

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 11318:2016
ISO 14851:1999**

**XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN HỦY SINH HỌC HIẾU KHÍ
HOÀN TOÀN CÁC VẬT LIỆU NHỰA TRONG MÔI TRƯỜNG
NƯỚC - PHƯƠNG PHÁP ĐO NHU CẦU OXY TRONG THIẾT
BỊ ĐO TIÊU HAO OXY KHÉP KÍN**

Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium - Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11318:2016 hoàn toàn tương đương với ISO 14851:1999
và đính chính kỹ thuật 1:2005

TCVN 11318:2016 do Tổng cục Môi trường biên soạn, Bộ Tài nguyên
và Môi trường đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng
thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Do việc sử dụng chất dẻo ngày càng gia tăng, dẫn đến việc thu hồi và thải bỏ vật liệu này trở thành một vấn đề lớn. Vì là ưu tiên hàng đầu nên việc thu hồi cần phải được đẩy mạnh, tuy nhiên thu hồi hoàn toàn chất dẻo là một việc khó khăn. Ví dụ, rác chất dẻo chủ yếu từ các hàng hóa tiêu dùng rất khó để thu hồi hoàn toàn. Các ví dụ khác về các chất dẻo khó thu hồi là lưới đánh cá, màng phủ trong nông nghiệp và các polyme tan được trong nước. Các vật liệu bằng chất dẻo này có xu hướng bị rò rỉ ra khỏi các hệ thống xử lý nước khép kín và đi vào trong môi trường. Hiện nay, chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học nổi lên như một lựa chọn mà có khả năng giải quyết các vấn đề môi trường này. Vật liệu bằng chất dẻo như các sản phẩm hoặc bao gói được đưa đến khu xử lý tạo compost có khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn. Bởi vậy, việc xác định khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn của các vật liệu này là rất quan trọng và đưa ra chỉ dẫn về khả năng phân hủy sinh học trong các môi trường tự nhiên.

Xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn các vật liệu nhựa trong môi trường nước - Phương pháp đo nhu cầu oxy trong thiết bị đo tiêu hao oxy khép kín

Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium – Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer

CẢNH BÁO Trong nước thải, bùn hoạt hóa, đất và compost có thể tồn tại các sinh vật gây bệnh, do đó cần có biện pháp đề phòng thích hợp khi xử lý các chất này. Nên cẩn thận với các chất thử có độc tính và các chất chưa biết rõ tính chất.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định mức độ phân hủy sinh học hiếu khí của vật liệu chất dẻo, bao gồm cả các vật liệu có chứa phụ gia, bằng cách đo nhu cầu oxy trong hô hấp kế kín. Vật liệu thử được cho tiếp xúc trong môi trường nước dưới các điều kiện thử nghiệm với vật liệu cấy được lấy từ bùn hoạt hóa, compost hoặc đất.

Nếu sử dụng bùn hoạt hóa không thích ứng làm vật liệu cấy thì phép thử này mô phỏng quá trình phân hủy sinh học xảy ra trong môi trường nước tự nhiên; nếu sử dụng vật liệu cấy đã được cho tiếp xúc trước hoặc trộn sẵn thì có thể sử dụng phương pháp này để kiểm tra khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn của vật liệu thử.

Các điều kiện được sử dụng trong tiêu chuẩn này không cần thiết phải giống với các điều kiện tối ưu để quá trình phân hủy sinh học tối đa xảy ra, nhưng tiêu chuẩn này được xây dựng để xác định khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn của các vật liệu chất dẻo hoặc đưa ra chỉ dẫn về khả năng phân hủy sinh học của vật liệu trong các môi trường tự nhiên.

Phương pháp này giúp cho việc đánh giá khả năng phân hủy sinh học có thể được cải thiện bằng cách tính toán cân bằng cacbon (tùy chọn, xem phụ lục E).

Phương pháp này áp dụng cho các vật liệu sau:

- Polyme tổng hợp và/hoặc tự nhiên, polyme đồng trùng hợp (copolyme) hoặc hỗn hợp của cả hai;

TCVN 11318:2016

- Vật liệu chất dẻo có các phụ gia như chất hóa dẻo, chất màu hoặc các hợp chất khác;
- Polyme tan được trong nước;
- Vật liệu mà trong các điều kiện của phép thử không ức chế các vi sinh vật có trong vật liệu cấy. Có thể xác định các ảnh hưởng ức chế bằng cách sử dụng phương pháp kiểm soát ức chế hoặc một phương pháp thích hợp khác (ví dụ xem ISO 8192^[3]). Nếu vật liệu thử ức chế vi sinh vật trong vật liệu cấy thì sử dụng loại vật liệu cấy khác hoặc sử dụng vật liệu cấy được phơi nhiễm trước với nồng độ thử thấp hơn.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6634:2000 (ISO 8245:1999), *Chất lượng nước – Hướng dẫn xác định cacbon hữu cơ tổng số (TOC) và cacbon hữu cơ hòa tan (DOC)*.

TCVN 6827:2001 (ISO 9408:1999), *Chất lượng nước – Đánh giá sự phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước bằng cách xác định nhu cầu oxy trong máy đo hô hấp kín*

TCVN 6981:2001 (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 hủy sinh học trong môi trường nước*.

ISO/TR 15462:1997, *Water quality – Selection of tests for biodegradability (Chất lượng nước – Lựa chọn các phép thử phân hủy sinh học)*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây

3.1

Phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn (ultimate aerobic biodegradation)

Phân hủy một hợp chất hữu cơ bởi các vi sinh vật hiếu khí có mặt oxy, tạo thành cacbon dioxide, nước và muối khoáng của nguyên tố bất kỳ có mặt (quá trình khoáng hóa) cộng với sinh khối mới.

3.2

Bùn hoạt hóa (activated sludge)

Sinh khối tạo thành trong quá trình xử lý hiếu khí nước thải do sự phát triển của vi khuẩn và các vi sinh vật khác khi có mặt của oxy hòa tan.

3.3

Hàm lượng chất rắn lơ lửng trong bùn hoạt tính (concentration of suspended solids in an activated sludge)

Lượng chất rắn thu được bằng cách lọc hoặc ly tâm một thể tích bùn hoạt hóa đã biết và sấy khô ở khoảng 105 °C đến khối lượng không đổi.

3.4

Nhu cầu oxy sinh hóa (biochemical oxygen demand)

BOD

Nồng độ khối lượng oxy hòa tan bị tiêu tốn trong điều kiện xác định bởi quá trình oxy hóa sinh học hiếu khí một hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ trong nước, được biểu thị bằng miligam oxy tiêu tốn trên miligam hoặc gam hợp chất thử

3.5

Nhu cầu oxy lý thuyết (theoretical oxygen demand)

ThOD

Lượng oxy lý thuyết tối đa cần để oxy hóa hoàn toàn một hợp chất hóa học, tính theo công thức phân tử, được biểu thị bằng miligam oxy tiêu tốn trên một miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.6

Tổng số Cacbon hữu cơ (total organic carbon)

TOC

Tất cả cacbon có trong một hợp chất hữu cơ, hòa tan hoặc lơ lửng trong nước.

3.7

Cacbon hữu cơ hòa tan (dissolved organic carbon)

DOC

Phần cacbon hữu cơ trong nước mà không thể loại bỏ được bằng quá trình phân tách pha quy định, ví dụ bằng cách ly tâm trong 15 min ở 40.000 m.s⁻² hoặc bằng cách lọc qua màng lọc có đường kính lỗ từ 0,2 µm đến 0,45 µm.

3.8

Giai đoạn thích ứng (lag phase)

Thời gian, tính bằng ngày, từ khi bắt đầu phép thử cho đến khi đạt được sự thích nghi và/hoặc sự chọn lọc thích nghi của vi sinh vật phân hủy và khi đó mức độ phân hủy sinh học của một hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ đạt được khoảng 10 % của mức độ phân hủy sinh học tối đa.

3.9

Mức phân hủy sinh học tối đa (maximum level of biodegradation)

Mức độ phân hủy sinh học, tính bằng phần trăm, của một hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ trong một phép thử mà trên mức đó không có sự phân hủy sinh học không còn xảy ra thêm nữa.

3.10

Giai đoạn phân hủy sinh học (biodegradation phase)

Thời gian, tính bằng ngày, từ khi kết thúc giai đoạn thích ứng của phép thử cho đến khi đạt được khoảng 90 % mức phân hủy sinh học tối đa.

3.11

Giai đoạn ổn định (plateau phase)

Thời gian, tính bằng ngày, từ khi kết thúc giai đoạn phân hủy sinh học cho đến khi kết thúc phép thử.

3.12

Tiếp xúc trước (pre-exposure)

Quá trình tiếp xúc trước vật liệu cấy với hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ cần thử để tăng khả năng của vật liệu cấy phân hủy sinh học vật liệu thử bằng cách làm thích nghi và/hoặc chọn lọc các vi sinh vật.

3.13

Làm thích nghi trước (pre-conditioning)

Quá trình tiếp xúc trước vật liệu cấy trong các điều kiện của phép thử sau đó nhưng không có mặt của hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ cần thử để cải thiện tính năng của phép thử bằng cách cho vi sinh vật thích nghi trước với các điều kiện của phép thử.

4 Nguyên tắc

Khả năng phân hủy sinh học của một vật liệu chất dẻo được xác định bằng cách sử dụng các vi sinh vật hiếu khí trong môi trường nước. Hỗn hợp thử gồm môi trường vô cơ, vật liệu thử hữu cơ (nguồn cacbon và năng lượng duy nhất) có nồng độ cacbon hữu cơ từ 100 mg/l đến 2000 mg/l và vật liệu cấy là bùn hoạt hóa hoặc huyền phù của đất hoạt tính hoặc compost. Hỗn hợp này được khuấy trộn trong các bình thử kín của một hồ hấp kế trong một khoảng thời gian không quá 6 tháng. Lượng cacbon dioxit sinh ra được hấp thụ bởi chất hấp thụ thích hợp ở khoảng không bên trên của các bình thử. Lượng oxy tiêu tốn (BOD) được xác định bằng cách đo lượng oxy cần thiết để duy trì một thể tích khí không đổi trong các bình thử của máy đo hồ hấp hoặc bằng cách đo tự động hoặc thủ công sự thay đổi thể tích hoặc áp suất (hoặc kết hợp cả hai). Ví dụ về máy đo hồ hấp thích hợp được nêu tại Phụ lục C. Có thể sử dụng loại chai kín hai pha như mô tả trong ISO 10708^[4] (xem Phụ lục D).

Mức phân hủy sinh học, biểu thị bằng phần trăm, được xác định bằng cách so sánh BOD với nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD). Phải tính tới ảnh hưởng của quá trình nitrat hóa đến lượng BOD. Kết quả thử là

mức phân hủy sinh học tối đa xác định được từ giai đoạn ổn định của đồ thị phân hủy sinh học. Ngoài ra, có thể tính toán cân bằng cacbon để cung cấp thông tin bổ sung cho quá trình phân hủy sinh học (xem phụ lục E).

Khác với TCVN 6827 (ISO 9408), sử dụng được cho các hợp chất hữu cơ khác nhau, tiêu chuẩn này được sử dụng để xác định khả năng phân hủy sinh học của các vật liệu chất dẻo. Các yêu cầu đặc biệt này tác động đến việc lựa chọn vật liệu cấy và môi trường thử và có khả năng cải thiện sự đánh giá khả năng phân hủy sinh học thông qua việc tính cân bằng cacbon.

5 Môi trường thử

Quá trình ủ phải được thực hiện trong bóng tối hoặc trong ánh sáng khuếch tán, trong một không gian khép kín không chứa các hơi có thể ức chế vi sinh vật và được duy trì ở nhiệt độ không đổi, tốt nhất từ 20 °C đến 25 °C, dao động trong khoảng ± 1 °C hoặc tại nhiệt độ thích hợp khác phụ thuộc vào vật liệu cấy sử dụng và môi trường cần đánh giá.

CHÚ THÍCH ĐỐI VỚI VẬT LIỆU CÁY COMPOST, SỬ DỤNG NHIỆT ĐỘ CAO HƠN CÓ THỂ PHÙ HỢP.

6 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích.

6.1 Nước cất hoặc nước khử ion, không có độ dẫn (được biệt là đồng) và có hàm lượng DOC nhỏ hơn 2 mg/l.

6.2 Môi trường thử

Tùy thuộc vào mục đích của phép thử, có thể sử dụng môi trường thử khác nhau. Ví dụ, nếu mô phỏng một môi trường tự nhiên thì sử dụng môi trường thử chuẩn (6.2.1). Nếu vật liệu thử được sử dụng ở nồng độ cao hơn thì sử dụng môi trường thử tối ưu (6.2.2) với lượng đệm và nồng độ chất dinh dưỡng cao hơn.

6.2.1 Môi trường thử chuẩn

6.2.1.1 Dung dịch A

Hòa tan

Kali dihydro photphat khan (KH_2PO_4)	8,5 g
Dikalí hydro photphat khan (K_2HPO_4)	21,75 g
Dinatri hydro photphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33,4 g
Amoni clorua (NH_4Cl)	0,5 g

trong nước (6.1) và cho thêm nước đến 1 000 ml.

CHÚ THÍCH Có thể kiểm tra thành phần chính xác của dung dịch bằng cách đo pH, giá trị phải bằng 7,4.

TCVN 11318:2016

6.2.1.2 Dung dịch B

Hòa tan 22,5 g magie sunphat heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) trong nước (6.1) và thêm nước đến 1 000 ml.

6.2.1.3 Dung dịch C

Hòa tan 36,4 g canxi clorua dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) trong nước (6.1) và thêm nước đến 1 000 ml.

6.2.1.4 Dung dịch D

Hòa tan 0,25 g sắt (III) clorua hexahydrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) trong nước (6.1) và thêm nước đến 1 000 ml.

Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng để tránh kết tủa, hoặc thêm một giọt axit clohydric đậm đặc (HCl) hoặc một giọt dung dịch nước của etylendiamintetraaxetic axit 0,4 g/l (EDTA).

6.2.1.5 Chuẩn bị

Để chuẩn bị 1 lít môi trường thử thì thêm vào khoảng 500 ml nước (6.1)

- 10 ml dung dịch A;
- 1 ml từng dung dịch từ B đến D.

Cho thêm nước (6.1) đến 1 000 ml.

6.2.2 Môi trường thử tối ưu

Môi trường thử này được tạo đậm cao và chứa nhiều chất dinh dưỡng vô cơ hơn. Cần phải giữ pH không thay đổi trong hệ thống trong suốt quá trình thử ngay cả khi nồng độ của vật liệu thử cao. Môi trường này chứa khoảng 2400 mg/l photpho và 50 mg/l nitơ và vì thế rất thích hợp với vật liệu thử có nồng độ cao, có thể lên đến 2000 mg/l cacbon hữu cơ. Nếu sử dụng vật liệu thử có nồng độ cao hơn thì tăng hàm lượng nitơ lên để giữ được tỉ lệ C:N khoảng 40:1.

6.2.2.1 Dung dịch A

Hòa tan

Kali dihydro photphat khan (KH_2PO_4)	37,5 g
Dinatri hydro photphat dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	87,3 g
Amoni clorua (NH_4Cl)	2,0 g

trong nước (6.1) và cho thêm nước đến 1 000 ml.

6.2.2.2 Dung dịch B

Hòa tan 22,5 g magie sunphat heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) trong nước (6.1) và thêm nước đến 1 000 ml.

6.2.2.3 Dung dịch C

Hòa tan 36,4 g canxi clorua dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) trong nước (6.1) và thêm nước đến 1 000 ml.

6.2.2.4 Dung dịch D

Hòa tan 0,25 g sắt (III) clorua hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) trong nước (6.1) và thêm nước đến 1 000 ml.

6.2.2.5 Dung dịch E (dung dịch vết nguyên tố, tùy chọn)

Hòa tan trong 10 ml dung dịch nước HCl (25 %, 7,7 mol/l) theo thứ tự sau:

70 mg ZnCl_2 , 100 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 mg H_3BO_3 , 190 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 240 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 36 mg $\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 33 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 26 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

và cho thêm nước đến 1000 ml (6.1).

6.2.2.6 Dung dịch F (dung dịch vitamin, tùy chọn)

Hòa tan vào 100 ml nước (6.1) 0,6 mg biotin, 2,0 mg niacinamin, 2,0 mg *p*-aminobenzoat, 1,0 mg axit pantotenic, 10,0 mg pyridoxal hydroclorua, 5,0 mg cyanocobalamin, 2,0 mg axit folic, 5,0 mg riboflavin, 5,0 mg DL-thioctic axit và 1,0 mg thiamine dichlorid hoặc sử dụng dung dịch 15 mg chất chiết men trong 100 ml nước (6.1). Lọc dung dịch này qua thiết bị lọc màng để khử trùng (xem 7.4).

CHÚ THÍCH Dung dịch E và F là tùy chọn và không yêu cầu nếu sử dụng nồng độ vật liệu cấy vừa đủ, ví dụ như bùn hoạt hóa, đất hoặc compost. Nên chuẩn bị các phần 1 ml và bảo quản lạnh cho đến khi sử dụng.

6.2.2.7 Chuẩn bị

Để chuẩn bị 1 lít môi trường thử thêm vào khoảng 800 ml nước (6.1)

- 100 ml dung dịch A;
- 1 ml mỗi dung dịch từ B đến D, tùy chọn E và F.

Cho thêm nước (6.1) đến 1000 ml và đo pH.

CHÚ THÍCH Có thể kiểm tra thành phần chính xác của dung dịch bằng cách đo pH, giá trị phải bằng $7,0 \pm 0,2$.

6.3 Dung dịch pyrophotphat

Hòa tan 2,66 g natri pyrophotphat khan ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) trong nước (6.1) và cho thêm nước đến 1 000 ml.

6.4 Chất hấp thụ cacbon dioxit, các hạt xút hoặc chất hấp thụ khác thích hợp.**7 Thiết bị, dụng cụ**

Tất cả các thiết bị thử phải sạch và đặc biệt không có vật liệu vô cơ và độc tố.

Sử dụng các thiết bị thí nghiệm thông thường và các thiết bị, dụng cụ sau:

7.1 Hồ hấp kín, gồm các bình thử (bình thủy tinh) có lắp các cánh khuấy và tất cả các thiết bị cần thiết khác, được đặt trong một phòng kín có nhiệt độ không đổi hoặc trong một thiết bị, dụng cụ ổn nhiệt (như bể cách thủy). Ví dụ xem tại Phụ lục C.

TCVN 11318:2016

CHÚ THÍCH Bất kỳ máy đo hô hấp nào có khả năng xác định nhu cầu oxy sinh hóa với độ chính xác thích hợp đều phù hợp, ưu tiên các thiết bị tự động đo và bổ sung oxy đã tiêu tốn, do đó sẽ không làm thiếu hụt oxy và không xảy ra ức chế hoạt động của vi sinh vật trong suốt quá trình phân hủy. Thay vì sử dụng một máy đo hô hấp thông thường có thể sử dụng loại chai kín hai pha (xem Phụ lục D).

7.2 Thiết bị phân tích xác định cacbon hữu cơ tổng số (TOC) và cacbon hữu cơ hòa tan (DOC)
[xem TCVN 6634 (ISO 8245)]

7.3 Thiết bị phân tích xác định nồng độ nitrat và nitrit

CHÚ THÍCH Nên tiến hành phép thử định tính trước để quyết định nếu có xảy ra quá trình nitrat hóa. Nếu có bằng chứng của nitrat/nitrit trong môi trường thì cần phải xác định định lượng bằng phương pháp thích hợp (ví dụ sắc ký ion).

7.4 Thiết bị ly tâm hoặc thiết bị có màng lọc (cỡ lỗ 0,45 µm) không hấp phụ hoặc giải phóng cacbon hữu cơ.

7.5 Cân phân tích (loại sử dụng trong phòng thí nghiệm).

7.6 Thiết bị đo pH (loại sử dụng trong phòng thí nghiệm)

8 Cách tiến hành

8.1 Vật liệu thử

Vật liệu thử phải là vật liệu có khối lượng đã biết và chứa lượng cacbon đủ để tạo một lượng BOD mà có thể được xác định chính xác bằng máy đo hô hấp sử dụng. Tính lượng ThOD theo công thức hóa học hoặc xác định bằng kỹ thuật phân tích nguyên tố (xem Phụ lục A) và tính lượng TOC [theo TCVN 6634 (ISO 8245)]. Sử dụng nồng độ vật liệu thử ít nhất là 100 mg/l, tương đương với lượng ThOD khoảng 170 mg/l hoặc lượng TOC khoảng 60 mg/l. Chỉ sử dụng nồng độ thấp hơn khi máy đo hô hấp có độ nhạy phù hợp. Lượng vật liệu thử tối đa bị giới hạn bởi lượng oxy cung cấp cho máy đo hô hấp và môi trường thử được sử dụng. Khi sử dụng môi trường thử tối ưu (6.2.2), nồng độ của vật liệu thử phải ở mức sao cho lượng TOC không vượt quá 2000 mg/l, nghĩa là tỉ lệ C:N khoảng 40:1. Nếu sử dụng nồng độ cao hơn thì phải tăng lượng nito trong môi trường thử.

CHÚ THÍCH 1 Nếu mô phỏng quá trình phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên thì nên sử dụng môi trường tiêu chuẩn và nồng độ vật liệu thử là 100 mg/l.

CHÚ THÍCH 2 Nên ưu tiên sử dụng vật liệu thử ở dạng bột nhưng cũng có thể sử dụng vật liệu dạng màng, mảnh nhỏ hay các hạt định hình. Kích thước và hình dạng của vật liệu thử có thể ảnh hưởng đến khả năng phân hủy sinh học của chúng. Nếu để so sánh các loại vật liệu chất dẻo khác nhau thì nên sử dụng các vật liệu có hình dạng tương tự nhau. Nếu vật liệu thử có dạng bột thì phải sử dụng các hạt nhỏ đã biết trước sự phân bố kích thước và nên sử dụng phân bố kích thước hạt với đường kính tối đa là 250 µm. Tương tự như vậy, kích thước của thiết bị sử dụng cũng phụ thuộc vào thể loại vật liệu thử. Phải đảm bảo chắc chắn rằng không có các thay đổi cơ học không mong muốn xảy ra do các điều kiện của phép thử, ví dụ như là cơ cấu khuấy. Việc gia công, chế biến vật liệu thử không có ảnh hưởng đáng kể đến sự phân hủy của vật liệu (ví dụ trong trường hợp sử dụng vật

liệu dạng bột đối với các hỗn hợp). Có thể xác định hàm lượng hydro, oxy, nitơ, photpho và lưu huỳnh cũng như khối lượng phân tử của vật liệu thử bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu gel (ví dụ xem ASTM D 3536-91^[11]) hoặc tiêu chuẩn khác thích hợp. Ưu tiên thử nghiệm vật liệu chất dẻo không có phụ gia như chất hóa dẻo. Khi vật liệu chứa các chất phụ gia như vậy thì cần phải có thông tin về khả năng phân hủy sinh học của các chất phụ gia để có thể đánh giá được khả năng phân hủy sinh học của chính vật liệu polyme đó.

Để biết thêm thông tin chi tiết về cách xử lý đối với các hợp chất ít tan trong nước, xem TCVN 6918 (ISO 10634).

8.2 Vật liệu đối chứng

Sử dụng anilin và/hoặc polyme có khả năng phân hủy sinh học tốt làm vật liệu đối chứng [ví dụ bột cellulose vi tinh thể, giấy lọc xenlulo không tàn hoặc poly (β -hydroxybutyrat)]. Nếu có thể, thể loại và kích thước, lượng TOC của vật liệu đối chứng phải có khả năng so sánh được với hình dạng và kích thước và lượng TOC của vật liệu thử.

Có thể sử dụng polyme không phân hủy sinh học (ví dụ polyetylen) có cùng thể loại với vật liệu thử làm vật liệu đối chứng âm.

8.3 Chuẩn bị vật liệu cấy

Bùn hoạt hóa từ các trạm xử lý nước thải, xử lý chủ yếu nước thải sinh hoạt là nguồn phù hợp để cung cấp vật liệu cấy. Bùn này được lấy từ môi trường hiếu khí hoạt động và có sẵn ở khắp một vùng diện tích địa lý rộng lớn, trong đó nhiều loại vật liệu chất dẻo cần được thử nghiệm. Ngoài ra, có thể sử dụng đất và/hoặc huyền phù compost cho quá trình cấy vì với một số loại vật liệu chất dẻo thì hoạt động của nấm đóng vai trò quan trọng đối với quá trình phân hủy sinh học. Khi xác định được quá trình phân hủy sinh học trong một hệ thống xử lý chất thải cụ thể thì lấy vật liệu cấy từ môi trường đó.

Vật liệu cấy này có thể được chuẩn bị từ các nguồn mô tả trong 8.3.1 và 8.3.2 hoặc từ một hỗn hợp của các nguồn này để thu được một quần thể vi sinh vật đa dạng và đồng đều, đủ để tác động đến quá trình phân hủy sinh học. Nếu quá trình hô hấp nội sinh của vật liệu cấy quá lớn thì phải ổn định vật liệu cấy bằng cách làm thoáng khí trước khi sử dụng. Hài hòa nhiệt độ thử với vật liệu cấy được sử dụng (xem chú thích Điều 5).

CHÚ THÍCH Việc xác định đơn vị cụm khuẩn (cfu) của vật liệu cấy sử dụng có thể sẽ hữu ích. Hỗn hợp thử nên chứa khoảng từ 10^3 đến 10^6 cfu/ml.

8.3.1 Vật liệu cấy lấy từ trạm xử lý nước thải

Lấy một mẫu bùn hoạt hóa được thu thập từ trạm xử lý nước thải đã được vận hành hoặc khu thí nghiệm xử lý nước thải sinh hoạt. Trộn đều và giữ mẫu dưới các điều kiện hiếu khí và tốt nhất là sử dụng ngay trong ngày (tối thiểu trong 72 h).

Trước khi sử dụng, xác định nồng độ của các chất rắn lơ lửng (ví dụ theo ISO 11923^[5]). Nếu cần thiết, cô đặc bùn này bằng cách để lắng sao cho thể tích của bùn được thêm vào cho phép thử là nhỏ nhất.

TCVN 11318:2016

Thêm một lượng phù hợp để thu được hàm lượng chất rắn lơ lửng trong hỗn hợp cuối từ 30 mg/l đến 1000 mg/l.

CHÚ THÍCH 1 Khi quá trình phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên được mô phỏng hoặc khi tiến hành xác định cân bằng cacbon (xem Phụ lục E) thì nên sử dụng vật liệu cây có hàm lượng chất rắn lơ lửng là 30 mg/l. Vì các chất rắn có thể cản trở việc xác định cân bằng cacbon nên phải tuân theo quy trình chuẩn bị vật liệu cây như sau. Lấy 500 ml bùn hoạt hóa và làm đồng nhất trong 2 min với tốc độ trung bình trong một bình trộn hoặc máy trộn phù hợp tốc độ cao. Để hỗn hợp lắng cho đến khi chất lỏng nổi phía trên chứa một lượng không đáng kể các chất lơ lửng nhưng không được lâu hơn 30 min. Gạn lượng chất lỏng nổi phía trên và cho vào bình thử để có được nồng độ là 1 % (V/V) đến 5 % (V/V) trong môi trường thử. Tránh gạn cả các hạt bùn.

CHÚ THÍCH 2 Vật liệu cây để có thể được làm thích nghi trước nhưng không sử dụng vật liệu cây đã được phơi nhiễm trước, nhất là trong trường hợp phép thử mô phỏng đặc tính phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên. Tùy vào mục đích của phép thử, có thể sử dụng vật liệu cây được phơi nhiễm trước miễn là trong báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ điều này (ví dụ phần trăm phân hủy sinh học = x %, sử dụng vật liệu cây được phơi nhiễm trước) và phương pháp phơi nhiễm trước cũng phải được nêu chi tiết trong báo cáo thử nghiệm. Vật liệu cây được phơi nhiễm trước có thể lấy từ các phép thử phân hủy sinh học trong phòng thí nghiệm phù hợp (xem ISO/TR 15462) được thực hiện trong các điều kiện khác nhau hoặc từ các mẫu thử được lấy từ các địa điểm mà ở đó có các điều kiện môi trường tương đương (ví dụ khu vực bị ô nhiễm hoặc trạm xử lý chất thải công nghiệp).

8.3.2 Vật liệu cây lấy từ đất và/hoặc compost

Hòa 10 g đất màu mỡ hoặc compost lấy từ bãi compost xử lý chất thải hữu cơ trong 100 ml môi trường thử (6.2.1 hoặc 6.2.2) hoặc trong dung dịch pyrophosphat (6.3) mà thường được sử dụng trong lĩnh vực vi sinh vật đất. Để lắng dung dịch trong khoảng 30 min. Gạn và lọc chất lỏng nổi bên trên qua một phễu lọc thô và cho thêm vật liệu cây này vào các bình thử để đạt được nồng độ trong môi trường thử từ 1 % (V/V) đến 5 % (V/V). Nếu cần có thể sử dụng lượng vật liệu cây nhiều hơn nhưng điều này có thể dẫn đến những vấn đề trong việc hình thành cân bằng cacbon. Việc sử dụng compost có thể làm gia tăng số lượng nấm có trong bình thử và cải thiện quá trình phân hủy sinh học của vật liệu chất dẻo. Trong trường hợp này cần phải nêu rõ trạng thái compost được sử dụng trong báo cáo thử nghiệm (ví dụ compost đã ngấu, compost lấy từ pha nóng ở khoảng 50 °C).

Khi cần phải có nồng độ vật liệu cây cao hơn thì hòa lượng đất hoặc compost nhiều hơn vào trong môi trường thử và pha loãng đến nồng độ thích hợp cho quá trình ủ.

8.4 Thử

Chuẩn bị một số lượng các bình thử sao cho phép thử ít nhất phải có:

- Hai bình thử dùng để chứa vật liệu thử (ký hiệu F_T);
- Hai bình thử dùng để chứa mẫu trắng (ký hiệu F_B);
- Một bình thử dùng để kiểm tra hoạt tính của vật liệu cây sử dụng vật liệu đối chứng (ký hiệu F_C).

Và nếu có yêu cầu:

- d) Một bình thử dùng để kiểm tra khả năng phân hủy không sinh học hoặc sự thay đổi không sinh học trong vật liệu thử, ví dụ bằng phương pháp thủy phân (ký hiệu F_S). Dung dịch thử ở trong bình F_S phải được tiệt trùng, ví dụ như hấp bằng nồi hấp hoặc bổ sung thêm hợp chất vô cơ thích hợp để ngăn chặn hoạt tính của vi sinh vật. Ví dụ sử dụng 5 ml/l dung dịch có chứa 10 g/l thủy ngân (II) clorua ($HgCl_2$). Nếu có yêu cầu thì trong quá trình thử có thể bổ sung thêm cùng một lượng tương tự chất độc này.
- e) Một bình dùng làm đối chứng âm (ký hiệu F_N), sử dụng một polyme không phân hủy sinh học (ví dụ polyetylen) có cùng kích thước và hình dạng với vật liệu thử.
- f) Một bình dùng để kiểm tra tác động ức chế của vật liệu thử đến hoạt động của vi sinh vật (ký hiệu F_I). Đảm bảo rằng tỉ lệ giữa cacbon trong vật liệu thử và vật liệu đối chứng với nito trong môi trường ít nhất là C:N = 40:1. Bổ sung thêm nito nếu có yêu cầu.

Cho đủ lượng môi trường thử (6.2) và vật liệu cây (8.3) vào các bình thử theo như quy định tại Bảng 1.

Đo pH trong các bình thử và điều chỉnh đến giá trị 7 nếu cần thiết. Cho chất hấp thụ cacbon dioxide (6.4) vào ngăn chứa chất hấp thụ của máy đo hồ hấp (xem Phụ lục C). Thêm vật liệu thử (xem 8.1), vật liệu đối chứng và vật liệu đối chứng âm tính (xem 8.2) tương ứng vào trong các bình như quy định tại Bảng 1. Nếu tiến hành cân bằng cacbon (xem Phụ lục E) thì lấy một lượng biết trước môi trường thử đã cấy từ mỗi bình hoặc từ các bình riêng bổ sung để xác định DOC và sinh khối tại thời điểm bắt đầu và kết thúc của quá trình ủ. Lưu ý đến thể tích lấy ra khi điều chỉnh thể tích cuối cùng hoặc khi tính toán các kết quả thử.

Đặt các bình thử này vào trong môi trường có nhiệt độ không đổi (xem Điều 5) và để tất cả các bình đạt đến nhiệt độ mong muốn. Đậy kín các bình, đặt chúng vào trong hồ hấp kế, thực hiện các kết nối cần thiết và bắt đầu khuấy. Ghi lại các số đọc trên áp kế (nếu điều chỉnh bằng tay) và kiểm tra chắc chắn rằng thiết bị ghi lượng oxy tiêu tốn vẫn hoạt động tốt (đối với hồ hấp kế tự động). Ngoài ra có thể sử dụng bình kín hai pha như mô tả trong Phụ lục D.

Bảng 1 – Phân bố vật liệu thử và vật liệu đối chứng

Bình thử	Vật liệu thử	Vật liệu đối chứng	Vật liệu cây
F_T Mẫu thử	+	-	+
F_T Mẫu thử	+	-	+
F_B Mẫu trắng	-	-	+
F_B Mẫu trắng	-	-	+
F_C Kiểm tra vật liệu cây	-	+	+
F_S Kiểm tra sự phân hủy không sinh học (tùy chọn)	+	-	-
F_I Kiểm tra ức chế (tùy chọn)	+	+	+
F_N Kiểm tra âm tính (tùy chọn)	-	+	+

TCVN 11318:2016

Khi mức BOD không đổi được duy trì (đạt đến giai đoạn ổn định) và không có thêm sự phân hủy sinh học xảy ra thì phép thử coi như đã hoàn thành. Thời gian tối đa là 6 tháng. Trong trường hợp thời gian thử dài thì phải lưu ý đặc biệt đến hệ thống thiết bị (ví dụ độ kín khít của bình thử và hệ thống kết nối).

Tại thời điểm kết thúc phép thử, đo pH và xác định ngay lập tức nồng độ nitrat và nitrit trong các bình thử F_T (xem chú thích) hoặc lấy một lượng mẫu đã được bảo quản thích hợp. Sử dụng các giá trị này để hiệu chỉnh mức độ phân hủy sinh học tính toán đối với quá trình nitrat hóa (xem Phụ lục B).

CHÚ THÍCH Allylthiourea có thể chỉ ức chế quá trình nitrat hóa trong thời gian ngắn khi phân hủy sinh học. Do vậy bổ sung allylthiourea để ngăn chặn quá trình nitrat hóa không được khuyến nghị. Tuy nhiên, kinh nghiệm chỉ ra rằng với nồng độ vật liệu cấy thấp [khoảng 1 % (VM)] thì quá trình nitrat hóa sẽ không xảy ra cho dù thời gian ủ có kéo dài, khi đó không cần sử dụng chất ức chế.

9 Tính toán và biểu thị kết quả

9.1 Tính toán

Đọc giá trị lượng oxy tiêu tốn trong mỗi bình thử bằng phương pháp do nhà sản xuất đưa ra tùy theo loại máy đo hô hấp được sử dụng. Tính nhu cầu oxy sinh hóa (BOD_s) của vật liệu thử, là chênh lệch giữa lượng oxy tiêu tốn trong bình chứa vật liệu thử F_T và bình chứa mẫu trắng F_B chia cho nồng độ của vật liệu thử, theo công thức (1):

$$BOD_s = \frac{BOD_t - BOD_{Bt}}{\rho_{TC}} \quad (1)$$

Trong đó

BOD_s là lượng BOD cụ thể của vật liệu thử, tính bằng miligam trên gam vật liệu thử;

BOD_t là lượng BOD trong bình thử chứa vật liệu thử F_T vào thời điểm t , tính bằng miligam trên lít;

BOD_{Bt} là lượng BOD trong bình thử chứa mẫu trắng F_B vào thời điểm t , tính bằng miligam trên lít;

ρ_{TC} là nồng độ vật liệu thử trong hỗn hợp phản ứng của bình thử F_T , tính bằng gam trên lít.

Tính phần trăm phân hủy sinh học D_t là tỷ lệ giữa lượng cầu oxy sinh hóa cụ thể với lượng cầu oxy theo lý thuyết (ThOD, tính bằng miligam trên gam vật liệu thử) theo công thức (2):

$$D_t = \frac{BOD_t}{ThOD} \times 100 \quad (2)$$

Tương tự như trên, tính lượng BOD và phần trăm phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng F_C và nếu có, của bình thử kiểm tra sự phân hủy không sinh học F_S và bình thử kiểm tra ức chế F_I và bình kiểm tra âm tính F_N .

CHÚ THÍCH Để tính toán ThOD, xem Phụ lục A. Nếu nồng độ chính xác của nitrit và nitrat được xác định thì phải lưu ý đến nhu cầu oxy của quá trình nitrat hóa (xem Phụ lục B). Nếu tính cân bằng cacbon thì xem thông tin nêu trong Phụ lục E.

9.2 Biểu thị và giải thích kết quả

Lập bảng các giá trị BOD đo được và giá trị phần trăm phân hủy sinh học tương ứng với từng thời điểm đo và của mỗi bình thử. Đối với mỗi bình thử, vẽ đồ thị đường cong của lượng BOD và đường cong phần trăm phân hủy sinh học theo thời gian. Nếu thu được các kết quả có thể so sánh đối với hai bình thử tiến hành đồng thời thì có thể vẽ đường cong trung bình.

Mức phân hủy sinh học tối đa được xác định là giá trị trung bình của giai đoạn ổn định trên đường cong phân hủy sinh học hoặc giá trị cao nhất, ví dụ khi đường cong đi xuống hoặc đi lên chậm trong giai đoạn ổn định, mô tả mức độ phân hủy sinh học của vật liệu thử. Nếu cân bằng cacbon đã được xác định thì kết quả của xác định này mô tả tổng mức độ phân hủy sinh học.

Khả năng thấm ướt và hình dạng của các miếng vật liệu thử có thể ảnh hưởng đến kết quả và phải tính đến điều này khi so sánh các kết quả thu được từ các vật liệu chất dẻo có cấu trúc hóa học giống nhau.

Thông tin về độc tính của vật liệu thử có thể sẽ hữu ích trong việc giải thích các kết quả thử chỉ ra khả năng phân hủy sinh học thấp.

10 Độ tin cậy của kết quả

Phép thử được coi là có tin cậy nếu

- Mức độ phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng (bình kiểm tra vật liệu cấy F_c) lớn hơn 60 % tại thời điểm kết thúc phép thử;
- Giá trị BOD của bình chứa mẫu trắng F_b tại thời điểm kết thúc phép thử không vượt quá giá trị giới hạn trên thu được theo kinh nghiệm (giá trị này phụ thuộc lượng vật liệu cấy, ví dụ các thử nghiệm-liên phòng đã chỉ ra rằng trong trường hợp có 30 mg/l vật liệu khô thì giá trị này khoảng 60 mg/l).

Nếu trong bình F_1 (kiểm tra ức chế, nếu có) phần trăm phân hủy sinh học < 25 % và không quan sát được rõ sự phân hủy của vật liệu thử thì có thể coi như vật liệu thử gây ức chế.

Nếu trong bình F_8 (kiểm tra phân hủy không sinh học, nếu có) quan sát được rõ lượng BOD (> 10 %) thì quá trình phân hủy không sinh học có thể đã xảy ra.

Nếu có bình F_N (kiểm tra âm tính) thì sẽ không quan sát có BOD.

Nếu các tiêu chí này không đạt được thì lập lại phép thử bằng cách sử dụng lượng vật liệu cấy được làm thích nghi trước hoặc được cho tiếp xúc trước.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) tất cả thông tin cần thiết để nhận biết vật liệu thử và vật liệu đối chứng, gồm TOC, ThOD, thành phần và công thức hóa học (nếu biết), hình dạng, thể loại và hàm lượng/nồng độ trong các mẫu thử;
- c) các thông số thử chính, gồm thể tích thử, môi trường thử sử dụng, nhiệt độ ủ và pH cuối;
- d) nguồn và lượng vật liệu cấy sử dụng, bao gồm chi tiết của việc phơi nhiễm trước và trạng thái của compost sử dụng;
- e) kỹ thuật phân tích được sử dụng gồm nguyên tắc của máy đo hô hấp và phương pháp xác định TOC và nitrat/nitrit;
- f) tất cả các kết quả thử thu được đối với vật liệu thử và vật liệu đối chứng (dạng bảng biểu và đồ thị) bao gồm lượng BOD đo được, các giá trị phần trăm phân hủy sinh học và đồ thị của các thông số này theo thời gian và nồng độ nitrat/nitrit;
- g) khoảng thời gian của giai đoạn thích ứng và giai đoạn phân hủy sinh học, mức phân hủy sinh học tối đa cũng như tổng thời gian thử;

và các thông tin tùy chọn sau, nếu có thực hiện hoặc xác định:

- h) kết quả quá trình kiểm tra sự phân hủy không sinh học F_s , kiểm tra ức chế F_i và kiểm tra âm tính F_N ;
- i) kết quả việc xác định cân bằng cacbon, bao gồm như:
 - 1) lượng cacbon trong vật liệu thử bị oxy hóa thành cacbon dioxit, được ước lượng từ mức độ phân hủy sinh học dựa trên BOD,
 - 2) lượng tăng DOC trong môi trường thử trong quá trình ủ gây ra bởi các chất có thể hòa tan trong nước,
 - 3) lượng tăng cacbon hữu cơ trong sinh khối trong quá trình thử,
 - 4) hàng lượng cacbon trong polyme tồn dư tại thời điểm kết thúc phép thử,
 - 5) tổng số lượng cacbon đo được, biểu thị bằng phần trăm cacbon được đưa vào thông qua vật liệu thử;
- j) đơn vị cụm khuẩn (cfu/g) có trong hỗn hợp thử được cấy;
- k) bất kỳ dữ liệu nào có liên quan (ví dụ khối lượng phân tử ban đầu của mẫu thử, khối lượng phân tử của polyme tồn dư);

Phụ lục A

(tham khảo)

Nhu cầu oxy theo lý thuyết (ThOD)

A.1 Tính lượng ThOD

Nhu cầu oxy theo lý thuyết (ThOD) của một chất $C_cH_hCl_{cl}N_nS_sP_pNa_{na}O_o$ có khối lượng phân tử tương đối M_r có thể tính được nếu như biết cấu tạo nguyên tử hoặc có thể xác định bằng cách phân tích nguyên tố, sử dụng công thức sau:

$$ThOD = \frac{16[2c + 0,5(h - cl - 3n) + 3s + 2,5p + 0,5na - o]}{M_r}$$

Cách tính này giả định rằng carbon được chuyển hóa thành CO_2 , hydro thành H_2O , photpho thành P_2O_5 lưu huỳnh thành trạng thái oxy hóa +6 và halogen sinh ra dưới dạng hợp chất hydro. Sự oxy hóa N, P và S phải được kiểm tra bằng các phép phân tích. Việc tính toán cũng giả định rằng lượng nitơ giải phóng dưới dạng ammoni.

Biểu thị ThOD bằng miligam trên gam chất hoặc bằng miligam trên miligam chất.

A.2 Ví dụ: Poly (axit β -hydroxybutyric) (PHB)

Công thức rút gọn¹⁾: $C_4H_6O_2$, c= 4, h = 6, o = 2; khối lượng phân tử $M_r = 86$:

$$ThOD = \frac{16[2 \times 4 + 0,5 \times 6 - 2]}{86}$$

$$ThOD = 1,6744 \text{ mg/mg PHB} = 1674,4 \text{ mg/g PHB}$$

A.3 Ví dụ : Hỗn hợp polyetylen/ tinh bột/ glyxerin

Thành phần	Công thức	ThOD mg/g	Lượng các thành phần		ThOD mg/bình
			%	mg/bình	
Polyetylen	$(C_2H_4)_n$	3 400	50	500	1 700
Tinh bột	$(C_6H_{10}O_5)_n$	1 190	40	400	476
Glyxerin	$C_3H_8O_3$	1 200	10	100	120
Tổng cộng			100	1 000	2 296

¹⁾ PHB là polyme của monome β -hydroxybutyrat. Khi polyme hóa (tạo thành este) nước bị loại bỏ, do đó công thức phân tử tổng quát của PHB tương đương với monome trừ đi một H_2O , đã bị khử trong phản ứng hóa học.

Phụ lục B

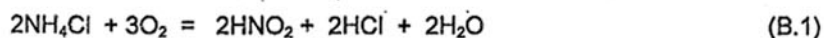
(tham khảo)

Hiệu chỉnh giá trị BOD đối với ảnh hưởng của quá trình nitrat hóa

B.1 Ảnh hưởng của quá trình nitrat hóa

Giá trị BOD có thể bị ảnh hưởng bởi quá trình nitrat hóa. Giá trị này phải được hiệu chỉnh nếu các sai sót nghiêm trọng có thể tránh được trong quá trình tính toán mức độ phân hủy sinh học dựa trên sự oxy hóa của cacbon có trong một vật liệu thử chứa nitơ. Các sai lỗi trong trường hợp đối với các chất không chứa nitơ thường không đáng kể vì quá trình oxy hóa amoni trong môi trường này được xem xét đến bằng cách trừ đi trong mẫu trắng.

Muối amoni và các hợp chất thử có chứa nitơ có thể bị oxy hóa thành nitrat hoặc nitrit trong quá trình ủ của phép thử phân hủy sinh học. Vì các phản ứng này xảy ra tuần tự (dưới tác động bởi các chủng vi khuẩn khác nhau) nên nồng độ của nitrit có thể tăng hoặc giảm. Trong trường hợp giảm thì một nồng độ nitrat cân bằng sẽ được tạo thành. Các phản ứng hóa học lần lượt từ (B.1) đến (B.3) như sau:



Tổng thể:



Từ các phương trình này có thể kết luận rằng

- đối với quá trình oxy hóa 2 phân tử (28 g) nitơ amoni (thêm bởi NH_4Cl vào môi trường vô cơ) thành nitrit, thì cần phải có 3 phân tử (96 g) oxy (BOD_{NO_2}), kết quả là cần 3,43 (96/28) mg oxy cho một mg nitơ;
- đối với quá trình oxy hóa 2 phân tử (28 g) nitơ amoni thành nitrat thì cần phải có 4 phân tử (128 g) oxy (BOD_{NO_3}), kết quả là cần 4,57 (128/28) mg oxy cho một mg nitơ.

Mức độ của quá trình nitrat hóa có thể xác định được bằng cách đo nồng độ nitrat và nitrit tạo thành tại thời điểm kết thúc phép thử trong môi trường thử của bình thử F_T . Nên xác định định tính trước để xem liệu quá trình nitrat hóa có xảy ra hay không. Nếu có mặt của nitrat hoặc nitrit thì mới cần xác định định lượng.

Lượng BOD thu được từ quá trình oxy hóa nitơ tại thời điểm kết thúc phép thử, BOD_N được tính bằng miligam trên lít, theo công thức (B.4):

$$\text{BOD}_N = (\rho_{\text{NO}_3} \times 4,57) + (\rho_{\text{NO}_2} \times 3,43) \quad (\text{B.4})$$

Trong đó

ρ_{NO_3} là nồng độ của nitơ nitrat đo được có trong bình F_T tại thời điểm kết thúc phép thử, tính bằng miligam trên lít;

ρ_{NO_2} là nồng độ của nitơ nitrit đo được có trong bình F_T tại thời điểm kết thúc phép thử, tính bằng miligam trên lít;

4,57 là hệ số thể hiện nhu cầu oxy đối với quá trình tạo thành nitrat;

3,43 là hệ số thể hiện nhu cầu oxy đối với quá trình tạo thành nitrit.

Lượng BOD thu được từ quá trình oxy hóa cacbon tại thời điểm kết thúc phép thử, BOD_C được tính bằng miligam trên lít, theo công thức (B.5):

$$BOD_C = BOD_G - BOD_N - BOD_{Bt} \quad (B.5)$$

Trong đó

BOD_G là lượng BOD đo được của bình F_T tại thời điểm kết thúc phép thử, tính bằng miligam trên lít;

BOD_{Bt} là lượng BOD của bình chứa mẫu trắng tại thời điểm kết thúc phép thử, tính bằng miligam trên lít.

BOD_C tương đương với BOD_t và được sử dụng để tính lượng BOD_S và D_t [xem công thức (1) và (2) trong 9.1].

B.2 Ví dụ

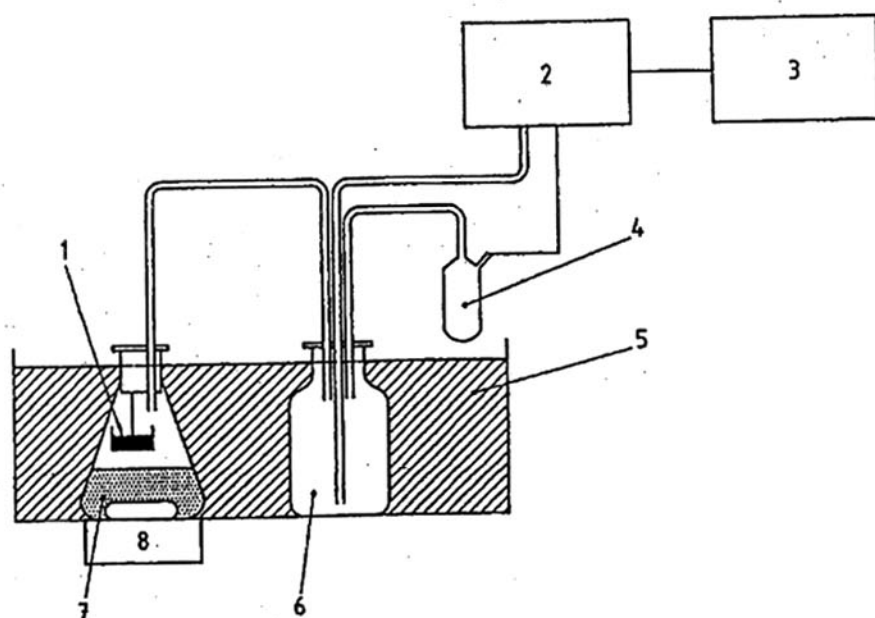
Thử với chất p-aminobenzoic axit 2 ethylhexyl este ở nồng độ 10 mg/l trong bình F_T

ThOD	239 mg/l
BOD_t đo được tại thời điểm kết thúc phép thử	199 mg/l
BOD_{Bt} đo được trong mẫu trắng	8 mg/l
D_t không hiệu chỉnh bởi quá trình nitrat hóa	80 %
Nitrat tại thời điểm kết thúc phép thử 15 mg/l	$\rho_{NO_3} = 3,5$ mg/l
Nitrit tại thời điểm kết thúc phép thử 1 mg/l	$\rho_{NO_2} = 0,3$ mg/l
BOD_N tại thời điểm kết thúc phép thử	17 mg/l
BOD_C	174 mg/l
D_t được hiệu chỉnh bởi quá trình nitơ hóa	73 %

Phụ lục C
(tham khảo)

Nguyên tắc hoạt động của một máy đo hô hấp kín

Máy đo hô hấp được cài đặt trong một môi trường có kiểm soát nhiệt độ (ví dụ bể cách thủy) bao gồm các bình thử nghiệm, mỗi bình có một thanh khuấy từ và một cốc chứa ở khoảng không bên trên có chất hấp thụ CO_2 , một thiết bị sản xuất oxy theo phương pháp điện phân, máy khuấy từ cho từng bình và một thiết bị kiểm tra và thiết bị ghi để bên ngoài (máy in, thiết bị vẽ đồ thị hoặc máy tính). Đồ hỗn hợp thử vào một phần ba thể tích của bình thử nghiệm. Khuấy liên tục để đảm bảo một cân bằng oxy giữa pha lỏng và pha khí. Nếu quá trình phân hủy sinh học xảy ra, các vi sinh vật tiêu tốn oxy và sản sinh ra cacbon đioxit và cacbon đioxit bị hấp thụ hoàn toàn. Tổng áp suất trong các bình giảm xuống. Khi áp suất giảm thì quá trình điện phân oxy được khởi động lại. Sau đó, khi áp suất ban đầu được thiết lập lại thì quá trình điện phân dừng và lượng điện sử dụng tương ứng với lượng oxy bị tiêu tốn được đo liên tục và được dùng để xác định lượng oxy tiêu tốn, biểu thị theo mg/l BOD trên thiết bị ghi.



CHÚ DẪN

- | | | | |
|---|--|---|-----------------------|
| 1 | Chất hấp thụ CO_2 | 5 | Bể cách thủy |
| 2 | Hộp điều khiển | 6 | Thiết bị sản xuất oxy |
| 3 | Máy in, thiết bị vẽ đồ thị hoặc máy tính | 7 | Bình thử |
| 4 | Áp kế | 8 | Thiết bị khuấy |

Hình C.1 – Giản đồ của một hô hấp kín

Phụ lục D

(tham khảo)

Bình kín hai pha sử dụng cho phép thử hô hấp

D.1 Nguyên tắc

Thiết bị này có thể được sử dụng là thiết bị thay thế khi không có máy đo hô hấp. Môi trường đã cấy và vật liệu thử cùng vật liệu đối chứng được lắc hoặc khuấy ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C trong các bình kín có chứa một lượng đã biết môi trường thử dạng lỏng và không khí để đảm bảo sự phân chia oxy ổn định giữa pha lỏng và pha khí. Quá trình phân hủy sinh học sau đó được đo bằng cách đo đều đặn nồng độ oxy hòa tan trong pha khí. Lượng oxy tổng cộng tăng lên trong các bình thử được tính bằng sự chênh lệch giữa nồng độ oxy đã tiêu tốn đo được trong bình trống và bình thử, chia cho giá trị bão hòa oxy dưới các điều kiện thông thường rồi nhân với nồng độ oxy tổng cộng ban đầu có trong pha lỏng và pha khí. Khả năng phân hủy sinh học được tính là lượng oxy tổng cộng thu được chia cho lượng cầu oxy theo lý thuyết (ThOD) và được biểu thị bằng phần trăm.

D.2 Thiết bị, dụng cụ đặc biệt

D.2.1 Chai ủ: các chai kín khí, ví dụ như bình phản ứng cổ hẹp với dung tích từ 200 ml đến 300 ml và có nắp đậy phù hợp (ví dụ nắp thủy tinh nhám, nắp cao su butyl hoặc nắp vụn), miễn là ngăn được ánh sáng (ví dụ làm bằng thủy tinh màu nâu). Nên có các kẹp nắp đậy. Đánh dấu vào mỗi bình. Nếu không sử dụng các điện cực oxy có gắn thiết bị khuấy thì các bình nên lắp với máy khuấy từ có thanh khuấy được phủ PTFE. Có thể dùng các bình có dung tích tiêu chuẩn sao cho độ lệch chuẩn từ thể tích trung bình đối với một lô bình nhỏ hơn 1 ml hoặc có thể đo và ghi lại dung tích của các bình được đánh số riêng biệt, với độ chính xác đến 1 ml. Cần thận trọng vào nắp bình mở silicon trơn để có thể dễ dàng đậy và mở nắp bình.

D.2.2 Điện cực oxy, thường gắn một thiết bị khuấy có thể đo trong khoảng từ 0 mg/l đến 10 mg/l với độ chính xác 1 %. Sự ổn định có thể đạt được trong vòng 1, 5 min. Gắn điện cực, ví dụ trong một nắp trơn để vừa kín khít trong phần cổ bằng thủy tinh có mài nhám của bình ủ hoặc sử dụng kỹ thuật đo nồng độ oxy trong một nhánh vòng (circular bypass).

D.2.3 Máy khuấy từ hoặc máy lắc

D.3 Cách tiến hành

Chuẩn bị các chai ủ như mô tả trong 8.4, trong đó sử dụng ba chai cho mỗi loại F_T , F_B và F_C . Cho thanh khuấy vào mỗi chai nếu sử dụng máy khuấy thay cho máy lắc. Chuẩn bị môi trường thử phù hợp, ưu tiên môi trường chuẩn (6.2.1) để thực hiện phép thử hoàn thiện. Để đảm bảo việc cung cấp chất dinh

TCVN 11318:2016

dưỡng phù hợp thì tăng lượng amoni clorua trong dung dịch A (6.2.1.1) lên gấp ba lần nghĩa là 1,5 g/l. Cấy vào môi trường này theo 8.3, ưu tiên sử dụng bùn hoạt hóa có hàm lượng chất rắn lơ lửng 30 mg/l, trộn đều và cho thêm hỗn hợp vào các chai. Thêm một lượng bằng hai phần ba thể tích của chai (ví dụ 200 ml vào bình dung tích 300 ml). Đặt các chai vào thiết bị lắc hoặc khuấy chúng và ủ ở nhiệt độ từ 20°C đến 25°C trong một tuần. Trong thời gian này, vi khuẩn sẽ sử dụng các chất dự trữ của chúng và vật liệu cấy sẽ ổn định. Sau đó để thoát khí các chai dưới sự trợ giúp của khí nén bão hòa hơi nước và máy khuếch tán không khí trong khoảng 15 min. Đo nồng độ oxy ban đầu. Thêm vào các chai tương ứng vật liệu thử hoặc vật liệu đối chứng như mô tả trong 8.1 và 8.2. Nồng độ vật liệu thử tối đa trong phép thử này phải khoảng 150 mg/l ThOD tương đương với khoảng 90 mg/l TOC. Đậy kín các chai và tiếp tục quá trình ủ. Sau khi ủ một tuần, hoặc hơn thì kiểm tra nồng độ của oxy hòa tan trong từng chai. Giữ các chai ở nhiệt độ ủ quy định với sai số ($\pm 0,5$ °C) trong quá trình đo. Hiệu chuẩn độ chính xác của điện cực oxy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với các phép đo oxy, lấy lần lượt từ chai và lắc mạnh bằng tay trong 30 s. Đưa các chai vào máy khuấy nhưng không khuấy. Mở nắp chai và ngay lập tức đưa điện cực oxy vào trong cổ chai sao cho nắp của điện cực đậy kín chai và đầu điện cực nằm sâu bên dưới bề mặt chất lỏng. Bắt đầu khuấy ở tốc độ thích hợp cho phép đo oxy nhưng không được để tạo thành dòng xoáy. Sử dụng cùng một tốc độ khuấy trong các phép đo và hiệu chuẩn điện cực. Ghi lại giá trị oxy khi ổn định, thường mất thời gian khoảng 2 min. Chỉ sử dụng các bình có nồng độ oxy > 1,5 mg/l để tính toán kết quả thử. Ngoài ra, có thể sử dụng kỹ thuật khác phù hợp để đo nồng độ oxy trong pha lỏng, như sử dụng điện cực oxy ở nhánh vòng (circular bypass).

Sau đó đo pH trong mỗi bình và ghi lại giá trị. Nếu pH nhỏ hơn 6,0 thì điều chỉnh đến khoảng 7,5 với 0,1 mol/l đến 0,5 mol/l dung dịch natri hydroxit. Nếu pH lớn hơn 8,0 thì điều chỉnh đến khoảng 7,5 bằng 0,1 mol/l đến 0,5 mol/l axit clohydric. Sau cùng tiến hành thoát khí môi trường trong mỗi chai bằng một thiết bị khuếch tán không khí trong 15 min và đo nồng độ oxy một lần nữa như mô tả ở trên. Đậy lại nắp chai, đưa chai vào máy khuấy và tiếp tục ủ. Hiệu chỉnh giá trị BOD tại thời điểm kết thúc phép thử đối với quá trình nitrat hóa (xem 8.4 và phụ lục B).

D.4 Tính toán kết quả

Xác định lượng oxy tương đối thu được U_r đo được trong pha lỏng của từng chai, theo công thức (D.1)

$$U_r = \frac{C_{Bt} - C_t}{C_s} \quad (D.1)$$

Trong đó

C_{Bt} là giá trị trung bình của nồng độ oxy hòa tan trong các chai chứa mẫu trắng sau khi ủ tại thời điểm t, tính bằng miligam trên lít;

C_t là nồng độ oxy hòa tan, trong từng chai thử sau khi ủ, tại thời điểm t, tính bằng miligam trên lít;

C_s là giá trị bão hòa của oxy hòa tan, tính bằng miligam trên lít.

Sử dụng giá trị bão hòa C_s là một giá trị trung bình đo được sau mỗi lần thoáng khí hoặc thoáng khí lại các chai mẫu trắng và mẫu thử. Giá trị lý thuyết ở áp suất khí quyển tiêu chuẩn (1013 hPa) và 20 °C là 9,08 mg/l.

Xác định lượng oxy tổng O_c (mg/bình) của một chai từ hàm lượng oxy tối đa trong pha khí và hàm lượng oxy trong pha lỏng ở áp suất tiêu chuẩn và 20 °C theo công thức (D.2).

$$O_c = (0,28 \times V_g) + (0,009 \times V_l) \quad (D.2)$$

Trong đó

0,28 là nồng độ oxy của không khí thông thường, tính bằng miligam trên millilit;

V_g là thể tích khí trong chai ủ, tính bằng millilit;

0,009 là nồng độ oxy của nước bão hòa, tính bằng miligam trên millilit;

V_l là thể tích chất lỏng trong chai ủ, tính bằng millilit.

Thông thường, V_l không đổi trong một dãy các phép thử, trừ khi các mẫu phân tích được lấy ra, nhưng V_g có thể thay đổi tùy thuộc vào các bình thử được sử dụng. Nếu chênh lệch giữa các chai riêng biệt nhỏ thì có thể sử dụng giá trị O_c không đổi. Nếu chênh lệch này lớn (ví dụ > 2 ml đối với chai có thể tích 200 ml) thì giá trị O_c phải được tính toán đối với mỗi chai. Nếu V_l giảm do lượng mẫu bị lấy đi thì phải tăng V_g lên với tỷ lệ tương ứng.

Tính lượng oxy thu được BOD (mg/bình) từ công thức D.3

$$BOD = U_i \times O_c \quad (D.3)$$

Tính tổng lượng ΣBOD thu được (mg/bình) của tất cả các thời gian ủ (n) theo công thức D.4 để nhận được giá trị BOD tại thời điểm kết thúc phép thử

$$\Sigma BOD = BOD_1 + BOD_2 + \dots + BOD_n \quad (D.4)$$

Cuối cùng tính phần trăm phân hủy sinh học như mô tả trong 9.1

Sử dụng công thức phù hợp để xác định sự loại trừ không sinh học cũng như sự phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng và kiểm tra ức chế.

Phụ lục E

(tham khảo)

Ví dụ về việc xác định cân bằng cacbon**E.1 Nguyên tắc**

Vật liệu chất dẻo thường có thành phần phức tạp hơn so với các hợp chất phân tử thấp. Việc xác định riêng sự giải phóng CO₂ hoặc BOD thường là không đủ để xác định đặc tính và chất lượng của khả năng phân hủy sinh học. Trong quá trình phân hủy sinh học, sinh khối mới được hình thành bởi các vi sinh vật và một phần của cacbon có trong vật liệu thử được chuyển vào sinh khối nhưng không bị oxy hóa sinh học. Do vậy, các thông số phân tích như sự giải phóng CO₂ và BOD thường không đạt được đến 100 % giá trị lý thuyết mong muốn, mặc dù trong trường hợp này sự phân hủy sinh học của vật liệu thử là hoàn toàn và sự phân rã không đủ có thể bị suy luận không đúng từ các kết quả thử. Việc xác định cân bằng cacbon như mô tả trong phụ lục này có thể hữu ích trong các trường hợp xác nhận lại khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn. Vì một cân bằng dựa trên tổng lượng cacbon thu được từ các phép đo sau: lượng cacbon có trong cacbon dioxit, lượng cacbon được sinh ra dưới dạng sinh khối mới, lượng cacbon chuyển vào các chất chuyển hóa hữu cơ tan trong nước, lượng cacbon xác định dưới dạng DOC và lượng cacbon còn lại trong vật liệu polyme chưa được phân hủy. Tổng cacbon được so sánh với lượng cacbon hữu cơ trong vật liệu thử được đưa vào trong hệ thống thử.

E.2 Cách tiến hành

Xác định BOD sinh ra như mô tả trong 8.4.

Lấy các mẫu của môi trường đã cấy tại thời điểm bắt đầu, trước khi cho thêm vật liệu thử và tại thời điểm kết thúc quá trình ủ. Việc lấy mẫu phải được tiến hành cẩn thận để thu được các mẫu thử đại diện. Cho các mẫu qua một tấm lọc màng hoặc ly tâm chúng ở tốc độ khoảng 40 000 m.s⁻².

Với từng mẫu, xác định lượng sinh khối trong chất lọc ra hoặc ly tâm theo phương pháp phù hợp, ví dụ bằng phép đo protein. Xác định hoặc tính lượng cacbon trong sinh khối và tính toán sự chênh lệch này từ lượng tăng của cacbon hữu cơ trong sinh khối.

Xác định theo TCVN 6634 (ISO 8245), DOC trong chất lọc của từng mẫu và tính toán lượng tăng cacbon hữu cơ. Nếu có thể, nhận dạng hợp chất hình thành DOC để xác nhận lại sự hình thành của các chất chuyển hóa tan trong nước.

Sử dụng toàn bộ mỗi lượng mẫu còn lại để xác định lượng cacbon trong polyme cặn tại thời điểm kết thúc phép thử. Đây thường là quy trình khó khăn và có thể làm hoặc trực tiếp phân tích riêng polyme (xem phụ lục F) hoặc gián tiếp. Trong trường hợp trực tiếp, chiết và cân polyme cặn và tính lượng cacbon từ thành phần đã biết của polyme. Một phương pháp xác định gián tiếp là rửa, sấy khô, cân

phần cặn và xác định cacbon hữu cơ tổng (TOC). Sau đó trừ đi giá trị cacbon sinh khối (nêu trên) để thu được lượng cacbon có trong polyme cặn. Một cách khác là cân chính xác cặn và xử lý chúng bằng phương pháp thích hợp để phá hủy sinh khối nhưng không phá hủy các polyme (điều này phải được kiểm tra trước). Ví dụ như sử dụng natri hypoclorit, loại bỏ phần hòa tan và cân lại mẫu. Coi như tất cả sinh khối đã bị loại bỏ và tính toán từ khối lượng thu được hàm lượng cặn polyme.

E.3 Tính cân bằng cacbon

Tính lượng cacbon bị oxy hóa sinh học C_{BOD} (mg/l) trong vật liệu thử được đưa vào trong hệ thống thử (hàm lượng cacbon C_{MAT}) từ phần trăm phân hủy sinh học D_t thu được trong phép thử máy đo hô hấp (xem 9.1), theo công thức E.1:

$$C_{BOD} = \frac{C_{MAT} \times D_t}{100} \quad (E.1)$$

Tính toán lượng tăng của cacbon sinh khối trong các bình thử có chứa vật liệu thử C_{BIO} (mg/l) bằng cách so sánh sinh khối tại thời điểm bắt đầu với thời điểm kết thúc quá trình ủ, lưu ý đến lượng cacbon có trong sinh khối đo được hoặc ước lượng được $C_{B(bắt đầu)}$ và $C_{B(kết thúc)}$ theo công thức E.2

$$C_{BIO} = C_{B(kết\ thúc)} - C_{B(bắt\ đầu)} \quad (E.2)$$

Xác định lượng tăng DOC trong suốt quá trình ủ C_{DOC} (mg/l) bằng cách so sánh nồng độ DOC tại thời điểm bắt đầu với thời điểm kết thúc theo công thức E.3

$$C_{DOC} = DOC_{(kết\ thúc)} - DOC_{(bắt\ đầu)} \quad (E.3)$$

Xác định lượng cacbon hữu cơ trong các polyme cặn tại thời điểm kết thúc phép thử C_{POL}

Tính giá trị chênh lệch của các lượng cacbon chuyển hóa theo phần trăm của cacbon đưa vào C_{MAT} và cộng lại để thu được cacbon tính toán C_{CALC} (%) theo công thức E.4:

$$C_{CALC} = C_{BOD} + C_{BIO} + C_{DOC} + C_{POL} \quad (E.4)$$

E.4 Ví dụ: Cân bằng cacbon của poly(β -hydroxybutyrat)²⁾

Cho vật liệu thử: $C_{MAT} = 600 \text{ mg/l} = 334,8 \text{ mg/l cacbon}$

Mức độ phân hủy sinh học: $D_t = 78 \%$

	$C_{B(bắt\ đầu)}$	$C_{B(kết\ thúc)}$	C_{BIO}	$DOC_{(bắt\ đầu)}$	$DOC_{(kết\ thúc)}$	DOC	C_{BOD}
mg/l	3,2	61,0	57,8	2,0	22,0	20,0	261
% C_{MAT}			17,2			6,0	78

Tính cân bằng cacbon : $C_{CALC} = 78 \% + 17 \% + 6 \% = 101 \% C_{MAT}$

²⁾ Thu thập từ: Puchner (1994) (tài liệu tham khảo [9] trong phụ lục G).

Phụ lục F

(tham khảo)

Ví dụ xác định lượng và khối lượng phân tử của polyme không hòa tan trong nước còn lại khi kết thúc phép thử phân hủy sinh học

Sử dụng quy trình đo hàm lượng và khối lượng phân tử polyme còn lại khi kết thúc nghiên cứu có thể có hữu ích. Có thể sử dụng phương pháp sau đây hoặc phương pháp thích hợp khác để phân tích các polyme không hòa tan trong nước nhưng hòa tan trong dung môi hữu cơ không trộn lẫn được với nước.

- a) Cho hỗn hợp kiểm tra vào phễu chiết, thêm dung môi hữu cơ thích hợp và lắc trong 10 min đến 20 min để chiết các polyme còn lại. Tách lớp dung môi hữu cơ ra khỏi lớp dung dịch. Thêm dung môi mới và lặp lại quy trình.
- b) Trộn lẫn các phần hữu cơ chiết được ra và cho bay hơi dung môi đến khô. Hòa tan mẫu chất rắn trong một thể tích nước giải hấp thích hợp.
- c) Sử dụng một bơm tiêm vi lượng, tiêm một lượng thích hợp vào thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có một cột chứa gel sử dụng trong sắc ký khí thẩm thấu gel. Bắt đầu phân tích và ghi phổ.
- d) Xác định lượng polyme có mặt bằng cách sử dụng đường cong hiệu chuẩn.
- e) Xác định khối lượng phân tử polyme bằng cách bơm vào trong sắc phổ polyme cùng loại, hoặc polyme có cấu trúc tương tự polyme được thử mà đã biết khối lượng phân tử. Mối liên hệ giữa thời gian lưu và khối lượng phân tử thu được từ sắc phổ cuối cùng. Tính khối lượng phân tử từ mối liên hệ này.

Khối lượng phân tử của polyme thử cũng có thể xác định được bằng phương pháp HPLC với detector loại kết hợp giữa quét tia laser góc hẹp (LALLS) và chỉ số khúc xạ vi sai (RI).

Phụ lục G

(tham khảo)

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ASTM D 3536-91, *Molecular weight averages and molecular weight distribution by liquid exclusion chromatography (GEL permeation chromatography – GPC)*.
 - [2] ASTM D 5271-02, *Determining the aerobic biodegradation of plastic materials in an activated-sludge wastewater-treatment system*.
 - [3] ISO 8192:1986, *Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge*.
 - [4] ISO 10708:1997, *Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds – Determination of biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test*.
 - [5] ISO 11923, *Water quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters*.
 - [6] JIS K 6950:1994, *Plastics testing method for aerobic biodegradability by activated sludge*.
 - [7] KITANO, M., and YAKABE, Y., *Strategy for biodegradability testing in OECD*. Edited by Y.Doi and K.Fukuda, *Biodegradable plastics and polymers*, Elsevier, Amsterdam, pp.217-227.
 - [8] PÜCHNER, P., MUELLER, W.R., and BARDTKE, D. (1995), *-Assessing the äaeroben und anaeroben bedingungen*, Dissertation, Stuttgart University Fakultät für Bauingenieurwesen, *Stuttgarter Berichte zur Abfallwirtschaft*, 59, Erich Schmidt Verlag, Berlin.
 - [10] SAWADA, H. (1994), *Field testing of biodegradable plastics*, Edited by Y.Doi and K.Fukuda, *Biodegradable plastics and polymers*, Elsevier, Amsterdam, pp.298-312.
 - [11] SPERANDIO, A., and PÜCHNER, P. (1993), *Bestimmung der Gesamtproteine als Biomasse-Parameter in wäßrigen Kulturen und auf Trägermaterialien aus Bio-Reaktoren*, *gwf Wasser, Abwasser*, 134, pp.482-485.
-