



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21856—2008

## 化学品 快速生物降解性 二氧化碳产生试验

Chemicals—Ready biodegradability—  
 $\text{CO}_2$  evolution 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

## 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. 301B(1992 年)《二氧化碳产生试验》。

本标准做了下列编辑性修改：

- 增加了范围、术语与定义、质量控制；
- 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、附录 C、附录 D 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：环境保护部南京环境科学研究所。

本标准参加起草单位：环境保护部化学品登记中心、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：石利利、刘济宁、单正军、赵浩然、赵圆、李康、沈根祥。

# 化学品 快速生物降解性 二氧化碳产生试验

## 1 范围

本标准规定了化学品快速生物降解性  $\text{CO}_2$  产生试验的方法概述、试验准备、试验程序、质量控制、数据与报告。

本标准适用于测试可溶于水的、难溶于水的、不挥发的或有吸附作用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

**总碳 total carbon, TC**

试验介质中有机碳和无机碳的总量。

### 2.3

**总有机碳 total organic carbon, TOC**

试验介质(包括溶液和悬浮液)中有机碳的总量。

### 2.4

**溶解性有机碳 dissolved organic carbon, DOC**

溶液中有机碳的含量, 常指通过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤后液体中的有机碳含量, 或经  $4\ 000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $15 \text{ min}$  后上清液中的有机碳含量。

### 2.5

**理论二氧化碳 theoretical carbon dioxide, Th $\text{CO}_2$**

由计算得出的受试物含有的已知或经测定的碳完全无机化应产生的二氧化碳的量。通常以每毫克受试物产生的二氧化碳毫克数表示( $\text{mg}/\text{mg}$ )。

### 2.6

**停滞期 lag phase, LP**

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  $10 \text{ d}$  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。

### 2.9

**稳定期 plateau**

生物降解率趋于稳定(至少三次测定)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) 碳含量;
- g) 主要成分组成比例;
- h) 吸附性;
- i) 微生物毒性。

### 4 方法概述

#### 4.1 原理

在一定体积的接种无机培养基中,含有已知浓度的受试物(10 mg/L~20 mg/L,以 DOC 或 TOC 计)作为唯一的有机碳源,在黑暗或漫射光下,用脱二氧化碳的空气以受控速率对试验培养基进行曝气。通过测定 28 d 二氧化碳产生量来确定降解率。受试物产生的二氧化碳数量用 ThCO<sub>2</sub> 的百分率来表示(经只含接种物的空白试验校正)。生物降解率也可采用接种开始和结束时进行的补充 DOC 测定值来计算。

#### 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

- a) 烧瓶,2 L~5 L,每个烧瓶安装一个出口接近容器底部的通气管(通气管不能干扰磁性搅拌器的使用);
- b) 磁性搅拌器,在测定难溶受试物时使用;
- c) 气体吸收瓶;
- d) 控制和测量空气流量装置;
- e) 净化空气的装置(去除二氧化碳);也可用脱二氧化碳的压缩空气(钢瓶气:20%O<sub>2</sub>,80%N<sub>2</sub>);
- f) 二氧化碳测定装置,滴定仪或无机碳分析仪;
- g) 膜过滤装置(可选);
- h) DOC 分析仪(可选)。

#### 5.2 接种物

##### 5.2.1 接种物的选择

接种物可以来自活性污泥、污水出水口、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单元曝气池中的新鲜样品。如有必要,通过细过滤网去除较大颗粒物后,保持污泥有氧培养状态。

活性污泥在去除颗粒物后,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。当污泥中含有抑制剂时,污泥应被清洗,与试验培养基充分混合后沉淀或离心分离后再悬浮

污泥,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。

活性污泥也可用搅拌器以中等速度将污泥搅拌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的比率,轻轻倒出液体作为接种物。

### 5.2.3 其他来源接种物

接种物也可采自污水处理厂或处理主要生活污水的中试规模单元的二级出水。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,可通过过滤器或离心将接种物浓缩。

### 5.2.4 接种物预处理

如有需要,试验温度下,对接种物曝气培养5 d~7 d。

## 5.3 试验用水

使用高纯度去除毒性物质(如Cu<sup>2+</sup>)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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、21.75 g 磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、33.40 g 二水合磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)和0.5 g 氯化铵(NH<sub>4</sub>Cl),用水溶解,定容至1 L,pH值为7.4。
- b) 氯化钙溶液:称取27.50 g 无水氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)或36.40 g 二水合氯化钙(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>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(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>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(FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>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中溶液a)10 mL加入800 mL试验用水中,再加溶液b), c)和d)各1 mL,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:
  - 含受试物和接种物的试验组;
  - 仅含接种物的接种物空白对照组;
  - 含参比物和接种物的程序对照组。
- b) 必要时:
  - 含受试物和消毒剂无菌消毒对照组;
  - 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,用试验培养基配制储备液或将受试物直接加入试验培养基中,确保受试物溶解或均质化,或按附录B所述处理受试物。

### 6.3 烧瓶的准备

以 5 L 烧瓶装 3 L 悬浮液为例，在保证准确测定所产生的二氧化碳时，也可用较小体积的烧瓶。每个 5 L 烧瓶中加入 2 400 mL 的无机培养基，再加入已制备好的活性污泥，使得接种物的浓度在定容 3 L 后不超过 30 mg/L。对悬浮液用去除 CO<sub>2</sub> 的空气曝气过夜，净化试验系统。

试验瓶中分别加入受试物和(或)参比物贮备液,对于难溶于水的受试物可以直接加入也可采用附录 B 方式处理,受试物终浓度为 10 mg/L~20 mg/L(以 DOC 或 TOC 计),空白仅含接种物,最后用脱 CO<sub>2</sub> 的培养基定容到 3 L。必要时,有氧无菌对照、毒性对照采用相同处理方式。

采用氢氧化钡溶液作吸收剂时,每个5L试验烧瓶串接3个吸收瓶,分别加入0.0125mol/L的氢氧化钡溶液100mL(不能含有硫酸盐和碳酸盐沉淀)。当采用氢氧化钠时,串接2个吸收瓶,第二个吸收瓶用以确定产生的二氧化碳在第一个吸收瓶中已完全吸收,吸收瓶用乳胶瓶塞,每瓶中加入0.05mol/L的氢氧化钠溶液200mL(可能含有微量的碳酸盐,可通过空白对照校正)。也可直接采样测定DOC(见附录C)或用化学方法分析样品含量。

## 6.4 试验操作

将去除 CO<sub>2</sub> 的空气以 30 mL/min~100 mL/min 的流量给悬浮液曝气开始试验。试验前 10 d, 建议每隔 1 d~2 d 测定一次 CO<sub>2</sub>, 其后至少每 5 d 应进行一次, 直到第 28 天, 以确定十天观察期和降解率。测定 CO<sub>2</sub> 时, 拆下直接与试验烧瓶相连的氢氧化钡吸收瓶, 其余吸收瓶顺序前移, 并在末端连接一个新吸收瓶。拆下的吸收瓶, 以酚酞作指示剂用 0.05 mol/L HCl 滴定, 根据 Ba(OH)<sub>2</sub> 浓度的变化确定 CO<sub>2</sub> 产生量。观测第一个吸收瓶出现明显沉淀, 但第二个吸收瓶还未出现沉淀所需的时间, 以确定采样频率。当用 NaOH 作吸收剂时, 用注射器在直接与试验烧瓶相连的吸收瓶中抽取样品, 所需样品的体积依据所使用的碳分析仪, 但试验周期内应确保不因取样而使吸收剂的体积发生较大变化。试验结束时, 测定第二个吸收瓶中的 CO<sub>2</sub> 含量, 以校正试验烧瓶的 CO<sub>2</sub> 产生量。第 28 天时向各个试验瓶中加入 1 mL 浓盐酸通宵曝气驱出试验悬浮液中的 CO<sub>2</sub>, 第 29 天最后测定 CO<sub>2</sub> 产生量。

7 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) 试验进行到第 14 天时,参比物程序对照的降解率(以  $\text{ThCO}_2$  产生量计)不低于 60%;
  - c) 试验培养基中无机碳含量在试验开始时应低于总碳的 5%;
  - d) 试验结束时接种物空白对照中  $\text{CO}_2$  产生总量通常不高于 40 mg/L,如果高于 70 mg/L 时,应对数据和试验方法应进行检验。

## 8 数据与报告

## 8.1 结果处理

- a) 氢氧化钡溶液作吸收剂

根据 HCl 滴定体积,采用下式分别计算接种物、接种物加受试物所产生的 CO<sub>2</sub> 量,二者之差即为受试物降解产生的 CO<sub>2</sub> 量。见式(1):

式中：

TCO<sub>2</sub>—受试物降解产生的CO<sub>2</sub>量,单位为毫克(mg);

V——滴定的 HCl 体积, 单位为毫升(mL)。



c) 结果：

- 将数据填入“数据表”(见附录 D)；
- 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、降解期和十天观察期；
- 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: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<sub>50</sub> 的 1/10(或低于 EC<sub>20</sub>)。若受试物对接种物 EC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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<sup>14</sup>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)  
**难溶性受试物的处理**

对于难溶于水的受试物的生物降解性试验,应特别注意以下问题:

鉴于均质的液体很少有采样问题,因此应采用适当的方法使固体物质均质化,避免非均质造成的误差。当需要从混合物或含大量杂质的受试物中采集几毫克的代表样品时,尤其应特别小心。

试验过程中可采用多种搅拌方式,要注意搅拌到足以使受试物分散、但又不至于出现过热、泡沫过多或过强的分散力。

可使用乳化剂使受试物呈稳定的分散状态,但乳化剂在试验条件下应对接种物无毒、不降解,也不起泡。

对溶剂的要求同乳化剂。

对于固体受试物,乳化剂不得属于固体载运剂,但油性受试物可以使用载运剂。

当使用辅助物质如乳化剂、溶剂和载运剂时,应设置辅助物质空白对照。

附录 C  
(资料性附录)  
有关参数的计算和确定

### C. 1 碳百分含量

碳百分含量可以由已知的元素组成计算得到,或由受试物的元素分析得出。

### C. 2 理论耗氧量(ThOD)

当元素组成确定或已知时,可以计算得出理论耗氧量。对于化合物  $C_c H_h Cl_{cl} N_n Na_{na} O_o P_p S_s$ , 通常基于形成铵盐的降解方式计算 ThOD, 其理论需氧量见式(C. 1):

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW} \quad \dots\dots\dots(C. 1)$$

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  $ThOD_{NO_3}$ , 其理论需氧量见式(C. 2):

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

式(C. 1)和式(C. 2)中:

$ThOD$ ——理论需氧量,以每毫克化学品消耗的氧气量表示(mg/mg);

$c$ ——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  $ThOD$ 。

### C. 3 化学需氧量(COD)

水中可溶性有机物的化学需氧量可用现有方法(如 ISO 6060 法)进行测定。

化学需氧量通常最好用其他方法来测定,即有压力平衡装置的密闭系统 Kelkenberg 法,特别是对于难溶物质的试验中,用该方法可以测定常规方法很难测定的化合物。然而,该方法不能测定像嘧啶类的物质。若重铬酸钾的浓度从 0.002 6 mol/L 增至 0.041 6 mol/L,就可容易地测定 5 mg~10 mg 直接称量加入的物质,这将满足难溶于水物质的化学需氧量测定。

### C. 4 溶解性有机碳(DOC)

溶解有机碳是溶液中的有机碳,通常指通过 0.45  $\mu m$  滤膜的有机碳或经 4 000 r/min 离心 15 min 后保留在上清液中的有机碳含量。

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(取决于碳分析需要的体积)供碳分析,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。

### C. 5 理论二氯化碳( $\text{ThCO}_2$ )

当元素确定或已知时,可以计算得出理论二氧化碳产生量。对于化合物  $C_c H_h Cl_{cl} N_n Na_{na} O_o P_p S_s$ , 其理论二氧化碳产生量见式(C. 3)

式中：

ThCO<sub>2</sub>——理论二氧化碳,单位以每毫克受试物产生的二氧化碳量(mg/mg)表示;

$c$ ——化合物分子中碳原子个数；

MW——化合物相对分子质量。

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  $40\ 000\ m/s^2$ ）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 D**  
**(资料性附录)**  
**CO<sub>2</sub> 产生试验数据表**

**D. 1 实验室****D. 2 试验开始日期****D. 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: mg/L(以化学物质的质量计)

烧瓶中增加的总碳: mg

ThCO<sub>2</sub>: mg**D. 4 接种物**

来源:

处理方式:

前处理,如有:

在反应混合物中悬浮固体浓度: mg/L

**D. 5 CO<sub>2</sub> 的产生和降解性****表 D. 1 CO<sub>2</sub> 的产生和降解性测定结果**

时间/d	CO <sub>2</sub> 产生量/mg					累积 CO <sub>2</sub> 产生量 (试验减空白 的平均值)/mg			% ThCO <sub>2</sub> = $\frac{\text{CO}_2 \text{ 累积量}}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	受试物		空白								
	烧瓶 1	烧瓶 2	烧瓶 3	烧瓶 4	均值 <sup>a</sup>	烧瓶 1	烧瓶 2	烧瓶 1	烧瓶 2	均值 <sup>a</sup>	
0											
n <sub>1</sub>											
n <sub>2</sub>											
n <sub>3</sub>											
n <sub>4</sub>											
28											

<sup>a</sup> 如果在重复试验中得到的数据相差很大,不要取平均值。

注: 相似的格式适用于参比物和毒性对照实验。

#### D.6 二氧化碳分析(可选)

表 D.2 二氧化碳测定结果

时间/d	受试物/(mg/L)	空白试验/(mg/L)
0	( $C_0$ )	( $C_{bl(0)}$ )
28 <sup>a</sup>	( $C_t$ )	( $C_{bl(t)}$ )

<sup>a</sup> 或在培养期结束时。

生物降解率的计算见式(D.1)：

$$D = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(\omega)}}{C_0 - C_{bl(\omega)}} \right] \times 100 \quad \dots \dots \dots \quad (D.1)$$

#### D.7 非生物降解(可选)

非生物降解率的计算见式(D. 2)：