 二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和 0.5 g 氯化铵(NH_4Cl),用水溶解,定容至 1 L, pH 值为 7.4。
- 氯化钙溶液:称取 27.50 g 无水氯化钙(CaCl_2)或 36.40 g 二水合氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),用水溶解,定容至 1 L。
- 硫酸镁溶液:称取 22.50 g 七水合硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),用水溶解,定容至 1 L。
- 氯化铁溶液:称取 0.25 g 六水合氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),用水溶解,定容至 1 L。加入 0.05 mL 浓盐酸或 0.4 g/L EDTA 二钠盐缓冲溶液保存。

上述贮备液中如果出现沉淀,则需重新配制。

5.4.2 试验培养基的制备

取 5.4.1 中磷酸缓冲液 10 mL 加入 800 mL 试验用水,再加氯化钙溶液、硫酸镁溶液和氯化铁溶液各 1 mL,定容至 1 L。

6 试验程序

6.1 组别设计

- 通常,试验中需要设置下列组别:
 - 含受试物和接种物的试验组(两个烧瓶平行);
 - 仅含接种物的接种物空白对照组(两个烧瓶平行);
 - 含参比物和接种物的程序对照组。
- 必要时:
 - 含受试物和消毒剂的无菌对照组;
 - 含受试物、接种物和消毒剂的吸附对照组;
 - 含受试物、参比物和接种物的毒性对照组(见附录 A)。

6.2 受试物贮备液

受试物或参比物的水中溶解度若超过 1 g/L,则称取 1 g~10 g,用试验用水溶解并定容至 1 L。否则,将受试物直接加入试验培养基中,确保受试物溶液均质化。

6.3 试验操作

以 2 L 烧瓶装 1 L 悬浮液为例,烧瓶中先装入 800 mL 试验培养基,再加入受试物贮备液,使烧瓶中 DOC 的质量浓度为 10 mg/L~40 mg/L,调节 pH 值至 7.4,烧瓶中接种物质量浓度不大于 30 mg/L,用试验培养基定容至 1 L,混合后用铝箔将烧瓶口盖住,并确保烧瓶中试验药液和外界空气能自由交换,将烧瓶置入振荡器中培养。同样用试验培养基配制空白对照组,只加接种物,不加受试物。混合之后,从每个烧瓶取样测定其初始 DOC 浓度。

用试验培养基接种一瓶同时含有受试物和参比物的溶液,检查受试物对接种物的抑制影响。

用经灭菌的未接种的受试物溶液检查受试物是否发生非生物降解。可采用滤膜(0.2 μm ~0.45 μm)过滤或加入适当的有毒物质来灭菌。

另外,可采用一个含有受试物、接种物和消毒剂的吸附对照组烧瓶检验受试物在污泥、容器壁上的吸附性,评价受试物的吸附程度。

28 d 培养期间,间隔一定时间取样,取样前加适量水补充试验中蒸发掉的水分,并将培养基充分混合确保在取样时粘附在容器壁上的受试物再次溶解或悬浮。取样次数应保证可以评价十天观察期降解率,取样后用滤膜过滤或离心分离(见附录 B),如能当天分析试验药液浓度,则可依据测定结果确定下次取样时间;否则,样品可在 2℃~4℃ 下保存 48 h 或在 -18℃ 长期保存,分析测定时可先分析最后取的样品,用逐步倒退法选择分析其他样品,以相对较少的分析次数获得较好的生物降解曲线。若第 28 天样品显示没有发生降解,则其他样品无需分析。

7 质量保证与质量控制

- a) 在稳定期、试验结束时或十天观察期结束时,平行试验间的降解率最大差别应低于 20%。
- b) 试验进行到 14 d 时,参比物程序对照的降解率(以 DOC 计)不低于 70%。

8 数据与报告

8.1 结果处理

对于含受试物和接种物的试验悬浮液处理,用 DOC 测定平均值计算每次取样时两个试验组烧瓶的降解率(D_t)。见式(1):

$$D_t = \left[1 - \frac{c_t - c_{bl(t)}}{c_0 - c_{bl(0)}} \right] \times 100 \tag{1}$$

式中:

- D_t —— t 时刻的降解百分率, %;
- c_0 ——含受试物和接种物的试验组的初始 DOC 平均质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- c_t ——含受试物和接种物的试验组 t 时刻的 DOC 平均质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- $c_{bl(0)}$ ——空白对照组的初始 DOC 平均质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- $c_{bl(t)}$ —— t 时刻空白对照组的 DOC 平均质量浓度,单位为毫克每升(mg/L)。

所有浓度值为试验中测得。

用含有受试物的两个烧瓶的平均值,绘图表示降解过程,如果试验符合有效性标准,指出十天观察期。计算和报告在稳定期、试验结束和在十天观察期结束时的去除百分率。

当有无菌对照时,用式(2)计算非生物降解百分率:

$$D_a = \frac{c_{s(0)} - c_{s(t)}}{c_{s(0)}} \times 100 \tag{2}$$

式中:

- D_a ——非生物降解百分率, %;
- $c_{s(0)}$ ——无菌对照组的初始 DOC 质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- $c_{s(t)}$ —— t 时刻无菌对照组的 DOC 质量浓度,单位为毫克每升(mg/L)。

8.2 结果报告

试验报告应包括以下内容:

- a) 受试物:
 - 物理属性,及基本理化性质;
 - 受试物鉴别数据。
- b) 试验条件:
 - 接种物:状态和取样地点,浓度和预处理方式;
 - 污水中工业废水的比例和状况(若已知);
 - 试验周期与温度;
 - 如果受试物是非常难溶的物质,提供受试物溶液/悬浮液制备方法;

——程序改变的原因及解释说明。

c) 结果:

——将数据填入“数据表”(见附录 C);

——任何观察到的抑制现象;

——任何观察到的非生物降解;

——化学物质分析数据(如果有);

——受试物降解产物的分析数据(如果有);

——受试物及参比物的降解曲线,包括停滞期、降解期和十天观察期和斜率;

——稳定期、试验结束时和(或)十天观察期结束时的降解百分率。

d) 结果讨论。



附 录 A
(资料性附录)

受试物对接种物生长抑制作用的处理

当快速生物降解试验中受试物表现为无生物降解性时,为判别是源于受试物对接种物的抑制作用还是因为受试物的惰性,推荐采用以下措施:

微生物毒性试验和生物降解试验采用类似或相同的接种物;

微生物毒性试验可以单独或联合采用以下方法:活性污泥呼吸抑制试验、BOD 和(或)微生物生长抑制试验;

生物降解性试验中,为避免受试物抑制接种物的活性,建议受试物浓度设置为 EC_{50} 的 1/10(或低于 EC_{20})。若受试物对接种物 EC_{50} 大于 300 mg/L 时,可判定受试物对接种物无抑制影响;

当受试物对接种物 EC_{50} 低于 20 mg/L 时,应设置较低的受试物浓度。推荐采用密闭瓶法试验或使用¹⁴C 标记材料评价生物降解性;若采用经受试物驯化的接种物,试验时可设置较高的受试物浓度,但试验结果不能用于评价快速生物降解性。

附 录 B
(资料性附录)
有关参数的计算和确定

B.1 溶解性有机碳(DOC)

根据定义,溶解性有机碳是指任何化合物或混合物中溶于水并能通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜的有机碳。

从试验容器中取出样品后立即用适当的过滤器和滤膜过滤,舍去最初的滤出液 20 mL(当使用小过滤器时,此量可相应减少),保留 10 mL~20 mL(取决于分析需要的体积)供有机碳分析,用有机碳分析仪测定 DOC 浓度,有机碳分析仪必须能够精确测量相当于或低于在试验所用的起始 DOC 浓度的 10% 的量。

在同一工作日内不能测定滤液样品时,可在冰箱中 4°C 下保存样品,但保存时间不得超过 48 h,在 -18°C 可保存较长时间。

注:滤膜表面通常涂有亲水性涂层物质,这样,过滤器就可能含有溶解性有机碳,影响生物降解性的测定。将过滤器放入去离子水中煮沸 3 次,每次 1 h,可去除涂层物质和溶解性有机物,其后过滤器可在去离子水中保存一星期。如果使用一次性的过滤器,则每批都应检查确保其不释放出溶解性有机碳。同时确保受试物不被过滤器吸附。

在离心力 $4\ 000\ g$ (约为 $40\ 000\ \text{m/s}^2$)下离心 15 min 可代替过滤,由于不是全部的细菌都能去除,或者细菌体的部分有机碳会再溶解,该方法不适用于分析 DOC 初始浓度低于 $10\ \text{mg/L}$ 的样品。

附 录 C
(资料性附录)
DOC 消减试验数据表

C.1 实验室

C.2 试验开始日期

C.3 受试物

名称：
受试物贮备液浓度:mg/L (以化学物质的质量计)
试验培养基的初始浓度, t_0 :mg/L (以化学物质的质量计)

C.4 接种物

来源：
处理方式：
预处理,如有：
在反应混合物中悬浮固体浓度:mg/L

C.5 碳测定

结果见表 C.1。

表 C.1 DOC 测定结果

	瓶号		n 天以后的 DOC 浓度/(mg/L)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
含受试物和 接种物的试验组	1	a_1					
		a_2					
		平均值 $c_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		平均值 $c_{b(t)}$					
仅含接种物的 空白对照组	3	c_1					
		c_2					
		平均值 $c_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		平均值 $c_{d(t)}$					
	平均值 $c_{bl(t)} = \frac{c_{c(t)} + c_{d(t)}}{2}$						

C.6 原始数据的评价

见表 C.2。

表 C.2 降解率测定结果

瓶号	计算结果	n 天以后的降解/%				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left[1 - \frac{c_{a(t)} - c_{bl(t)}}{c_{a(0)} - c_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
2	$D_2 = \left[1 - \frac{c_{b(t)} - c_{bl(t)}}{c_{b(0)} - c_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
平均值 ^a	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				
注：参比物和毒性对照试验可以使用相似的格式。						
^a D_1 和 D_2 如果有相当大的差异，则不应取其平均值。						

C.7 非生物降解(可选)

非生物降解测定结果见表 C.3,非生物降解率按式(C.1)计算。

表 C.3 非生物降解测定结果

	时间/d	
	0	T
不含接种物的无菌对照组的 DOC 浓度/(mg/L)	$c_{s(0)}$	$c_{s(t)}$

$$Da = \frac{c_{s(0)} - c_{s(t)}}{c_{s(0)}} \times 100$$

.....(C.1)

C.8 化学物质分析(可选)

受试物残留量测定结果见表 C.4。

表 C.4 受试物残留量测定结果

	试验结束时受试物的残留量	初级降解/%
不含接种物的无菌对照组	S_b	
含接种物的试验组	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$