ICS 13.300;13.020.40
A 80

中华人民共和国国家标准

GB/T 21857—2008

化学品　快速生物降解性
改进的OECD筛选试验

Chemicals—Ready biodegradability—Modified OECD screening 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. 301E (1992 年)《改进的 OECD 筛选试验》(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、附录 C 和附录 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:环境保护部化学品登记中心。

本标准参加起草单位:沈阳化工研究院安全评价中心、上海市环境科学研究院、环境保护部南京环境科学研究所。

本标准主要起草人:周红、聂晶磊、刘纯新、蔡磊明、赵玉艳、沈根祥、刘济宁。

化学品　快速生物降解性 改进的OECD筛选试验

1　范围

本标准规定了化学品快速生物降解性改进的OECD筛选试验的方法概述、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　方法简介

4.1　原理

在一定体积的无机培养基中加入已知浓度的受试物(10 mg/L～40 mg/L,以 DOC 计),作为唯一有机碳源,每升培养基接种 0.5 mL 污水处理厂二级出水的滤液。在温度为 22℃±2℃、黑暗或散射光的条件下进行曝气。在 28 d 内,定期测定 DOC 以确定降解率。生物降解率用 DOC 去除浓度(用接种物的空白对照试验校正)计算,以初始浓度的百分比表达。可以通过特定化学分析测定试验开始和结束时受试物的浓度,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

a) 锥形瓶,250 mL～2 L;

b) 震荡器;

c) 配有合适滤膜的过滤器;

d) DOC 测定仪;

e) 溶解氧测定仪;

f) 离心机。

5.2 接种物

5.2.1 接种物的选择

接种物可以采自主要处理生活污水的污水处理厂或中试规模的污水处理装置的二级出水。

5.2.2 接种物的准备

从主要处理生活污水的污水处理厂或中试规模的污水处理装置的曝气池采集二级出水,在运输过程中保持有氧状态。沉淀 1 h 或用粗滤纸过滤,保持上清液或滤出液在有氧状态直到使用。

5.2.3 接种物的预处理

如有需要,在试验温度下,将接种物预处理到符合试验条件,但不是对接种物进行预驯化。预处理包括在试验温度下对(在试验培养基中的)活性污泥或对二级出水曝气培养 5 d ～7 d。

5.3 试验用水

使用去除毒性物质 (如 Cu^{2+})的高纯度去离子水或蒸馏水,并且有机碳含量不得高于受试物浓度的 10%。对于每组系列试验使用同一批水。

5.4 培养基

5.4.1 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)、33.40 g 二水合磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)和 0.5 g 氯化铵(NH_4Cl),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($CaCl_2$)或 36.40 g 二水合氯化钙($CaCl_2 \cdot 2H_2O$),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($MgSO_4 \cdot 7H_2O$),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($FeCl_3 \cdot 6H_2O$),用水溶解,定容至 1 L。

上述贮备液加入 0.05 mL 浓盐酸或 0.4 g/L EDTA 二钠盐缓冲溶液保存。如果贮备液中出现沉淀,则需重新配制。

e) 微量元素溶液:称取 39.9 mg 四水合硫酸锰($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)、57.2 mg 硼酸(H_3BO_3)、42.8 mg七水合硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)、34.7 mg 钼酸铵($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)、100.0 mg 铁-螯

合物($FeCl_3$ · EDTA)用蒸馏水溶解,定容至 1 L。

f) 维生素溶液:称取 15.0 mg 酵母膏溶于 100 mL 蒸馏水中,用 0.2 μm 孔径滤膜过滤除菌,或现用现配制成新鲜的溶液。

5.4.2 试验培养基的制备

在 800 mL 蒸馏水中加入磷酸缓冲液 10 mL ,再分别加入氯化钙溶液、硫酸镁溶液、氯化铁溶液、微量元素溶液、维生素溶液各 1 mL,用蒸馏水定容至 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(两个锥形瓶平行);

——仅含接种物的接种物空白对照组(两个锥形瓶平行);

——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,用去离子水溶解并定容至 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,或按附录 B 所述处理受试物。

6.3 试验操作

6.3.1 锥形瓶的准备

以 2 L 锥形瓶装 1 L 悬浮液为例,锥形瓶中先装入 800 mL 试验培养基,再分别加入受试物或参比物的贮备液,使锥形瓶中 DOC 的质量浓度为 10 mg/L~40 mg/L,调节 pH 值至 7.4。按照每升试验培养基使用 0.5 mL 接种物滤出液的比例将接种物接种进锥形瓶中,用试验培养基定容至 1 L。

同样用试验培养基配制空白对照组,但只加接种物,不加受试物或参比物。

用试验培养基接种一瓶同时含有受试物和参比物的程序对照组检查受试物对接种物的抑制作用。

用经灭菌的未接种的受试物溶液(无菌对照组)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抑制微生物活性。

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。

混合之后,从每个锥形瓶取样测定其初始 DOC 浓度(附录 C)。用铝箔将锥形瓶口盖住,并确保锥形瓶中试验药液和外界空气能自由交换,将锥形瓶置入震荡器中培养。

6.3.2 取样和 DOC 测定

整个试验期间定期从每个锥形瓶中取样测定 DOC 浓度(两个平行)。必须连续测定试验悬浮液和接种物空白平行试验的 DOC。每次测定 DOC 时,试验悬浮液的取样量以满足试验测定的最小量为宜。在取样之前应向锥形瓶中加入适量的水以补充蒸发掉的水分。取样前将培养基充分混合并确保在取样前粘附在容器壁上的物质再次溶解或悬浮。取出的样品应立即用滤膜过滤或离心分离。取样当天对过滤或分离的样品进行测定。否则在 2 ℃~4 ℃最多保持 48 h 或在−18 ℃以下长期保存。

6.3.3 取样频率

取样频率要保证取得足够的样品,从而可以评估十天观察期内 DOC 的去除百分率。取样的模式无法精确描述。如果在取样的当天进行测定,可根据测定结果确定下次的取样时间。如果将样品保存后再测定,则每天取 1 次或每两天取 1 次样品,先测定最后的样品(第 28 天的),用逐步倒退法选择测定

其他样品，这样用相对较小的样品数目可能获得一个很好的生物降解曲线。如果最后的样品(第 28 天的)没有明显降解，其他样品无需再进行测定。

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)不小于 70%。

8 数据与报告

8.1 数据处理

8.1.1 测定数据记录和处理

将试验数据填写在数据记录表中(附录 D)。

8.1.2 生物降解百分率计算

用 DOC 测定平均值计算每次取样时两个试验组的降解率(D_t)。见式(1)：

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

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 平均浓度，单位为毫克每升(mg/L)；

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

所有浓度值为试验中测得。

用两个试验组的平均值，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 DOC 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：

$$D_a = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100 \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：

D_a——非生物降解百分率，%；

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

$C_{s(t)}$——无菌对照组 t 时刻的 DOC 浓度，单位为毫克每升(mg/L)。

8.1.3 初级生物降解百分率计算

当可获得受试物的特定化学分析数据时，可按照式(3)计算初级生物降解百分率。

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \qquad \cdots\cdots(3)$$

式中：

D_t——t 时刻(试验结束时通常为 28 d)的初级生物降解百分率，%；

S_a——试验结束时试验组中受试物的残留量，单位为毫克每升(mg/L)；

S_b——试验结束时无菌对照组中受试物的残留量，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“数据记录表”；

——任何观察到的抑制现象；

——任何观察到的非生物降解；

——受试物质特定化学分析数据（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

A.1 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 ^{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）
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、但又不致于出现过热、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 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 μm 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 ℃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 D
（资料性附录）
改进的 OECD 筛选试验数据记录表

D.1 试验室

D.2 试验的开始日期

D.3 受试物

名称：

受试物储备液浓度： mg/L(以化学物质的质量计)

受试物在试验培养基中的初始浓度，C_0： mg/L(以化学物质的质量计)

D.4 接种物

污水的来源：

预处理：

前期调节，如有：

在反应混合物中的浓度：mg/L

D.5 碳的测定

表 D.1 碳分析

碳分析仪：

项 目	瓶号		n 天后的 DOC 值/(mg/L)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
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 $C_{bl(t)}=\frac{C_{c(t)}+C_{d(t)}}{2}$						

D.6 原始数据的评估

表 D.2 原始数据的评估

瓶 号	结果的计算	n 天后的降解率/%				
		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：参比物可使用类似的格式。						
[a] 当 D_1 和 D_2 相差很大时不应取平均值。						

D.7 非生物降解

非生物降解百分率根据表 D.3 按式(D.1)计算。

表 D.3 非生物降解

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

$$D_{a(t)}=\frac{C_{s(0)}-C_{s(t)}}{C_{s(0)}}\times 100 \qquad \cdots\cdots(D.1)$$

式中：

$D_{a(t)}$——t 时刻的非生物降解百分率，%。

D.8 特定化学分析(可选)

表 D.4 特定化学分析

项 目	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	$\frac{S_b-S_a}{S_b}\times 100$