

TCVN 6918 : 2001

ISO 10634 : 1995

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – HƯỚNG DẪN CHUẨN BỊ VÀ
XỬ LÝ HỢP CHẤT HỮU CƠ ÍT TAN TRONG NƯỚC
ĐỂ ĐÁNH GIÁ SỰ PHÂN HUỖ SINH HỌC
TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC**

*Water quality – Guidance for their preparation and treatment of poorly
water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of
their biodegradability in an aqueous medium*

HÀ NỘI - 2001

Lời nói đầu

TCVN 6918 : 2001 hoàn toàn tương đương với ISO 10634 : 1995.

TCVN 6918 : 2001 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN / TC 147 "Chất lượng nước" biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Chất lượng nước – Hướng dẫn chuẩn bị và xử lý hợp chất hữu cơ ít tan trong nước để đánh giá sự phân huỷ sinh học trong môi trường nước

Water quality – Guidance for their preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả bốn kỹ thuật chuẩn bị hợp chất hữu cơ ít tan trong nước và cho vào các bình thử để thử sự phân huỷ sinh học trong môi trường nước bằng các phương pháp tiêu chuẩn. Các hợp chất thử được đề cập không phải là hợp chất tan hết trong nước để thực hiện các phép thử phân huỷ sinh học theo cách thông thường, như được mô tả trong các phương pháp thử tương ứng chỉ ra ở điều 2.

Các kỹ thuật chuẩn bị gồm:

- bổ sung trực tiếp (điều 3): kỹ thuật này hạn chế đối với các hợp chất thử không bay hơi nếu dùng dung môi và vật liệu hỗ trợ trợ;
- phân tán bằng siêu âm (điều 4): có thể áp dụng kỹ thuật này cho chất lỏng không bay hơi và các hợp chất rắn;
- hấp phụ trên một vật liệu hỗ trợ trợ (điều 5);
- phân tán hoặc tạo nhũ tương với tác nhân tạo nhũ tương (điều 6).

Các phép thử phân huỷ sinh học được sử dụng là các phương pháp sơ bộ dùng phép phân tích cacbon dioxit giải phóng [xem TCVN 6489: 1999 (ISO 9439)] và xác định nhu cầu oxy tiêu thụ (xem TCVN ISO 9408). Tiêu chuẩn này không mô tả phương pháp thử, mà chỉ giới hạn mô tả kỹ thuật đưa chất thử vào môi trường thử và bảo quản chúng trong trạng thái đã phân tán. Thực hiện các kỹ thuật này trong khi tuân thủ theo các điều kiện thử nghiệm được mô tả trong các

TCVN 6918: 2001

phương pháp đã được tiêu chuẩn hoá để ước tính độ phân huỷ sinh học. Cần chú ý rằng không thử các hoá chất bay hơi bằng phương pháp cacbon dioxit đã được qui định trong [TCVN 6489: 1999 (ISO 9439.)]

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN ISO 9408: 1991 Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân huỷ sinh học hiếu khí "hoàn toàn" của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước – Phương pháp xác định nhu cầu oxy trong máy hô hấp kín.

TCVN 6489: 1999 (ISO 9439: 1990) Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân huỷ sinh học hiếu khí "hoàn toàn" của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước – Phương pháp dựa trên sự phân tích cacbon dioxit được giải phóng.

3 Bổ sung trực tiếp

Dùng bất kỳ các kỹ thuật sau đây

- Cân hợp chất thử và cho trực tiếp vào bình thử được khuấy liên tục.

Chú thích 1 – Một số hợp chất hữu cơ tan ít trong nước có thể tan dễ dàng hơn khi thêm kiềm hoặc axit. Các chất này có thể được đưa vào như là một dung dịch gốc axit hoặc kiềm miễn sao không để xảy ra phản ứng với hợp chất thử. Điều chỉnh môi trường thử đến trung tính trước khi thêm chất cấy.

- Cân hợp chất thử trên một vật liệu hỗ trợ trơ thích hợp và cho vào các bình thử được khuấy liên tục.
- Chuẩn bị dung dịch hợp chất thử trong dung môi hữu cơ bay hơi và cho vào các bình thử được khuấy liên tục.

Dung môi, phải dùng với lượng tối thiểu, sau đó được loại ra hoàn toàn, nếu có thể, bằng cách khuấy dung môi trước khi bổ sung môi trường thử vào.

3.1 Thuốc thử

Chọn dung môi hữu cơ bay hơi theo khả năng hoà tan hợp chất thử của nó.

Dung môi được chọn phải không phản ứng với hợp chất thử hoặc với bất kỳ thành phần nào của môi trường.

Dung môi phải không có khả năng phân huỷ sinh học và không độc đối với vi khuẩn trong các điều kiện thử phân huỷ sinh học sau đó, đặc biệt, nếu là loại dung môi không thể loại bỏ được hoàn toàn.

Các dung môi thích hợp là axêton hoặc dicloromethan.

3.2 Thiết bị, dụng cụ

3.2.1 Vật liệu hỗ trợ trợ, có thể đưa được vào các bình thử, ví dụ lam kính của kính hiển vi.

3.2.2 Máy khuấy, số lượng đủ để đảm bảo cho tất cả các bình thử đã dùng trong các phép thử phân huỷ sinh học tương ứng được khuấy.

Que khuấy phải là loại vật liệu không bọc nhựa để không làm nhiễm bẩn môi trường thử và không hấp phụ hợp chất thử. Cần tránh làm nóng bình thử khi khuấy và tránh làm tăng nhiệt độ thử nghiệm.

3.3 Cách tiến hành

3.3.1 Bổ sung trực tiếp

Có thể cân các hợp chất thử có cấu trúc tinh thể và cho trực tiếp vào các bình thử.

Có thể cho các hợp chất lỏng không nhớt vào bằng bơm tiêm có độ chính xác cao.

Các hợp chất thử dễ tan trong nước ở các điều kiện axit hoặc kiềm có thể được đưa vào như là các dung dịch gốc. Chuẩn bị dung dịch gốc của hợp chất thử trên trong nước đã được loại ion và điều chỉnh pH đủ cao hoặc đủ thấp bằng axit hoặc kiềm vô cơ. Thêm một lượng dung dịch gốc thích hợp vào môi trường thử để thu được nồng độ hợp chất thử trong các bình thử theo yêu cầu. Đo pH của môi trường và nếu cần, hiệu chỉnh pH trước khi thêm chất cấy.

3.3.2 Sử dụng vật liệu hỗ trợ trợ

Nghiền hợp chất thử rắn càng mịn càng tốt trước khi cân. Cân các chất lỏng, kể cả các chất nhớt, nhưng không xử lý hoặc, nếu cần, làm cứng trong nitơ lỏng và nghiền mịn trước khi cân.

Cân trên vật liệu hỗ trợ (3.2.1) một lượng hợp chất tương ứng với nồng độ ban đầu của cacbon hữu cơ được dùng theo yêu cầu của phương pháp thử.

Cho chất này vào mỗi bình thử, và cũng đưa vật liệu hỗ trợ nhưng không có hợp chất thử vào mỗi bình đối chứng.

Duy trì việc khuấy bằng máy khuấy (3.2.2) trong suốt phép thử phân huỷ sinh học.

3.3.3 Sử dụng dung môi

Pha dung dịch hợp chất thử với một lượng tối thiểu dung môi hữu cơ đã chọn (3.1).

Cho vào các bình thử một lượng dung dịch cần thiết để thu được nồng độ ban đầu của cacbon hữu cơ theo yêu cầu của phương pháp thử được dùng.

Cho cùng một lượng dung môi nhưng không có hợp chất thử vào mỗi bình đối chứng.

Nếu có thể, làm bay hơi hoàn toàn dung môi bằng các phương pháp thích hợp.

Chú thích 2 – Dung dịch thử có thể lan ra toàn bộ đáy các bình thử và khi đó hệ thống được làm sạch bằng khí và/hoặc bằng cách khuấy. Rất khó loại bỏ các vết dung môi trước đó. Có thể xảy ra sự cản trở nếu dung môi là loại phân huỷ sinh học hoặc gây ức chế đến vi khuẩn.

Sau đó tiến hành phép thử phân huỷ sinh học.

4 Phân tán siêu âm

Chuẩn bị nhũ tương hoặc dung dịch phân tán của hợp chất thử bằng ống siêu âm và cho vào các bình thử được khuấy liên tục (xem 3.2.2).

4.1 Thiết bị, dụng cụ

4.1.1 Bộ chuyển đổi siêu âm, có khả năng tạo ra tần số xấp xỉ 20 kHz.

4.1.2 Máy khuấy, số lượng đủ để đảm bảo tất cả các bình thử có thể được khuấy (xem 3.2.2).

4.2 Cách tiến hành

Cho 10 g hoặc 10 ml hợp chất thử vào cốc dung tích 500 ml có chứa khoảng 400 ml nước đã loại ion.

Hợp chất thử phải dư sao cho thu được một dung dịch bão hoà. Lắp đặt bộ chuyển đổi siêu âm (4.1.1) sao cho đầu của bộ này càng gần với mặt phân cách giữa nước và hợp chất thử càng tốt.

Dùng máy khuấy (4.1.2) để khuấy các cốc sao cho hợp chất được khuấy tận xuống đáy.

Đặt bộ chuyển đổi để có được tần số khoảng 20 kHz và duy trì tần số này trong 30 min.

Tắt bộ chuyển đổi và để nhũ tương hoặc dung dịch phân tán ổn định từ 15 min đến 30 min, sau đó gạn bỏ hợp chất thử dư sang bình đựng khác.

Chú thích

3 Các tỉ lệ và con số được đưa ra chỉ là hướng dẫn. Chúng phụ thuộc vào đặc tính của hợp chất thử.

4 Một số chất sẽ bị phân huỷ do nhiệt nếu xảy ra sự sinh nhiệt tại đầu cực. Điều này cũng dẫn đến sự tăng nhiệt độ đáng kể của dung dịch. Có thể tránh hiện tượng này bằng cách đo và kiểm soát nhiệt độ, giảm năng lượng nguồn tạo âm hoặc làm gián đoạn nguồn tạo âm. Trong một số trường hợp, có thể gặp hiện tượng này do sự phân huỷ hoá học. Nếu xảy ra, thì nên sử dụng phương pháp khác.

Dùng phương pháp phân tích thích hợp [phân tích cụ thể hoặc phân tích cacbon hữu cơ tổng số (TOC)], phân tích phần mẫu nhỏ của nhũ tương hoặc dung dịch phân tán thu được và xác định nồng độ của hợp chất thử.

Cho một thể tích thích hợp nhũ tương hoặc dung dịch phân tán vào các bình thử để thu được nồng độ ban đầu của cacbon hữu cơ theo yêu cầu của phương pháp thử được sử dụng.

Duy trì việc khuấy trong suốt phép thử phân huỷ sinh học.

Chú thích 5 – Có thể rất khó khăn để có được nhũ tương hoặc dung dịch phân tán ổn định. Do vậy, cần đặc biệt cẩn thận khi phân chia mẫu nhỏ vào các bình thử. Nếu thực tế không thể thu được nhũ tương đủ ổn định hoặc nồng độ đủ cao để tiến hành phép thử thì có thể cho trực tiếp hợp chất thử vào môi trường thử và để phân tán bằng siêu âm trong các bình thử trước khi thêm chất cấy.

5 Hấp phụ lên vật liệu hỗ trợ

Hợp chất thử được hấp phụ lên trên vật liệu hỗ trợ và được đưa vào các bình thử. Hợp chất này được phân tán vào môi trường bằng cách liên tục khuấy.

5.1 Thuốc thử

5.1.1 Vật liệu hỗ trợ

Có thể sử dụng silicagel, màng lọc sợi thuỷ tinh hoặc vật liệu hỗ trợ không phân huỷ sinh học khác nhưng không giải phóng cacbon hữu cơ hoặc vô cơ vào môi trường nước.

Trước tiên phải tiến hành xác định rằng vật liệu hỗ trợ là trơ và không có cacbon; để tránh hoặc để giảm thiểu ảnh hưởng ở vùng bề mặt, khối lượng của vật liệu hỗ trợ phải nhỏ nhất. Hợp chất thử phải được hấp phụ lên trên bề mặt nhưng không hấp phụ và cố định quá mạnh lên vật liệu hỗ trợ.

Chú thích 6 – Ví dụ, nếu dùng silica gel, các vật liệu hỗ trợ sau là thích hợp

- dùng silicagel cho sắc ký lớp mỏng (cỡ hạt 15 µm);
- dùng silicagel cho sắc ký cột (cỡ hạt từ 200 µm đến 500 µm).

5.1.2 Dung môi

Chọn dung môi bay hơi theo khả năng hoà tan hợp chất thử.

Dung môi phải không độc đối với vi khuẩn và nếu có thể, phải không có khả năng phân huỷ sinh học trong các điều kiện của các phép thử phân huỷ sinh học tiếp sau. Dung môi này phải được kiểm tra trước hoặc sau các phép thử phân huỷ sinh học.

Tùy thuộc vào hợp chất thử, axeton hoặc dichloromethan có thể là thích hợp.

5.2 Thiết bị, dụng cụ

5.2.1 Máy khuấy, số lượng đủ để đảm bảo tất cả các bình thử được khuấy. (xem 3.2.2).

5.3 Cách tiến hành

Chuẩn bị lượng hợp chất thử đã được thấm trên vật liệu hỗ trợ theo yêu cầu của phương pháp thử phân huỷ sinh học được sử dụng.

Trộn cùng lúc và khuấy 30 g vật liệu hỗ trợ (5.1.1) và 150 ml dung dịch hợp chất thử 1 g/l trong dung môi đã chọn (5.1.2) vào trong một bình dung tích 250 ml trong 2 h. Cùng lúc, tiến hành theo cách tương tự nhưng chỉ dùng chất hấp phụ và dung môi như là chất đối chứng.

Trong cả hai trường hợp, thu lại vật liệu hỗ trợ và sấy khô bằng cách làm bay hơi toàn bộ dung môi. Lần lượt thực hiện thao tác này theo trình tự thiết bị quay làm bay hơi, lò có thổi khí và lò chân không ở khoảng 45 °C.

Chú thích 7 – Có thể khó loại bỏ các vết dung môi còn lại sau cùng. Có thể có sự cản trở nếu dung môi có khả năng bị phân huỷ sinh học hoặc gây ức chế tới vi khuẩn.

Xác định lượng chất thử đã thấm lên trên vật liệu hỗ trợ trong ba mẫu 1,5 g hoặc nhiều hơn, dùng một trong các phương pháp sau:

- dùng máy phân tích cacbon tổng số nhiệt độ cao để phân tích định lượng nguyên tố của lượng cacbon khởi nguồn từ hợp chất, và sau đó trừ đi giá trị thu được cho chất hấp phụ đã được xử lý chỉ với dung môi;
- xác định nhu cầu oxy hoá học của hợp chất đã thấm lên vật liệu hỗ trợ trợ và sau đó trừ đi giá trị có được cho vật liệu hỗ trợ đã xử lý chỉ với dung môi;
- chiết hợp chất dùng dung môi hữu cơ và phân tích định lượng dùng phép phân tích cụ thể.

Từ lượng hợp chất thử hấp phụ lên trên vật liệu hỗ trợ, xác định lượng vật liệu hỗ trợ đã được đưa vào các bình thử để thu được nồng độ cacbon hữu cơ ban đầu của hợp chất thử theo yêu cầu của phương pháp thử được sử dụng.

Cho cùng một lượng vật liệu hỗ trợ đã được xử lý với dung môi vào mỗi bình đối chứng.

Phải tính đến mọi sự phân huỷ sinh học khi tính toán các kết quả.

Duy trì việc khuấy liên tục trong suốt phép thử phân huỷ sinh học.

6 Dung dịch phân tán với tác nhân tạo nhũ tương

Chuẩn bị dung dịch phân tán hoặc nhũ tương của hợp chất thử bằng cách dùng tác nhân tạo nhũ tương và cho vào các bình thử được lắc liên tục.

6.1 Thuốc thử

6.1.1 Dung môi cho giai đoạn nhũ tương

Nếu cần, chọn dung môi bay hơi và có thể pha trộn với nước theo khả năng hoà tan hợp chất thử. Có thể khó khăn khi loại bỏ loại dung môi có khả năng pha trộn với nước cao. Trong trường hợp đó các dung môi này không được dùng.

Dung môi phải không gây độc đối với vi khuẩn và không có khả năng phân huỷ sinh học trong các điều kiện của phép thử phân huỷ sinh học tiếp sau (ví dụ pentan, hexan hoặc 1,1-dichloro-1-fluoroethan).

6.1.2 Tác nhân tạo nhũ tương

Tác nhân tạo nhũ tương phải không có khả năng phân huỷ sinh học và không gây độc trong các điều kiện của phép thử phân huỷ sinh học tiếp sau.

Chú thích 8 – Nếu không biết sự phân huỷ sinh học và sự ức chế đối với vi khuẩn của tác nhân tạo nhũ tương, thì phải nghiên cứu trước hoặc tiến hành phép thử bổ sung cho các phép thử phân huỷ sinh học tiếp sau, ví dụ dùng một bình chỉ chứa tác nhân tạo nhũ tương để đo sự phân huỷ sinh học, một bình chứa tác nhân tạo nhũ tương và chất đối chứng như natri benzoat để đo sự ức chế.

Các chất¹⁾ sau đây có thể được dùng:

- a) một khối copolyme của oxit etylen và oxit propylen với giá trị cân bằng hydrophilic-lipophilic khoảng bằng 9.
- b) một khối copolyme của oxit etylen và oxit propylen với giá trị cân bằng hydrophilic-lipophilic khoảng bằng 13,5.
- c) polyetylen sorbitan trioleat.

6.2 Thiết bị, dụng cụ

6.2.1 Máy khuấy, số lượng đủ để đảm bảo tất cả các bình thử được khuấy (xem 3.2.2).

6.3 Các phép thử sơ bộ để chọn tác nhân tạo nhũ tương

Ví dụ, chuẩn bị ba dung dịch của hợp chất thử (x mg) trong y ml dung môi (6.1.1) (trong trường hợp là 1,1-dichloro-1-fluoroethan dùng khoảng 10 ml) với một trong các tác nhân tạo nhũ tương sau:

¹⁾ Synperonic PE/P94, Synperonic PE/P103 hoặc Tween 85 là các ví dụ về các chất thích hợp tương ứng với các chất a) , b) và c) tương ứng có sẵn trên thị trường. Thông tin được đưa ra để tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không đưa ra xác nhận của tiêu chuẩn đối với chất lượng sản phẩm này.

TCVN 6918: 2001

- a) chất [6.1.2 a)] ở $x/2$ mg
- b) chất [6.1.2 b)] ở $x/2$ mg;
- c) hỗn hợp của chất [6.1.2 a)] ở $x/4$ mg và chất [6.1.2 b)] ở $x/4$ mg.

Tính lượng hợp chất hoà tan trong dung môi (x mg) để có được nồng độ cacbon hữu cơ trong hợp chất thử trong môi trường theo yêu cầu của phương pháp thử sử dụng.

Làm đồng nhất bằng cách khuấy đều trong 10 min, sau đó thêm từng giọt dung dịch thu được vào trong mỗi bình thử chứa thể tích môi trường thử yêu cầu được qui định cho phép thử phân huỷ sinh học. Loại bỏ dung môi bằng cách khuấy đều (trong trường hợp là 1,1-dichloro-1-fluoroethan, ví dụ khuấy trong 1 h ở 30 °C) hoặc dùng bất kỳ phương pháp thích hợp khác.

Đánh giá bằng mắt để chọn cách pha a), b) hoặc c) tạo ra nhũ tương đồng nhất.

6.4 Cách tiến hành

Pha đủ lượng nhũ tương hoặc dung dịch phân tán cần để tiến hành phép thử phân huỷ sinh học được dùng theo cách tiến hành đã chọn từ kết quả của các phép thử sơ bộ.

Pha nhũ tương hoặc huyền phù chỉ chứa môi trường thử và chất tạo nhũ tương cho bình đối chứng để kiểm tra rằng chất tạo nhũ tương có phân huỷ sinh học không vượt quá 10% so với hợp chất thử.

Phải tính đến kết quả thu được từ các bình này khi tính toán các kết quả.

Duy trì việc khuấy liên tục trong suốt phép thử phân huỷ sinh học.

7 Báo cáo thử nghiệm

Trước hết, báo cáo thử nghiệm về sự phân huỷ sinh học của hợp chất ít tan trong nước phải bao gồm dữ liệu mà phương pháp phân huỷ sinh học tiêu chuẩn yêu cầu. Thêm vào đó, báo cáo thử nghiệm phải trích dẫn tiêu chuẩn này, qui định phương pháp đã dùng và bất kỳ một sự thay đổi nào liên quan tới qui trình, bao gồm các thông tin sau:

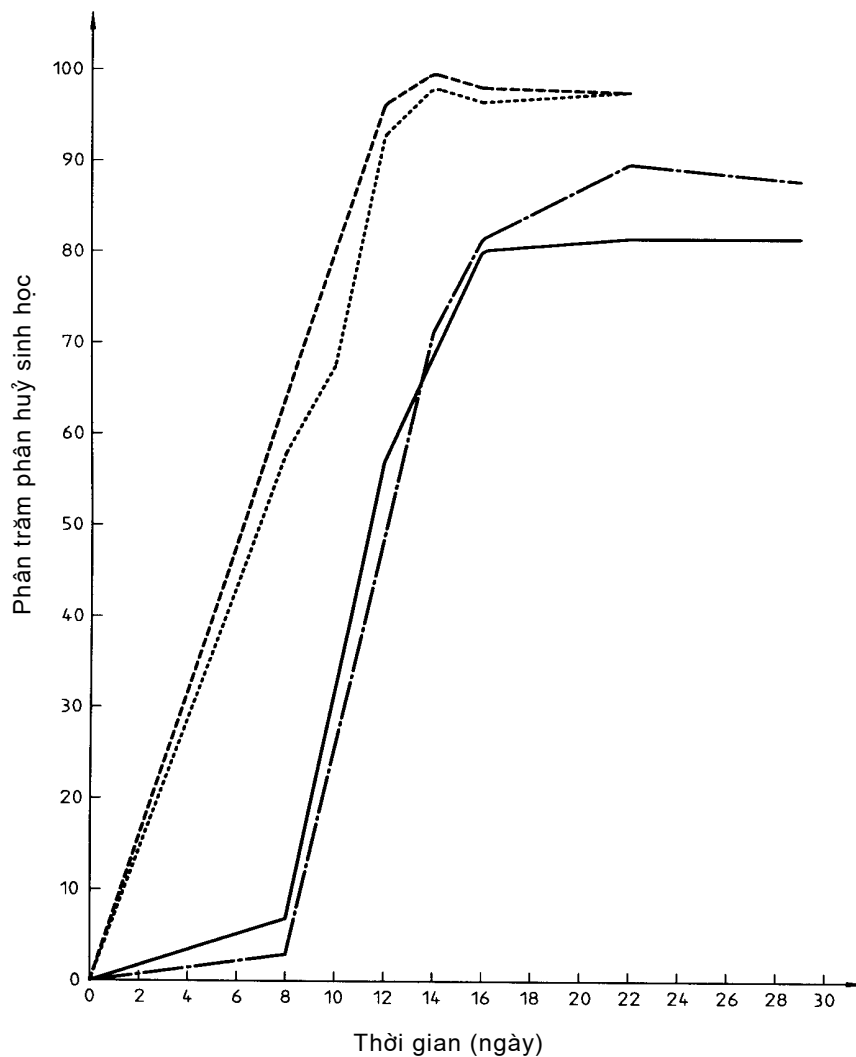
- a) mọi xử lý trước của hợp chất trước khi thử;
- b) phương pháp cho hợp chất thử vào;
- c) khoảng thời gian và mức độ xử lý;
- d) bản chất và lượng vật liệu hỗ trợ, dung môi hoặc tác nhân tạo nhũ tương;
- e) nồng độ hợp chất trong nhũ tương hoặc dung dịch phân tán;
- f) mức độ phát hiện hợp chất thử hấp phụ;
- g) tốc độ phân huỷ của tác nhân tạo nhũ tương có được trong phép thử ở bình đối chứng;
- h) tác động rõ ràng của hợp chất thử trong phép thử phân huỷ sinh học (ví dụ sự hình thành của các tập hợp, sự xuất hiện của các pha).

Phụ lục A

(tham khảo)

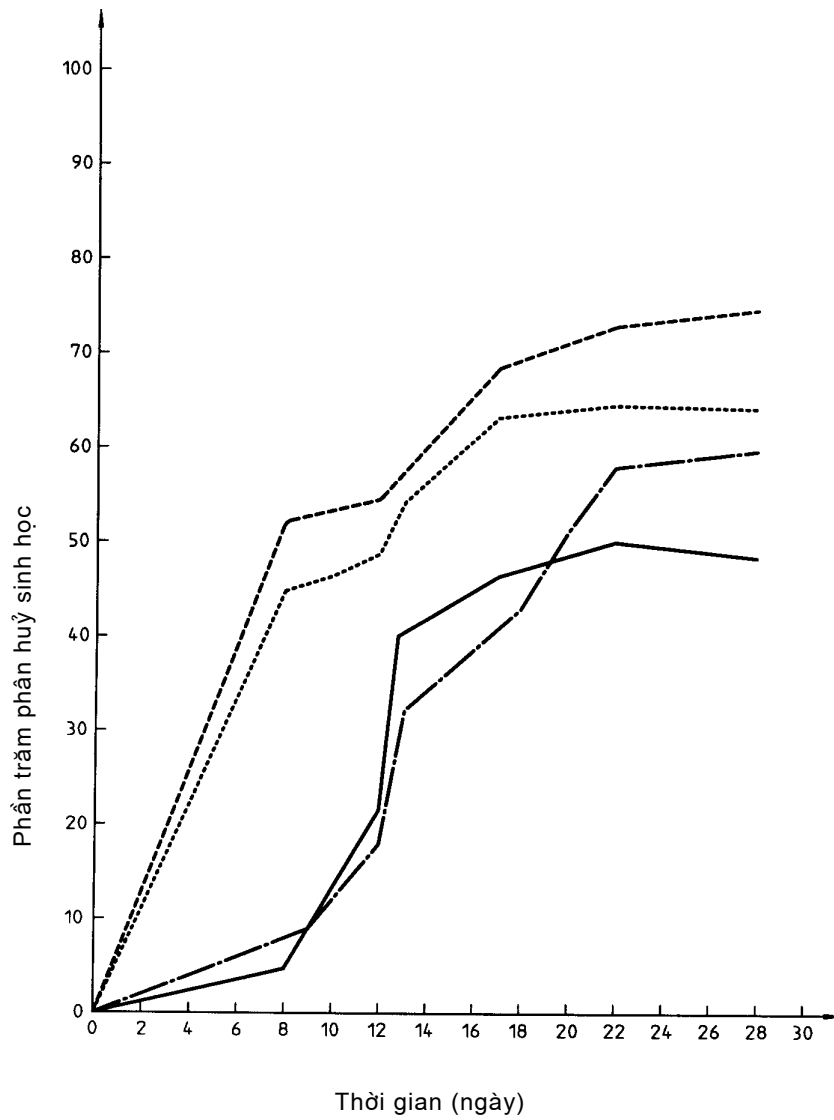
Ví dụ về đường cong phân huỷ sinh học

Phụ lục này đưa ra ví dụ về đường cong phân huỷ sinh học (xem hình A.1 và A.2) thu được bằng cách sử dụng bốn kỹ thuật chuẩn bị đã được mô tả trong phần chính của tiêu chuẩn này. Sử dụng phép thử phân huỷ sinh học tiếp sau được tiến hành theo phương pháp cacbon dioxide đã qui định trong TCVN 6489: 1999 (ISO 9439).



- Thêm vào trực tiếp
- .-.-.-.- Phân tán bằng siêu âm
- Hấp phụ lên trên vật liệu hỗ trợ
- Phân tán với một tác nhân tạo nhũ tương

Hình A.1 - Đường cong phân huỷ sinh học khi dùng diisooctylphtalat là hợp chất thử



- _____ Thêm vào trực tiếp
- Phân tán bằng siêu âm
- Hấp phụ lên trên vật liệu hỗ trợ trợ
- Phân tán với một tác nhân tạo nhũ tương

Hình A.2 – Đường cong phân huỷ sinh học khi dùng anthraquino là hợp chất thử