



中华人民共和国国家标准

GB/T 21802—2008

化学品 快速生物降解性 改进的 MITI 试验(I)

Chemicals—Ready biodegradability—Modified MITI test (I)

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
改 进 的 MITI 试 验 (I)

GB/T 21802—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

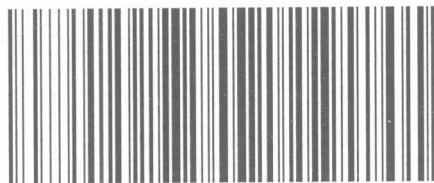
*

书号: 155066 · 1-32295 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 21802—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. 301C(1992 年)《改进的 MITI (I) 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、沈阳化工研究院安全评价中心。

本标准主要起草人:杨力、刘纯新、高映新、单正军、刘济宁、陈晓倩、丁琦。

化学品 快速生物降解性 改进的 MITI 试验(I)

1 范围

本标准规定了化学品快速生物降解性改进的 MITI 试验(I)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。

本标准适用于可溶于水的或难溶于水的、吸附性、易挥发或非挥发性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

溶液中有机碳的含量,通常指通过 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

生化需氧量 biochemical oxygen demand, BOD

微生物分解有机物所消耗氧的量,可表示为每毫克受试物消耗的氧气毫克数(mg/mg)。

2.5

理论需氧量 theoretical oxygen demand, ThOD

根据分子式计算得到的受试物完全被氧化需要的氧的总量,可表示为每毫克受试物消耗的氧气毫克数(mg/mg)。

2.6

停滞期 lag phase

试验开始到降解率达到 10% 的时期。

2.7

十天观察期 10-d window

生物降解率达到 10% 之后的 10d 试验时间。

2.8

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;

- b) 水中溶解度;
- c) 蒸气压;
- d) 结构式;
- 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

受试物溶解或悬浮在试验培养基中,加入未经驯化的接种物,在黑暗、密闭、搅拌和 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 28 d,用碱石灰吸收产生的二氧化碳,连续测定耗氧量。受试物生物降解时接种物消耗的氧量经平行试验空白对照校正后,以占 ThOD 的百分数表示降解率。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。通过 DOC 分析,可以确定受试物最终生物降解率。

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。

5 试验准备

5.1 设备

- a) BOD 测定仪或呼吸测定仪(配 6 个 300 mL 烧瓶和 CO_2 吸收杯多个);
- b) 培养箱或水浴($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$);
- c) 膜过滤器(可选);
- d) 有机碳分析仪(可选)。

5.2 接种物

从使用和排放各种化学物质的不少于 10 个场所采集接种物,这些场所包括城市污水处理厂、工业污水处理厂、河流、湖泊和沿海。采集活性污泥、表层土壤、水等样品各 1 L 将它们混合在一起,去除漂浮物静置,以氢氧化钠或磷酸调节上清液 pH 值为 7 ± 1 ,曝气培养 23.5 h 后静置 30 min,弃去上清液的三分之一并加入等体积的含葡萄糖、蛋白胨和磷酸钾各 0.1% 的溶液(pH 值为 7),再次曝气。培养过程每天操作 1 次。接种物中应出现原生动物,并且至少每 3 个月用参比物测定活性 1 次。接种物培养 1 个月后方可使用,但不能超过 4 个月。每 3 个月从 10 个场所采集接种物,并与正使用接种物等量混合,培养 18 h~24 h 后方可作为新的试验接种物。

5.3 试验用水

使用高纯度去除毒性物质(如 Cu^{2+})的去离子水或蒸馏水,确保有机碳含量不得高于受试物浓度的 10%,每组系列试验使用一批水。

5.4 培养基

5.4.1 试验培养基贮备液

用分析纯试剂制备下列贮备液:

- a) 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)、44.60 g 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)和 1.70 g 氯化铵(NH_4Cl),用水溶解,定容至 1 L, pH 值为 7.2。
- b) 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。

- c) 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。
- d) 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/LEDTA 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

取磷酸缓冲液、氯化钙溶液、硫酸镁溶液、氯化铁溶液各 3 mL,用试验用水溶解并定容至 1 L。

6 试验程序

6.1 组别设计

- a) 通常,试验中需要设置下列组别:
- 瓶 1:非生物降解对照组(含受试物和去离子水,质量浓度为 100 mg/L);
 - 瓶 2、瓶 3、瓶 4:含受试物、试验培养基和接种物的试验组(受试物质量浓度为 100 mg/L);
 - 瓶 5:含参比物、试验培养基和接种物的程序对照组(参比物质量浓度为 100 mg/L);
 - 瓶 6:仅含接种物和试验培养基的空白对照组。
- b) 必要时:
- 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

难溶受试物试验中不能使用助溶剂和乳化剂,可采用研磨或超声分散等适当方式使溶液均质化。试验瓶 2,瓶 3 和瓶 4(试验组),瓶 5(程序对照)和瓶 6(接种物的空白对照组)加入接种物质量浓度为 30 mg/L,瓶 1 中不加入接种物而作为非生物对照, CO_2 吸收杯加入 CO_2 吸收剂,装好设备,检查气密性,开始搅拌,在黑暗条件下开始测量氧消耗。每天检查温度和搅拌器状态,定期测定溶解氧浓度,并观察试验瓶中颜色变化。28 d 试验结束时,测定各瓶试验溶液 pH,测定瓶 1 中受试物浓度或代谢中间产物的浓度。如可能发生硝化作用,测定硝酸盐或(和)亚硝酸盐浓度。

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低于 20%;
- b) 试验进行到 7 天和 14 天时,参比物降解率分别高于 40%和 65%;
- c) 接种物空白对照组的氧消耗量通常在 20 mg/L~30 mg/L(以 O_2 计);28 d 试验期间,氧消耗不高于 60 mg/L(以 O_2 计);
- d) 若 pH 值超出 6~8.5,且受试物氧消耗量低于 60%,则设置较低的受试物浓度,重新试验。

8 数据与报告

8.1 数据处理

一定时间后,受试物氧消耗量(mg)经同时刻段的接种物空白对照校正后除以受试物质量(mg),得到用毫克氧每毫克受试物(mg/mg)表示的 BOD,见式(1):

$$\text{BOD} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

m_1 ——受试物氧消耗,单位为毫克(mg);

m_2 ——空白对照氧消耗,单位为毫克(mg);

m_3 ——受试物加入量,单位为毫克(mg)。

生物降解率可从式(2)中获得:

$$D = \frac{\text{BOD}}{\text{ThOD}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

D ——生物降解率,%。

对于混合物,ThOD的计算可通过元素分析,将其当作单个化合物,根据硝化作用是否发生选取适当的ThOD(ThOD_{NH₄}或ThOD_{NO₃})(见附录B)。当硝化作用发生但反应不完全时,可通过从硝酸盐和亚硝酸盐的浓度变化校正硝化作用的氧消耗。

若瓶1中的受试物有减少,计算非生物降解率,用该瓶中28 d后受试物的浓度(S_b)去计算降解率,见式(3):

$$D_a = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

D_a ——非生物降解率,%;

S_b ——试验开始时瓶1中受试物浓度,单位为毫克每升(mg/L);

S_a ——试验结束时瓶1中受试物残留浓度,单位为毫克每升(mg/L)。

当采用DOC测定时(可选),计算 t 时刻的最终生物降解率,见式(4):

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100 \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

D_t —— t 时刻的降解率,%;

C_0 ——含受试物和接种物的试验组的初始DOC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浓度,单位为毫克每升(mg/L);

$C_{bl(0)}$ ——空白对照组的初始DOC浓度,单位为毫克每升(mg/L);

$C_{bl(t)}$ —— t 时刻空白对照组的DOC浓度,单位为毫克每升(mg/L)。

当有无菌对照时,化学分析测定受试物母体化合物含量,见式(5)。

$$D_a = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中:

D_a ——非生物降解率,%;

$C_{s(0)}$ ——瓶1受试物初始DOC浓度,单位为毫克每升(mg/L);

$C_{s(t)}$ —— t 时刻瓶1受试物DOC浓度,单位为毫克每升(mg/L)。

8.2 结果报告

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;
- 水中难溶受试物溶液/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(若适用)；
- 受试物降解产物的分析数据(若适用)；
- 受试物及参比物的降解曲线,包括停滞期、降解期、十天观察期和下降期；
- 稳定期、试验结束时和(或)十天观察期结束时的降解率。

d) 结果讨论。



附 录 A
(资料性附录)

受试物对接种物的生长抑制的处理

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:污泥呼吸速率抑制试验、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 ^{14}C 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 理论需氧量(ThOD)

当元素组成确定或已知时,可以计算得出理论需氧量。对于化合物 $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$,通常基于形成铵盐的降解方式计算 ThOD,其理论需氧量见式(B.1):

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW} \dots\dots\dots (B.1)$$

如果预测到或可确定发生硝化作用时,就要基于形成硝酸盐的降解方式来计算 $ThOD_{NO_3}$,其理论需氧量式(B.2):

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + \frac{5}{2}n + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW} \dots\dots\dots (B.2)$$

式(B.1)和式(B.2)中:

ThOD——理论需氧量,以每毫克化学品消耗的氧气量(mg/mg)表示;

c ——化合物分子中碳原子个数;

h ——化合物分子中氢原子个数;

cl ——化合物分子中氯原子个数;

n ——化合物分子中氮原子个数;

s ——化合物分子中硫原子个数;

p ——化合物分子中磷原子个数;

na ——化合物分子中钠原子个数;

o ——化合物分子中氧原子个数;

MW——化合物相对分子质量。

若硝化作用不完全但确已发生,则需通过测定硝酸盐和亚硝酸盐的浓度进行校正 ThOD。

B.2 溶解性有机碳(DOC)

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℃ 下保存样品,但保存时间不得超过 48 h,在 -18℃ 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 1 周。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 m/s²)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 mg/L 的样品。

附录 C
(资料性附录)

改进的 MITI 试验(I)数据表

C.1 实验室

C.2 试验开始日期

C.3 受试物

名称:
受试物储备液的浓度:mg/L 以化学物质的质量计
试验培养基的初始浓度, C_0 :mg/L 以化学物质的质量计
进行试验的反应液体积:mL
ThOD: mg/L(以 O_2 计)

C.4 接种物

污泥采样的地点:
驯化后活性污泥的悬浮物浓度:mg/L
在每升最后介质中加入的污泥体积:mL
在最后介质中污泥的浓度:mg/L

C.5 生物降解性的氧消耗量

表 C.1 氧消耗量测定结果

	时间 d			
	n_1	n_2	n_3	n_x
试验组的氧消耗/mg: a_1 a_2 a_3				
空白对照组的氧消耗/mg: b				
氧消耗修正值/mg: a_1-b a_2-b a_3-b				
BOD/(mg/mg): $(a_1-b)/C_0V$ $(a_2-b)/C_0V$ $(a_3-b)/C_0V$				

表 C.1 (续)

	时间			
	d			
	<i>n</i> ₁	<i>n</i> ₂	<i>n</i> ₃	<i>n</i> _x
降解率(BOD/ThOD×100)/%				
1				
2				
3				
平均值 ^a				
注:参比物可使用类似的格式。				
^a 在重复试验中有相当大的差别时不要取平均值。				

C.6 碳分析(可选)

表 C.2 碳分析测定结果

烧瓶	DOC				DOC 去除率/%	平均值
	测量值		修正值			
去离子水+受试物	<i>a</i>					
活性污泥+受试物	<i>b</i> 1		<i>b</i> 1— <i>c</i>			
活性污泥+受试物	<i>b</i> 2		<i>b</i> 2— <i>c</i>			
活性污泥+受试物	<i>b</i> 3		<i>b</i> 3— <i>c</i>			
空白对照组	<i>c</i>		—		—	—

$$D = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100 \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

C.7 特定化学物质分析

表 C.3 受试物残留量测定结果

	试验结束时受试物的残留量	初级生物降解率/%
去离子水非生物降解对照组	<i>S</i> _b	
含接种物的试验组	<i>S</i> _{a1}	
	<i>S</i> _{a2}	
	<i>S</i> _{a3}	

$$D_a = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \quad \dots\dots\dots (C.2)$$

分别计算瓶 *a*₁,*a*₂,*a*₃ 的初级降解率。

C.8 BOD 与时间的曲线图

如有 BOD 与时间的曲线图,应附上。