

**DT TCVN/QTKT xxxx:2026
ISO 18451:2019**

Xuất bản lần 1

**CHẤT DẸO – XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN HỦY
SINH HỌC HIẾU KHÍ HOÀN TOÀN CỦA VẬT LIỆU
CHẤT DẸO TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC –
PHƯƠNG PHÁP ĐO NHU CẦU OXY TRONG
HÔ HẤP KẾ KÍN**

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

HÀ NỘI – 2026

Lời nói đầu

DT TCVN/QTKT xxxx:2026 hoàn toàn tương đương với ISO 14851:2019.

DT TCVN/QTKT xxxx:2026 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC61 *Chất dẻo* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Ủy ban Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng Quốc gia 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 xử lý chúng đã trở thành một vấn đề lớn. Ưu tiên hàng đầu là thúc đẩy việc thu hồi. Tuy nhiên, việc thu hồi hoàn toàn chất dẻo rất khó khăn. Ví dụ, rác chất dẻo, chủ yếu từ hàng hoá tiêu dùng, rất khó để thu hồi hoàn toàn. Các ví dụ khác về chất dẻo khó thu hồi là dụng cụ câu cá, hạt vi chất dẻo trong các sản phẩm chăm sóc cá nhân và các polyme tan được trong nước. Các vật liệu chất dẻo này có xu hướng bị rò rỉ ra khỏi các chu trình quản lý chất thải khép kín đi vào trong môi trường. Chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học hiện đang nổi lên như một trong những lựa chọn khả thi để giải quyết các vấn đề môi trường như vậy. Các vật liệu chất dẻo, chẳng hạn như sản phẩm hoặc bao gói, được đưa đến các khu xử lý tạo compost được kỳ vọng là có khả năng phân hủy sinh học. Do đó, điều rất quan trọng là phải xác định khả năng phân hủy sinh học của các vật liệu này và đưa ra được chỉ dẫn về khả năng phân hủy sinh học của chúng trong các môi trường tự nhiên.

Chất dẻo – Xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của vật liệu chất dẻo trong môi trường nước – Phương pháp đo nhu cầu oxy trong hô hấp kế kín

Determination of the ultimate aerobic biodegradable 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 tiềm ẩn. Do đó, cần thực hiện các biện pháp phòng ngừa thích hợp khi xử lý các chất này. Các chất thử có độc tính và những chất chưa biết rõ tính chất phải được xử lý cẩn thận.

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 những vật liệu có chứa phụ gia công thức, bằng cách đo nhu cầu oxy trong hô hấp kế kín. Vật liệu thử được phơi nhiễm trong môi trường nước dưới các điều kiện phòng thí nghiệm với chất cấy được lấy từ bùn hoạt hóa.

Nếu sử dụng bùn hoạt hóa không thích ứng làm chất cấy thì thử nghiệm này mô phỏng quá trình phân hủy sinh học xảy ra trong môi trường nước tự nhiên; nếu sử dụng chất cấy trộn sẵn hoặc đã được cho phơi nhiễm trước thì phương pháp này được sử dụng để nghiên cứu 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 cho phép 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 vật liệu chất dẻo hoặc đưa ra chỉ dẫn về khả năng phân hủy sinh học của chúng trong 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 tự nhiên và/hoặc tổng hợp, copolyme hoặc hỗn hợp của chúng.
- Vật liệu chất dẻo có chứa các phụ gia như chất hóa dẻo, chất tạo màu hoặc các hợp chất khác.
- Polyme tan được trong nước.

- Vật liệu mà trong các điều kiện thử, không ức chế các vi sinh vật có trong chất cấy. Các ảnh hưởng ức chế có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp kiểm soát ức chế hoặc bằng một phương pháp thích hợp khác [ví dụ xem TCVN 6226 (ISO 8192)^[2]]. Nếu vật liệu thử ức chế lên chất cấy, có thể sử dụng một loại chất cấy khác có nồng độ thử thấp hơn, hoặc một chất cấy đã được phơi nhiễm trước.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng 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 (ISO 8245), *Chất lượng nước – Hướng dẫn xác định cacbon hữu cơ tổng số (TOC) và cacbon hữu cơ hòa tan (DOC)*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

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 khi có mặt oxy tạo thành cacbon dioxit, 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 được 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

Nồng độ chất rắn lơ lửng trong bùn hoạt hóa (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 (3.2) 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 của oxy hòa tan tiêu thụ 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.

Chú thích 1: Được biểu thị bằng miligam oxy hấp thụ trên một miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.5**Nhu cầu oxy lý thuyết** (theoretical oxygen demand)**ThOD**

Lượng oxy tối đa theo lý thuyết cần thiết để oxy hóa hoàn toàn một hợp chất hóa học, tính theo công thức phân tử.

Chú thích 1: Được biểu thị bằng miligam oxy hấp thụ trên một miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.6**Tổng cacbon hữu cơ** (total organic carbon)**TOC**

Lượng cacbon liên kết trong một hợp chất hữu cơ.

3.7**Cacbon hữu cơ hòa tan** (dissolved organic carbon)**DOC**

Phần cacbon hữu cơ trong nước không thể loại bỏ được bằng quá trình phân tách pha quy định, ví dụ: bằng cách ly tâm ở $40\,000\text{ ms}^{-2}$ trong 15 min hoặc bằng cách lọc qua màng lọc có đường kính lỗ từ $0,2\text{ }\mu\text{m}$ đến $0,45\text{ }\mu\text{m}$

3.8**Giai đoạn thích ứng** (lag phase)

Thời gian, tính bằng ngày, từ khi bắt đầu thử nghiệm cho đến khi đạt được sự thích ứng và/hoặc chọn lọc của các vi sinh vật phân hủy và mức độ phân hủy sinh học của một hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ đạt được khoảng 10 % mức phân hủy sinh học tối đa (3.9)

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 thử nghiệm, mà ở trên mức này sẽ không có sự phân hủy sinh học nào diễn ra nữa

3.10**Giai đoạn phân hủy sinh học** (biodegradation phase)

Thời gian, tính bằng ngày, từ khi kết thúc giai đoạn thích ứng (3.8) của thử nghiệm cho đến khi đạt được khoảng 90 % mức phân hủy sinh học tối đa (3.9)

3.11**Giai đoạn ổn định** (plateau phase)

Thời gian, tính bằng ngày, từ khi kết thúc giai đoạn phân hủy sinh học (3.10) cho đến khi kết thúc thử nghiệm

3.12

Phơi nhiễm trước (pre-exposure)

Ủ trước chất cấy với sự có mặt của hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ cần thử nghiệm, nhằm mục đích tăng cường khả năng phân hủy sinh học vật liệu thử của chất cấy bằng cách làm thích ứng và/hoặc chọn lọc các vi sinh vật.

3.13

Ổn định trước (pre-conditioning)

Ủ trước chất cấy trong điều kiện của thử nghiệm tiếp theo mà không có hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ cần thử nghiệm, nhằm mục đích cải thiện thử nghiệm bằng cách làm quen vi sinh vật với điều kiện 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 chứa môi trường vô cơ, vật liệu thử hữu cơ (nguồn cacbon và năng lượng duy nhất) với nồng độ cacbon hữu cơ từ 100 mg/l đến 2000 mg/l, và bùn hoạt hóa làm chất cấy. Hỗn hợp này được khuấy trong bình kín trong hô hấp kế trong thời gian không quá 2 tháng. Lượng cacbon dioxit sinh ra được hấp thụ trong chất hấp thụ thích hợp ở khoảng không bên trên của bình. Lượng oxy tiêu thụ (BOD) được xác định, ví dụ bằng cách đo lượng oxy cần thiết để duy trì một thể tích khí không đổi trong bình đo hô hấp, hoặc bằng cách đo tự động hoặc thủ công sự thay đổi thể tích hoặc áp suất (hoặc kết hợp cả hai). Một ví dụ về hô hấp kế được nêu trong Phụ lục C. Ngoài ra, bình thử kín hai pha được mô tả trong TCVN 6664 (ISO 10708)^[3] cũng có thể được sử dụng (xem Phụ lục D).

Mức phân hủy sinh học được xác định bằng cách so sánh BOD với nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD) và được biểu thị bằng phần trăm. Ảnh hưởng của các quá trình nitrat hóa có thể xảy ra đối với BOD phải được xem xét. Kết quả thử nghiệm 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 thêm thông tin về sự phân hủy sinh học (xem Phụ lục E). Hơn nữa, lượng cacbon dioxit hấp thụ trong bộ hấp phụ ở cuối thử nghiệm cũng có thể được xác định để cung cấp thêm thông tin về sự phân hủy sinh học (xem Phụ lục G).

Không giống như TCVN 6827 (ISO 9408)^[6], sử dụng được cho nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau, tiêu chuẩn này được xây dựng đặc biệt để xác định khả năng phân hủy sinh học của các vật liệu chất dẻo. Các yêu cầu đặc biệt này ảnh hưởng đến việc lựa chọn chất cấy và môi trường thử, và có khả năng cải thiện sự đánh giá khả năng phân hủy sinh học thông qua việc tính toán cân bằng cacbon.

5 Môi trường thử

Quá trình ủ phải diễn ra trong bóng tối hoặc dưới ánh sáng khuếch tán trong một buồng kín không chứa các hơi có thể ức chế vi sinh vật và được duy trì ở nhiệt độ không đổi, tốt nhất là từ 20 °C đến 25 °C, với độ chính xác là ± 1 °C, hoặc ở bất kỳ nhiệt độ thích hợp nào khác tùy thuộc vào chất cấy sử dụng và môi trường cần đánh giá.

6 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử cấp phân tích được công nhận.

6.1 Nước cất hoặc nước khử ion

Nước cất hoặc nước khử ion, không có độc tố (đặc biệt là đồng) và có hàm lượng DOC nhỏ hơn 2 mg/l.

6.2 Môi trường thử

Tùy thuộc vào mục đích của thử nghiệm, có thể sử dụng các môi trường thử khác nhau. Ví dụ, nếu mô phỏng môi trường tự nhiên, thì sử dụng môi trường thử tiêu chuẩn (6.2.1). Nếu sử dụng vật liệu thử 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 tiêu chuẩn

6.2.1.1 Dung dịch A

Hòa tan các chất sau vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

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

Thành phần chính xác của dung dịch có thể được kiểm tra bằng cách đo độ pH, giá trị phải bằng 7,4.

6.2.1.2 Dung dịch B

Hòa tan 22,5 g magie sulfat heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

6.2.1.3 Dung dịch C

Hòa tan 36,4 g canxi clorua dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

6.2.1.4 Dung dịch D

Hòa tan 0,25 g sắt (III) clorua hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

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

6.2.1.5 Chuẩn bị

Để chuẩn bị 1 L môi trường thử, trong khoảng 500 mL nước (6.1) thêm các thành phần sau:

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

Pha loãng đến 1000 mL bằng nước (6.1). Chuẩn bị môi trường thử mới trước khi sử dụng. Các dung dịch từ A đến C có thể được bảo quản đến 6 tháng trong bóng tối ở nhiệt độ phòng.

6.2.2 Môi trường thử tối ưu

Môi trường tối ưu này có khả năng đệm cao và chứa nhiều chất dinh dưỡng vô cơ hơn. Điều này là cần thiết để giữ độ pH ổn định trong hệ thống trong suốt quá trình thử nghiệm, ngay cả khi nồng độ của vật liệu thử cao. Môi trường này chứa khoảng 2400 mg/L photpho và 50 mg/L nitơ, do đó phù hợp với nồng độ cacbon hữu cơ trong vật liệu thử lên đến 2000 mg/L. Nếu sử dụng nồng độ vật liệu thử cao hơn, cần tăng hàm lượng nitơ để giữ tỷ lệ C:N ở mức khoảng 40:1.

6.2.2.1 Dung dịch A

Hòa tan các chất sau vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

Kali dihydro phosphat khan (KH_2PO_4) 37,5 g

Natri hydro phosphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 87,3 g

Amoni clorua (NH_4Cl) 2,0 g

6.2.2.2 Dung dịch B

Hòa tan 22,5 g magie sulfat heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

6.2.2.3 Dung dịch C

Hòa tan 36,4 g canxi clorua dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

6.2.2.4 Dung dịch D

Hòa tan 0,25 g sắt(III) clorua hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL (xem đoạn thứ hai của 6.2.1.4).

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

Hòa tan vào 10 mL dung dịch HCl loãng (25 %, 7,7 mol/L) các chất 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 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 33 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 26 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Thêm nước (6.1) đến 1000 mL.

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

Hòa tan vào trong 100 mL nước (6.1) 0,6 mg biotin, 2,0 mg niacinamin, 2,0 mg *p*-aminobenzoat, 1,0 mg axit pantothenic, 10,0 mg pyridoxal hydrochlorua, 5,0 mg cyanocobalamin, 2,0 mg axit folic, 5,0 mg riboflavin, 5,0 mg axit DL-thioctic và 1,0 mg thiamine diclorua hoặc sử dụng dung dịch 15 mg chất chiết nấm men trong 100 mL nước (6.1). Dùng màng lọc (7.4) lọc dung dịch này để khử trùng.

Dung dịch E và dung dịch F là tùy chọn và không bắt buộc nếu sử dụng nồng độ chất cấy đủ, ví dụ, bùn hoạt hóa. 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 L môi trường thử, thêm vào khoảng 800 mL nước (6.1):

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

Thêm nước (6.1) đến 1000 ml và đo pH.

Thành phần chính xác của môi trường thử có thể được kiểm tra bằng cách đo độ pH, giá trị phải nằm trong khoảng $7,0 \pm 0,2$.

6.3 Dung dịch pyrophosphat

Hòa tan 2,66 g natri pyrophosphat khan ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) vào trong nước (6.1) và pha loãng đến 1000 mL.

6.4 Chất hấp thụ cacbon dioxit

Tốt nhất nên dùng viên soda vôi hoặc chất hấp thụ thích hợp khác.

7 Thiết bị, dụng cụ

Đảm bảo tất cả dụng cụ thủy tinh phải sạch và đặc biệt là không có vật liệu hữu cơ hoặc độc tố.

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

7.1 Hô hấp kế kín, bao gồm các bình thử (bình thủy tinh) được trang bị máy khuấy và tất cả các thiết bị cần thiết khác, được đặt trong phòng có nhiệt độ không đổi hoặc trong thiết bị điều nhiệt (ví dụ: bể cách thủy). Ví dụ xem Phụ lục C.

CHÚ THÍCH: Bất kỳ hô hấp kế 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 liên tục lượng oxy đã tiêu thụ để không xảy ra tình trạng thiếu oxy và không ức chế hoạt tính của vi sinh vật trong suốt quá trình phân hủy. Thay vì sử dụng một hô hấp kế thông thường, có thể sử dụng bình kín hai pha (xem Phụ lục D).

7.2 Thiết bị phân tích để xác định cacbon hữu cơ tổng số (TOC) và cacbon hữu cơ hòa tan (DOC) theo TCVN 6634 (ISO 8245).

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

Nên thực hiện thử nghiệm định tính trước để xác định xem có xảy ra quá trình nitrat hóa hay không. Nếu có bằng chứng của nitrat/nitrit trong môi trường, cần phải xác định định lượng bằng phương pháp phù hợp (ví dụ: sắc ký ion).

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

7.5 Cân phân tích (thiết bị phòng thí nghiệm thông thường).

7.6 Thiết bị đo pH (thiết bị phòng thí nghiệm thông thường).

8 Cách tiến hành

8.1 Vật liệu thử

Vật liệu thử phải có khối lượng đã biết và chứa lượng cacbon đủ để tạo ra lượng BOD có thể được xác định chính xác bằng hô hấp kế. Tính lượng ThOD từ công thức hóa học hoặc xác định bằng phân tích nguyên tố (xem Phụ lục A) và lượng TOC [ví dụ: sử dụng 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 nếu độ nhạy của hô hấp kế là phù hợp. Lượng vật liệu thử tối đa bị giới hạn bởi lượng oxy cung cấp cho hô hấp kế và môi trường thử được sử dụng. Khi sử dụng môi trường thử tối ưu (6.2.2), nồng độ vật liệu thử phải ở mức sao cho TOC không vượt quá khoảng 2000 mg/L, tức là tỷ lệ C:N khoảng 40:1. Nếu muốn thử nghiệm ở nồng độ cao hơn, thì tăng lượng nitơ trong môi trường thử.

Nếu mô phỏng các quá trình phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên, nên sử dụng môi trường thử tiêu chuẩn và nồng độ vật liệu thử là 100 mg/L.

Vật liệu thử tốt nhất nên được sử dụng ở dạng bột, nhưng cũng có thể được đưa vào dưới dạng màng, mảnh, mẫu hoặc vật thể định hình. Hình và dạng của vật liệu thử có thể ảnh hưởng đến khả năng phân hủy sinh học của nó. Nên sử dụng các hình dạng tương tự nếu muốn so sánh các loại vật liệu chất dẻo khác nhau. Nếu vật liệu thử được sử dụng ở dạng bột, nên sử dụng các hạt có phân bố cỡ hẹp, đã biết. Nên sử dụng phân bố cỡ hạt có đường kính tối đa là 250 μm . Ngoài ra, kích cỡ của thiết bị thử được sử dụng cũng phụ thuộc vào dạng của vật liệu thử. Cần đảm bảo rằng không xảy ra các sai lệch cơ học đáng kể do điều kiện thử, ví dụ như do loại cơ chế khuấy được sử dụng. Quá trình xử lý vật liệu thử (ví dụ: sử dụng dạng bột trong trường hợp vật liệu composite) không được gây ảnh hưởng đáng kể đến tình trạng/trạng thái phân hủy của vật liệu. Tùy chọn, ghi lại hàm lượng hydro, oxy, nitơ, photpho và lưu huỳnh cũng như khối lượng phân tử của vật liệu thử polyme bằng phương pháp ví dụ như sắc ký loại trừ lỏng (ví dụ, xem ASTM D 3536–91^[1] hoặc bất kỳ phương pháp nào khác thích hợp). Tốt nhất, nên thử các vật liệu chất dẻo không có chất phụ gia

như chất hóa dẻo. Khi vật liệu có chứa các chất phụ gia như vậy, cần có thông tin về khả năng phân hủy sinh học của chúng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của chính vật liệu polyme đó.

Để biết thêm chi tiết về cách xử lý đối với các hợp chất ít tan trong nước, xem TCVN 6918 (ISO 10634)^[7].

8.2 Vật liệu tham chiếu

Sử dụng anilin và/hoặc polyme có khả năng phân hủy sinh học cao (ví dụ: bột xenluloza vi tinh thể, giấy lọc xenlulo không tro hoặc poly- β -hydroxybutyrat) làm vật liệu tham chiếu. Nếu có thể, hình dạng và kích cỡ, lượng TOC nên tương đương với vật liệu thử.

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

8.3 Chuẩn bị chất cấy

Bùn hoạt hóa từ nhà máy xử lý nước thải chủ yếu xử lý nước thải sinh hoạt là một nguồn chất cấy phù hợp. Bùn được lấy từ môi trường hiếu khí hoạt động và có sẵn trên một khu vực địa lý rộng lớn, nơi cần thử nhiều loại vật liệu chất dẻo khác nhau. Khi cần xác định khả năng phân hủy sinh học trong một hệ thống xử lý chất thải cụ thể, nên thu thập chất cấy từ môi trường đó.

Lấy mẫu bùn hoạt hóa được thu thập từ một nhà máy xử lý nước thải đã được vận hành hoặc một nhà máy thí nghiệm xử lý chủ yếu nước thải sinh hoạt. Trộn đều, giữ mẫu trong điều kiện hiếu khí và tốt nhất nên sử dụng ngay trong ngày thu thập (ít nhất trong 72 h).

Trước khi sử dụng, xác định nồng độ chất rắn lơ lửng (ví dụ, sử dụng TCVN 6625 [ISO 11923]^[4]). Nếu cần thiết, cô đặc bùn bằng cách lắng để thể tích bùn thêm vào thí nghiệm là nhỏ nhất. Thêm một lượng thích hợp để thu được các chất rắn lơ lửng trong khoảng từ 30 mg/L đến 1000 mg/L trong hỗn hợp cuối cùng.

Nếu hô hấp nội sinh của chất cấy quá cao, ổn định chất cấy bằng cách sục khí trước khi sử dụng.

Điều chỉnh nhiệt độ thử phù hợp với chất cấy được sử dụng.

Việc xác định số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu) của chất cấy được sử dụng có thể hữu ích. Hỗn hợp thử tốt nhất nên chứa khoảng từ 10^3 cfu/mL đến 10^6 cfu/mL.

Khi cần mô phỏng các quá trình phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên hoặc khi cần thực hiện xác định cân bằng cacbon (xem Phụ lục E), nên sử dụng nồng độ chất cấy có hàm lượng chất rắn lơ lửng là 30 mg/L. Vì chất rắn có thể cản trở quá trình xác định cân bằng cacbon, khuyến nghị sử dụng quy trình chuẩn bị chất cấy như sau. Lấy 500 mL bùn hoạt hóa và đồng nhất trong 2 min ở tốc độ trung bình trong bình trộn hoặc máy trộn tốc độ cao phù hợp. Để hỗn hợp lắng cho đến khi chất lỏng nổi phía trên không còn chứa lượng chất lơ lửng đáng kể, nhưng trong mọi trường hợp ít nhất là 30 min. Gạn lượng chất lỏng nổi phía trên vừa đủ và cho vào các bình thử để đạt được nồng độ từ 1 % đến 5 % theo thể tích trong môi trường thử. Tránh gạn lẫn các hạt bùn.

Có thể ổn định trước chất cấy, nhưng thông thường không nên sử dụng chất cấy đã phơi nhiễm trước, đặc biệt là trong trường hợp các thử nghiệm tiêu chuẩn mô phỏng tình trạng/trạng thái phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên. Tùy thuộc vào mục đích của thử nghiệm, chất cấy đã phơi nhiễm trước cũng có thể được sử dụng, miễn là điều này được nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm (ví dụ: phần trăm phân hủy sinh học = x %, sử dụng chất cấy đã phơi nhiễm trước) và phương pháp phơi nhiễm trước được nêu chi tiết trong báo cáo thử nghiệm. Các chất cấy vi sinh đã được phơi nhiễm trước có thể thu được từ các thử nghiệm phân hủy sinh học trong phòng thí nghiệm phù hợp (xem ISO/TR 15462^[8]) được tiến hành trong nhiều điều kiện khác nhau hoặc từ các mẫu được thu thập từ các địa điểm có điều kiện môi trường liên quan (ví dụ: khu vực bị ô nhiễm hoặc nhà máy xử lý công nghiệp).

8.4 Thử nghiệm

Chuẩn bị một số bình, sao cho thử nghiệm bao gồm ít nhất phải có:

- a) ba bình thử chứa vật liệu thử (ký hiệu F_T);
- b) ba bình thử chứa mẫu trắng (ký hiệu F_B);
- c) hai bình thử để kiểm tra hoạt tính của chất cấy vi sinh sử dụng vật liệu đối chứng (ký hiệu F_C).

Và, nếu cần:

- d) Một bình để kiểm tra phân hủy không sinh học hoặc thay đổi không sinh học có thể xảy ra trong vật liệu thử ví dụ bằng phương pháp thủy phân (ký hiệu F_S). Dung dịch thử trong F_S phải được khử trùng, ví dụ bằng cách hấp tiệt trùng hoặc bằng cách thêm một hợp chất độc vô cơ thích hợp để ngăn chặn hoạt tính của vi sinh vật. Ví dụ, sử dụng 5 ml/l dung dịch chứa 10 g/l thủy ngân (II) clorua ($HgCl_2$). Thêm cùng một lượng chất độc trong quá trình thử nghiệm nếu cần.
- e) Một bình làm đối chứng âm (ký hiệu F_N) sử dụng chất polyme không phân hủy sinh học (ví dụ: polyetylen) ở dạng giống như vật liệu thử.
- f) Một bình để kiểm tra tác dụng ức chế có thể có của vật liệu thử đối với hoạt tính vi sinh vật (ký hiệu F_I). Đảm bảo rằng tỷ lệ giữa cacbon trong vật liệu thử và vật liệu đối chứng so với nitơ trong môi trường ít nhất phải xấp xỉ C:N = 40:1. Thêm nitơ nếu cần.

Thêm lượng thích hợp môi trường thử (6.2) và chất cấy (xem 8.3) vào các bình thử được đưa ra trong Bảng 1.

Đo độ pH trong các bình và điều chỉnh về 7 nếu cần. Thêm chất hấp thụ cacbon dioxit (6.4) vào ngăn chứa chất hấp thụ của hô hấp kế (xem Phụ lục C). Thêm vật liệu thử (xem 8.1), vật liệu đối chứng và vật liệu để làm mẫu đối chứng âm (xem 8.2) vào các bình tương ứng được đưa ra trong Bảng 1. Nếu thực hiện cân bằng cacbon (xem Phụ lục E), lấy ra một thể tích đủ đã biết của môi trường thử đã được cấy từ mỗi bình hoặc từ các bình riêng bổ sung để xác định DOC và sinh khối ở thời điểm bắt đầu và kết thúc quá trình ủ. Lưu ý thể tích đã lấy ra khi điều chỉnh thể tích cuối cùng hoặc khi tính toán kết quả thử nghiệm.

Đặt các bình trong môi trường có nhiệt độ không đổi (xem Điều 5) và để tất cả các bình đạt đến nhiệt độ mong muốn. Thực hiện bất kỳ kết nối nào cần thiết, đậy kín các bình, đặt chúng vào hồ hấp kế và khởi động máy khuấy.

Ghi lại số đọc trên áp kế (nếu là loại thủ công) và xác minh rằng máy ghi lượng oxy tiêu thụ đang hoạt động bình thường (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 cuối của vật liệu thử và vật liệu tham chiếu

Bình		Vật liệu thử	Vật liệu tham chiếu	Chất cấy
F _T	Thử nghiệm	+	-	+
F _T	Thử nghiệm	+	-	+
F _T	Thử nghiệm	+	-	+
F _B	Thử nghiệm trắng	-	-	+
F _B	Thử nghiệm trắng	-	-	+
F _B	Thử nghiệm trắng	-	-	+
F _C	Kiểm tra chất cấy	-	+	+
F _C	Kiểm tra chất cấy	-	+	+
F _S	Kiểm tra phân hủy không sinh học (tùy chọn)	+	-	-
F _I	Kiểm soát ức chế (tùy chọn)	+	+	+
F _N	Đối chứng âm (tùy chọn)	-	+	+

Khi mức BOD không đổi được duy trì (đạt đến giai đoạn ổn định) và không còn sự phân hủy sinh học xảy ra, thử nghiệm được coi là hoàn thành. Thời gian thử nghiệm thường không nên vượt quá 2 tháng.

Tuy nhiên, nếu vẫn quan sát thấy hiện tượng phân hủy sinh học đáng kể và chưa đạt đến giai đoạn ổn định sau khoảng thời gian này, thì có thể kéo dài thời gian thử nghiệm, nhưng không được vượt quá 6 tháng. Trong trường hợp thời gian thử nghiệm dài, cần đặc biệt chú ý đến hệ thống kỹ thuật (ví dụ: độ kín của các bình thử và các mối nối).

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

Allylthiourea chỉ có thể ức chế quá trình nitrat hóa trong thời gian ngắn, vì nó có khả năng phân hủy sinh học. Do vậy, không nên thêm allylthiourea để ngăn ngừa quá trình nitrat hóa.

Tuy nhiên, kinh nghiệm chỉ ra rằng, với nồng độ chất cầy thấp (khoảng 1 % theo thể tích), quá trình nitrat hóa sẽ không xảy ra ngay cả khi thời gian ủ dài, khi đó không cần sử dụng chất ức chế.

Tùy chọn xác định thêm lượng cacbon dioxit hấp thụ trong bộ hấp phụ vào cuối thử nghiệm (xem Phụ lục G).

9 Tính toán và biểu thị kết quả

9.1 Tính toán

Đọc giá trị lượng tiêu thụ oxy trong mỗi bình, sử dụng phương pháp do nhà sản xuất đưa ra cho loại hô hấp kế phù hợp. Tính nhu cầu oxy sinh hóa cụ thể (BOD_s) của vật liệu thử là sự chênh lệch giữa lượng tiêu thụ oxy trong các bình thử F_T và các bình 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;

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

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

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

Tính phần trăm phân hủy sinh học D_t là tỷ lệ giữa nhu cầu oxy sinh hóa cụ thể và nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD, tính bằng miligam trên gam vật liệu thử), sử dụng Công thức (2):

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

Tính toán theo cùng một cách giá trị BOD và phần trăm phân hủy sinh học của vật liệu tham chiếu F_C và, nếu có, kiểm tra phân hủy không sinh học F_S , kiểm soát ức chế F_I và đối chứng âm F_N .

Để tính toán ThOD, xem Phụ lục A. Nếu xác định được nồng độ nitrit và nitrat đáng kể, cần xem xét nhu cầu oxy do quá trình nitrat hóa (xem Phụ lục B). Nếu cần tính toán cân bằng cacbon, sử dụng thông tin được đưa ra trong Phụ lục E.

9.2 Biểu thị và giải thích kết quả

Lập bảng các giá trị BOD đo được và phần trăm phân hủy sinh học cho mỗi khoảng thời gian đo và của mỗi bình thử. Đối với mỗi bình, vẽ đồ thị đường cong của lượng BOD và đường cong phần trăm phân hủy sinh học theo thời gian. Nếu thu được kết quả tương đương cho ba 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 dần trong giai đoạn ổn định, đặc trưng cho mức độ phân hủy sinh học của vật liệu thử. Nếu đã xác định được cân bằng cacbon, kết quả xác định này đặc trưng cho tổng mức độ phân hủy sinh học.

Khả năng thấm ướt và hình dạng của vật liệu thử có thể ảnh hưởng đến kết quả thu được, do đó quy trình thử có thể bị giới hạn trong việc so sánh các vật liệu chất dẻo có cấu trúc hóa học giống nhau.

Thông tin về độc tính của vật liệu thử có thể hữu ích trong việc giải thích kết quả thử nghiệm cho thấy khả năng phân hủy sinh học thấp.

10 Tính hợp lệ của kết quả

Thử nghiệm được coi là hợp lệ nếu:

- mức độ phân hủy sinh học của vật liệu tham chiếu (kiểm tra chất cầy F_C) lớn hơn 60 % tại thời điểm kết thúc thử nghiệm;
- Giá trị BOD của bình F_B chứa mẫu trắng tại thời điểm kết thúc thử nghiệm không vượt quá giá trị giới hạn trên thu được từ kinh nghiệm (giá trị này phụ thuộc vào lượng chất cầy, ví dụ, trong trường hợp có 30 mg/l chất khô, thì giá trị này khoảng 60 mg/L như các thử nghiệm liên phòng thí nghiệm đã chỉ ra);
- Giá trị BOD của ba bình F_B chứa mẫu trắng và ba bình F_T chứa vật liệu thử nằm trong phạm vi 20 % so với giá trị trung bình ở giai đoạn ổn định hoặc tại thời điểm kết thúc thử nghiệm.

Nếu trong bình F_I (kiểm soát ức chế, nếu có) phần trăm phân hủy sinh học < 25 % và không quan sát thấy sự phân hủy đáng kể nào của vật liệu thử, có thể giả định rằng vật liệu thử có tính ức chế.

Nếu trong bình F_S (kiểm tra phân hủy không sinh học, nếu có) quan sát thấy một lượng BOD đáng kể (> 10 %), có thể đã xảy ra các quá trình phân hủy không sinh học.

Nếu có bình F_N (kiểm tra đối chứng âm), không quan sát thấy lượng BOD đáng kể nào.

Nếu các tiêu chí này không đạt được, cần lặp lại thử nghiệm bằng cách sử dụng một chất cầy khác đã được ổn định trước hoặc phơi nhiễm trước.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chứa ít nhất các thông tin sau:

- viện dẫn tiêu chuẩn này;

- b) tất cả thông tin cần thiết để xác định vật liệu thử và vật liệu tham chiếu, bao gồm TOC, ThOD, thành phần hóa học và công thức (nếu biết), hình dạng, dạng và lượng/nồng độ trong các mẫu được thử nghiệm;
- c) các thông số thử nghiệm chính, bao gồm thể tích thử, môi trường thử được sử dụng, nhiệt độ ủ và pH cuối cùng;
- d) nguồn gốc và lượng chất cấy được sử dụng, bao gồm chi tiết về bất kỳ sự phơi nhiễm trước nào;
- e) các kỹ thuật phân tích được sử dụng, bao gồm nguyên lý của hô hấp kế và phương pháp xác định TOC và nitrat/nitrit;
- f) tất cả các kết quả thử nghiệm thu được đối với vật liệu thử và vật liệu tham chiếu (ở dạng bảng và đồ thị), bao gồm lượng BOD đo được, giá trị phần trăm phân hủy sinh học, các đường cong tương ứng của các thông số này theo thời gian và nồng độ nitrat/nitrit;
- g) khoảng thời gian của giai đoạn thích ứng, giai đoạn phân hủy sinh học và mức phân hủy tối đa, cũng như tổng thời gian thử nghiệm;

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

- h) kết quả của kiểm tra phân hủy không sinh học F_S , kiểm soát ức chế F_I và ~~kiểm tra~~ đối chứng âm F_N ;
- i) kết quả xác định cân bằng cacbon, bao gồm ví dụ:
 - 1) lượng cacbon trong vật liệu thử bị oxy hóa thành cacbon dioxit, ước tính từ mức độ phân hủy sinh học dựa trên BOD,
 - 2) lượng tăng DOC trong môi trường thử trong suốt thời gian ủ do các chất hòa tan trong nước,
 - 3) lượng tăng cacbon hữu cơ trong sinh khối trong suốt quá trình thử nghiệm,
 - 4) hàm lượng cacbon của các polyme tồn dư tại thời điểm kết thúc thử nghiệm,
 - 5) tổng lượng cacbon đo được, được biểu thị bằng phần trăm lượng cacbon được đưa vào dưới dạng vật liệu thử;
- j) số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu/ml) trong hỗn hợp thử đã cấy;
- k) bất kỳ dữ liệu liên quan nào khác (ví dụ: khối lượng phân tử ban đầu của mẫu, khối lượng phân tử của polyme tồn dư).

Phụ lục A

(tham khảo)

Nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD)**A.1 Tính toán ThOD**

Nhu cầu oxy 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 biết thành phần nguyên tố hoặc có thể được xác định bằng phân tích nguyên tố, sử dụng Công thức (A.1):

$$ThOD = \frac{16[2c + 0.5(h - cl - 3n) + 3s + 2.5p + 0.5na - o]}{M_r} \quad (A.1)$$

Phép tính này giả định rằng cacbon 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 bị loại bỏ dưới dạng halogenua hydro. Quá trình oxy hóa của N, P và S phải được kiểm tra bằng phân tích. Việc tính toán cũng giả định rằng nitơ được giải phóng dưới dạng amoni. Để biết ảnh hưởng của quá trình nitrat hóa, xem Phụ lục B.

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

A.2 Ví dụ: Axit poly(β -hydroxybutyric) (PHB)

Công thức rút gọn: $C_4H_6O_2$, $c = 4$, $h = 6$, $o = 2$; khối lượng phân tử tương đối $M_r = 86$. Xem Công thức (A.2):

$$ThOD = \frac{16[2 \times 4 + 0.5 \times 6 - 2]}{86}$$

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

CHÚ THÍCH: PHB là một polyme có chứa monome β -hydroxybutyrat. Để trùng hợp (tạo este), nước bị loại bỏ, do đó công thức rút gọn của PHB tương đương với công thức của monome trừ đi một phân tử H_2O , phân tử này bị khử trong phản ứng hóa học.

A.3 Hỗn hợp polyetylen/tinh bột/glycerol

Thành phần	Công thức	ThOD mg/g	Lượng các thành phần		ThOD mg/bình
			%	mg/bình	
Polyetylen	$(C_2H_4)_n$	3400	50	500	1700
Tinh bột	$(C_6H_{10}O_5)_n$	1190	40	400	476
Glycerin	$C_3H_8O_3$	1200	10	100	120
Tổng cộng		100		1000	2296

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. Cần phải hiệu chỉnh chúng nếu muốn tránh những sai số nghiêm trọng trong việc tính toán mức độ phân hủy sinh học dựa trên quá trình oxy hóa cacbon trong vật liệu thử có chứa nitơ.

Sai số trong trường hợp các chất không chứa nitơ thường không đáng kể, vì quá trình oxy hóa amoni trong môi trường được tính đến bằng cách trừ đi trong mẫu trắng.

Muối amoni và các hợp chất thử chứa nitơ có thể bị oxy hóa thành nitrit hoặc nitrat trong suốt quá trình ủ của thử nghiệm phân hủy sinh học. Vì các phản ứng diễn ra tuần tự (được thực hiện bởi các chủng vi khuẩn khác nhau), nên nồng độ nitrit có thể tăng hoặc giảm. Trong trường hợp giảm, nồng độ nitrat cân bằng sẽ được hình thành. Các phản ứng hóa học lần lượt từ Công thức (B.1) đến (B.3) như sau:



Tổng thể:



Từ các công thức này, có thể kết luận rằng:

- để oxy hóa 2 mol (28 g) nitơ amoni (được thêm bởi NH_4Cl vào môi trường vô cơ) thành nitrit, cần 3 mol (96 g) oxy (BOD_{NO_2}), kết quả là cần 3,43 (96/28) mg nhu cầu oxy trên mỗi mg nitơ;
- để oxy hóa 2 mol (28 g) nitơ amoni thành nitrat, cần 4 mol (128 g) oxy (BOD_{NO_3}), kết quả là cần 4,57 (128/28) mg nhu cầu oxy trên mỗi mg nitơ.

Lượng nitrat hóa có thể được xác định bằng cách đo nồng độ nitrat và nitrit tại thời điểm kết thúc thử nghiệm trong môi trường trong bình F_T . Nên tiến hành thử nghiệm định tính trước để xác định xem có xảy ra quá trình nitrat hóa hay không. Nếu có bằng chứng về nitrat hoặc nitrit, cần phải xác định định lượng.

Lượng BOD thu được từ quá trình oxy hóa nitơ tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, BOD_N , được tính bằng miligam trên lít, sử dụng 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_{NO3} là nồng độ nitơ nitrat đo được trong bình F_T tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, tính bằng miligam trên lít;

ρ_{NO2} là nồng độ nitơ nitrit đo được trong bình F_T tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, tính bằng miligam trên lít;

4,57 là hệ số nhu cầu oxy cho sự hình thành nitrat;

3,43 là hệ số nhu cầu oxy cho sự hình thành nitrit.

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

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

trong đó

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

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

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

B.2 Ví dụ

Chất thử axit p-aminobenzoic 2-ethylhexyl este ở nồng độ 100 mg/l trong F_T .

ThOD	239 mg/L
BOD_t đo được tại thời điểm kết thúc thử nghiệm	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 thử nghiệm 15 mg/l	$\rho_{NO3} = 3,5$ mg/L
Nitrit tại thời điểm kết thúc thử nghiệm 1 mg/l	$\rho_{NO2} = 0,3$ mg/L
BOD_N vào cuối thí nghiệm	17 mg/L
BOD_C	174 mg/L
D_t hiệu chỉnh bởi quá trình nitrat hóa	73 %.

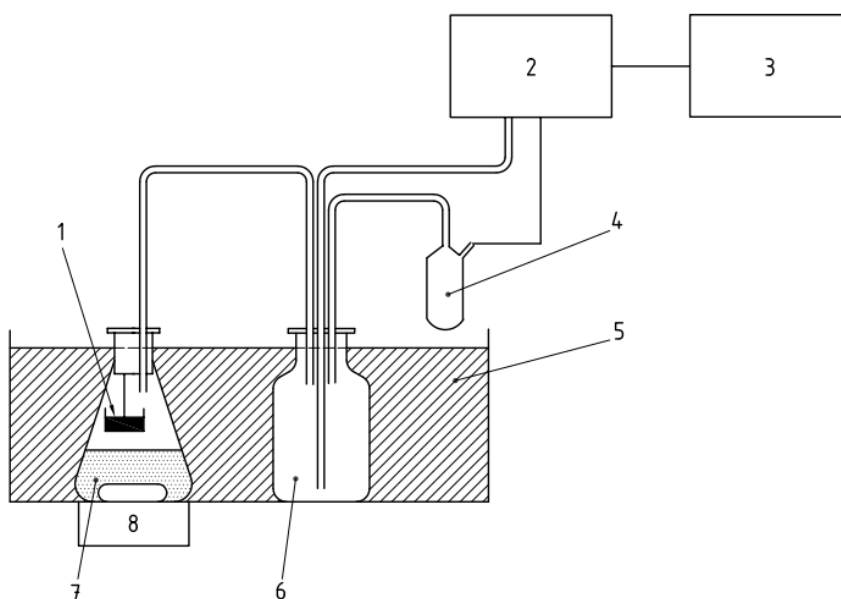
Phụ lục C

(tham khảo)

Nguyên lý của hô hấp áp kế kín

Hô hấp kế được cài đặt trong môi trường được kiểm soát nhiệt độ (ví dụ: bể cách thủy) và bao gồm: các bình thử, mỗi bình được trang bị một thanh khuấy từ và một vật chứa ở khoảng không bên trên có chứa chất hấp thụ CO_2 , một thiết bị tạo oxy bằng phương pháp đo điện lượng, một áp kế, các thanh khuấy từ cho mỗi bình, và một thiết bị giám sát và ghi dữ liệu bên ngoài (máy in, thiết bị vẽ đồ thị hoặc máy tính). Đồ hỗn hợp thử đến khoảng một phần ba dung tích các bình thử. Xem Hình C.1.

Khuấy liên tục đảm bảo sự cân bằng oxy giữa pha nước và pha khí. Nếu quá trình phân hủy sinh học diễn ra, các vi sinh vật sẽ tiêu thụ oxy và tạo ra cacbon dioxit, chất này được hấp thụ hoàn toàn. Tổng áp suất trong các bình giảm xuống. Sự giảm áp suất được phát hiện bởi áp kế và được sử dụng để bắt đầu quá trình tạo oxy bằng điện phân. Khi áp suất ban đầu được khôi phục, quá trình điện phân dừng lại và lượng điện năng tiêu thụ, tỷ lệ thuận với lượng oxy tiêu thụ, được đo liên tục và sử dụng để hiển thị lượng oxy tiêu thụ, tính bằng mg/l BOD, trên máy ghi.

**CHÚ DẪN**

- 1 Chất hấp thụ CO_2
- 2 Màn hình
- 3 Máy in, thiết bị vẽ đồ thị hoặc máy tính
- 4 Áp kế
- 5 Bể cách thủy
- 6 Thiết bị tạo oxy
- 7 Bình thử
- 8 Máy khuấy

Hình C.1 — Sơ đồ cấu tạo của hô hấp áp kế

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 như một thiết bị thay thế, ví dụ, nếu không có hô hấp kế. Môi trường đã được cấy vi sinh vật, vật liệu thử và vật liệu đối chứng được lắc hoặc khuấy ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C trong các bình kín chứa thể tích xác định của môi trường nước và không khí để đảm bảo sự phân bố oxy ổn định giữa pha nước và pha khí. Quá trình phân hủy sinh học được theo dõi bằng cách đo thường xuyên nồng độ oxy hòa tan trong pha nước. Tổng lượng oxy hấp thụ trong bình thử được tính bằng sự chênh lệch giữa nồng độ oxy hòa tan đo được trong bình chứa mẫu trắng và bình thử, chia cho giá trị độ bão hòa oxy trong điều kiện bình thường và nhân với tổng hàm lượng oxy ban đầu có trong pha nước và pha khí. Khả năng phân hủy sinh học được tính bằng tổng lượng oxy hấp thụ chia cho nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD) và được biểu thị bằng phần trăm.

D.2 Thiết bị, dụng cụ đặc biệt

D.2.1 Bình ủ: bình kín khí, chẳng hạn như bình cổ hẹp có dung tích từ 200 mL đến 300 mL và có nút đậy phù hợp (ví dụ: nút thủy tinh nhám, nút cao su butyl hoặc nắp vặn), có khả năng ngăn ánh sáng (ví dụ: làm bằng thủy tinh màu nâu). Nên sử dụng kẹp nút đậy. Đánh dấu mỗi bình bằng ký hiệu chống thấm nước. Nếu không sử dụng điện cực oxy có gắn máy khuấy, thì các bình nên lắp một máy khuấy từ có thanh khuấy phủ PTFE. Hoặc sử dụng các bình có dung tích tiêu chuẩn sao cho độ lệch chuẩn so với thể tích trung bình của lô bình nhỏ hơn 1 mL hoặc đo và ghi lại dung tích của từng bình riêng lẻ, được đánh số với độ chính xác 1 mL. Cần thận trọng bôi mỡ silicon trơn lên nút đậy của các bình để đảm bảo đóng kín và dễ dàng tháo ra.

D.2.2 Điện cực oxy, tốt nhất là loại có gắn máy khuấy, có khả năng đo trong phạm vi từ 0 mg/l đến 10 mg/l với độ chính xác 1 %. Trạng thái ổn định sẽ đạt được trong khoảng 1,5 min. Gắn điện cực, ví dụ, vào một nút trơn tạo độ kín khít với cổ bình thủy tinh nhám của bình ủ hoặc sử dụng kỹ thuật đo nồng độ oxy trong đường vòng tuần hoàn.

D.2.3 Máy khuấy từ hoặc thiết bị lắc.

D.3 Cách tiến hành

Chuẩn bị các bình ủ như mô tả trong 8.4, với ba bình mỗi loại F_T , F_B và F_C . Đặt một thanh khuấy vào mỗi bình nếu chúng được khuấy thay vì lắc. Chuẩn bị môi trường thử thích hợp, tốt nhất là

môi trường thử tiêu chuẩn (6.2.1), để thực hiện toàn bộ thử nghiệm. Để đảm bảo cung cấp đủ chất dinh dưỡng, tăng lượng amoni clorua trong dung dịch A (6.2.1.1) lên gấp ba lần, tức là 1,5 g/L. Cấy vi sinh vật vào môi trường theo 8.3, tốt nhất là sử dụng bùn hoạt hóa với nồng độ chất rắn lơ lửng là 30 mg/L, trộn đều và thêm hỗn hợp vào các bình. Thêm một lượng bằng hai phần ba thể tích của bình (ví dụ: 200 mL chất lỏng cho bình dung tích 300 mL). Đặt các bình lên thiết bị lắc hoặc khuấy đều, và ủ ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C trong một tuần. Trong thời gian này, vi khuẩn sẽ sử dụng chất dự trữ và chất cấy sẽ ổn định. Sau đó, sục khí vào các bình bằng không khí nén bão hòa nước và bộ khuếch tán không khí trong khoảng 15 min. Đo nồng độ oxy ban đầu. Thêm vào các bình 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 thử nghiệm này phải tương ứng với 150 mg/L ThOD, tương đương với khoảng 90 mg/L TOC. Đóng kín tất cả các bình và tiếp tục ủ.

Sau thời gian ủ ít nhất một tuần xác định nồng độ oxy hòa tan trong mỗi bình. Giữ các bình ở nhiệt độ ủ không đổi ($\pm 0,5$ °C) trong suốt quá trình đo. Hiệu chuẩn chính xác điện cực oxy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để đo oxy, lần lượt lấy từng bình và lắc mạnh bằng tay khoảng 30 s. Đặt bình lên máy khuấy nhưng không khuấy. Mở nút bình và ngay lập tức đưa điện cực oxy qua cổ bình sao cho nút điện cực đóng kín bình và đầu điện cực nằm sâu bên dưới mặt chất lỏng. Khởi động máy khuấy ở tốc độ sao cho có thể đo oxy nhưng không tạo thành xoáy. Sử dụng cùng một tốc độ khuấy trong suốt quá trình đo và hiệu chuẩn điện cực. Ghi lại giá trị oxy khi nó ổn định, giá trị này sẽ đạt được trong khoảng 2 min. Chỉ sử dụng những bình có nồng độ oxy > 1,5 mg/L để tính toán kết quả thử nghiệm. Ngoài ra, có thể sử dụng các kỹ thuật thích hợp khác để đo nồng độ oxy hòa tan trong pha nước, chẳng hạn như điện cực oxy được đặt trong đường vòng tuần hoàn kín.

Sau đó, đo độ pH trong mỗi bình và ghi lại. Nếu độ pH dưới 6,0, điều chỉnh đến khoảng 7,5 bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 mol/l đến 0,5 mol/l. Nếu độ pH trên 8,0, điều chỉnh đến khoảng 7,5 bằng dung dịch axit clohydric 0,1 mol/l đến 0,5 mol/l. Cuối cùng, sục môi trường vào mỗi bình bằng bộ khuếch tán không khí trong 15 min và đo lại nồng độ oxy như mô tả trước đó. Đóng kín tất cả các bình, đặt chúng lên máy lắc và tiếp tục ủ. Hiệu chỉnh các giá trị BOD đo được tại thời điểm kết thúc thử nghiệm nitrat hóa (xem 8.4 và Phụ lục B).

D.4 Tính toán kết quả

Xác định lượng oxy tiêu thụ tương đối, U_r , đo được trong pha nước trong mỗi bình, sử dụng 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 bình chứa mẫu trắng sau khi ủ, tại thời điểm t , tính bằng miligam trên lít;

C_t là nồng độ oxy hòa tan trong mỗi bình 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 giá trị trung bình đo được sau mỗi lần sục khí hoặc sục khí lại của các bình chứa mẫu trắng và bình thử. Giá trị lý thuyết ở áp suất khí quyển tiêu chuẩn (1013 hPa) và 20 °C là 9,08 mg/L.

Xác định tổng lượng oxy O_c (mg/bình) của một bình từ hàm lượng oxy tối đa trong pha khí và hàm lượng oxy trong pha nước 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 hàm lượng oxy trong không khí thông thường, tính bằng miligam trên mililit;

V_g là thể tích khí trong bình ủ, tính bằng mililit;

0,009 là hàm lượng oxy trong nước bão hòa, tính bằng miligam trên mililit;

V_l là thể tích chất lỏng trong bình ủ, tính bằng mililit.

Thông thường, V_l sẽ không đổi trong một loạt thử nghiệm, trừ khi lấy mẫu để phân tích, nhưng V_g có thể khác nhau tùy thuộc vào loại bình thử được sử dụng. Nếu sự chênh lệch giữa các bình riêng lẻ nhỏ, có thể sử dụng O_c không đổi. Nếu sự chênh lệch đáng kể (ví dụ: > 2 mL đối với bình có dung tích 200 mL), cần tính O_c cho mỗi bình. Nếu V_l giảm theo thể tích mẫu lấy, V_g sẽ tăng tỷ lệ thuận.

Sau đó, tính lượng oxy tiêu thụ BOD (mg/bình) từ Công thức (D.3):

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

Tổng lượng oxy tiêu thụ ΣBOD (mg/bình) của tất cả (n) thời gian ủ theo Công thức (D.4) để thu được BOD tại thời điểm kết thúc thử nghiệm.

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

Cuối cùng, tính phần trăm phân hủy sinh học như mô tả trong 9.1. Sử dụng các công thức thích hợp để xác định sự loại bỏ không sinh học, cũng như sự phân hủy sinh học của vật liệu tham chiếu và sự kiểm soát 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 các chất có khối lượng phân tử thấp. Việc chỉ xác định lượng khí CO₂ sinh ra hoặc BOD thường không đủ để đặc trưng và định lượng khả năng phân hủy sinh học của chúng. Trong quá trình phân hủy sinh học, sinh khối mới được hình thành bởi các vi sinh vật và một phần cacbon trong vật liệu thử được chuyển hóa thành sinh khối nhưng không bị oxy hóa về mặt sinh hóa. Do đó, các thông số phân tích như lượng khí CO₂ sinh ra và BOD thường không đạt 100 % giá trị lý thuyết tương ứng ngay cả trong trường hợp phân hủy sinh học hoàn toàn vật liệu thử, và kết quả thử nghiệm có thể dẫn đến kết luận sai về sự phân hủy không đủ. Việc xác định tổng cân bằng cacbon như mô tả trong phụ lục này có thể hữu ích trong những trường hợp như vậy để xác nhận khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn. Sự cân bằng này dựa trên tổng lượng cacbon thu được từ các phép đo sau: cacbon được giải phóng dưới dạng cacbon dioxit, cacbon được sinh ra dưới dạng sinh khối mới, cacbon được chuyển hóa thành các chất chuyển hóa hữu cơ hòa tan trong nước, cacbon được xác định là DOC và cacbon còn lại trong vật liệu polyme không bị phân hủy. Tổng lượng cacbon được so sánh với lượng cacbon hữu cơ trong vật liệu thử được đưa vào hệ thống thử.

E.2 Quy trình thử

Xác định BOD được giải phóng như mô tả trong ~~mục 8.4~~.

Lấy mẫu môi trường đã cấy vi sinh vật tại thời điểm bắt đầu, trước khi thêm vật liệu thử và tại thời điểm kết thúc quá trình ủ. Việc lấy mẫu cần được thực hiện cẩn thận để thu được các mẫu đại diện. Cho các mẫu đi qua màng lọc hoặc ly tâm ở tốc độ khoảng 40000 m.s⁻².

Với mỗi mẫu xác định lượng sinh khối trong dịch lọc hoặc dịch ly tâm bằng các phương pháp thích hợp, chẳng hạn như đo lượng protein. Xác định hoặc giả định lượng cacbon trong sinh khối và tính toán từ sự chênh lệch mức tăng cacbon hữu cơ trong sinh khối. Xác định, theo TCVN 6634 (ISO 8245), lượng DOC trong dịch lọc của từng mẫu và tính toán lượng tăng cacbon hữu cơ. Nếu có thể, cần xác định các chất tạo thành DOC để xác nhận sự hình thành các chất chuyển hóa hòa tan trong nước.

Xác định lượng cacbon trong các polyme tồn dư tại thời điểm kết thúc thử nghiệm bằng cách sử dụng toàn bộ lượng mẫu còn lại. Đây thường là một quy trình khó khăn và có thể được thực hiện trực tiếp nếu có sẵn phân tích cụ thể cho từng polyme (xem Phụ lục F) hoặc gián tiếp. Trong trường hợp đầu tiên, chiết xuất và cân các polyme tồn dư và tính toán lượng cacbon từ thành phần

đã biết của chúng. Một phương pháp khả thi để xác định gián tiếp là rửa, sấy khô và cân cặn, sau đó xác định tổng cacbon hữu cơ (TOC). Sau đó, trừ lượng cacbon sinh khối (xem ở trên) khỏi TOC để thu được lượng cacbon trong các polyme tồn dư. Một cách khác là cân chính xác phần cặn và sau đó xử lý nó bằng một phương pháp thích hợp để phá hủy sinh khối nhưng không phá hủy polyme (điều này cần được kiểm tra trước). Ví dụ, sử dụng natri hypoclorit, loại bỏ phần hòa tan và cân lại mẫu. Giả sử rằng tất cả sinh khối đã được loại bỏ và tính toán hàm lượng polyme trong phần cặn dựa trên khối lượng thu được.

E.3 Tính toán cân bằng cacbon

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

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

Tính lượng tăng cacbon sinh khối trong các bình thử chứa vật liệu thử C_{BIO} (mg/l) bằng cách so sánh sinh khối tại thời điểm bắt đầu và thời điểm kết thúc quá trình ủ, lưu ý đến lượng cacbon đo được hoặc ước tính được trong sinh khối tại thời điểm bắt đầu $C_{B(bắt đầu)}$ và tại thời điểm kết thúc $C_{B(kết thúc)}$, được đưa ra trong 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 $DOC_{(bắt đầu)}$ và tại thời điểm kết thúc $DOC_{(kết thúc)}$ được đưa ra trong Công thức (E.3):

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

Xác định lượng cacbon hữu cơ trong các polyme tồn dư sau khi kết thúc thử nghiệm C_{POL} .

Tính giá trị chênh lệch lượng cacbon chuyển hóa dưới dạng phần trăm của cacbon được đưa vào C_{MAT} và cộng lại để thu được cacbon tính toán C_{CALC} (%) được đưa ra trong 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 -hydroxybutyrate[5])

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

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

Phụ lục F

(tham khảo)

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

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

- a) Chuyển hỗn hợp thử vào phễu, thêm dung môi hữu cơ thích hợp và lắc từ 10 min đến 20 min để chiết xuất các polyme còn lại. Tách lớp dung môi hữu cơ khỏi lớp nước. Thêm dung môi mới và lặp lại quy trình.
- b) Gộp các chất chiết xuất hữu cơ và làm bay hơi dung môi cho đến khi khô. Hòa tan mẫu rắn trong một thể tích dung dịch rửa giải thích hợp.
- c) Sử dụng bơm tiêm micro, bơm một lượng thích hợp vào thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có cột chứa gel sắc ký loại trừ kích thước. Bắt đầu phân tích và ghi lại sắc ký đồ.
- d) Xác định lượng polyme hiện diện bằng cách sử dụng đường ~~cong~~ hiệu chuẩn.
- e) Xác định khối lượng phân tử của polyme bằng cách bơm vào máy sắc ký cùng một loại polyme, hoặc các polyme có cấu trúc tương tự như polyme cần kiểm tra có khối lượng phân tử đã biết. Mối quan hệ giữa thời gian lưu và khối lượng phân tử thu được từ sắc ký đồ cuối cùng. Tính khối lượng phân tử bằng cách sử dụng mối quan hệ này.

Khối lượng phân tử tuyệt đối của polyme thử cũng có thể được xác định bằng HPLC với detector kết hợp tán xạ ánh sáng laser góc thấp (LALLS) và chỉ số khúc xạ vi sai (RI).

Phụ lục G

(tham khảo)

Ví dụ về việc xác định lượng CO₂ hấp thụ trong chất hấp thụ**G.1 Nguyên tắc**

Trong trường hợp quá trình nitrat hóa xảy ra, các giá trị phân hủy sinh học dựa trên lượng oxy tiêu thụ cần được hiệu chỉnh (Phụ lục B). Vì sự chênh lệch nhỏ về hàm lượng nitrat và nitrit dẫn đến sự hiệu chỉnh lớn trong phần trăm phân hủy sinh học thu được, nên việc xác định tùy chọn phần trăm phân hủy sinh học dựa trên lượng cacbon dioxit được tạo ra là hữu ích. Phần trăm phân hủy sinh học dựa trên lượng cacbon dioxit được tạo ra có thể được sử dụng để kiểm tra các giá trị thu được dựa trên lượng oxy tiêu thụ sau khi hiệu chỉnh cho quá trình nitrat hóa.

G.2 Quy trình thử

Xác định lượng cacbon dioxit trong chất hấp phụ mỗi khi chất hấp phụ được thay mới và vào cuối thử nghiệm. Axit hóa hàm lượng của tất cả các bình tại thời điểm kết thúc thử nghiệm bằng 1 mL đến 10 mL axit clohydric đậm đặc (HCl) để phân hủy cacbonat và bicacbonat. Tiếp tục sục khí thêm 24 h nữa, sau đó xác định lượng cacbon dioxit.

Ví dụ về quy trình phân tích phù hợp: Thêm 1 mL dung dịch KOH (3 N) vào ngăn hấp phụ CO₂. Xác định lượng CO₂ hấp phụ bằng phương pháp chuẩn độ. Pha loãng dung dịch KOH thu được với nước cất hoặc nước khử ion (6.1) đến 60 mL và chuẩn độ với HCl 0,05 N.

G.3 Tính toán

Tính lượng cacbon dioxit lý thuyết (ThCO₂) sinh ra, biểu thị bằng miligam, sử dụng Công thức (G.1):

$$ThCO_2 = specimen(mg) \times \frac{TOC(\%)}{100} \times \frac{44}{12} \quad (G.1)$$

trong đó

TOC (%) là TOC của vật liệu chất dẻo (hoặc vật liệu tham chiếu) chia cho 100;

44 là khối lượng phân tử của CO₂;

12 là khối lượng phân tử của C.

Tính phần trăm phân hủy sinh học cho các bình thử F_T, sử dụng Công thức (G.2):

$$\%bio\ deg\ rdation = \frac{(mgCO_2\ produced)_T - (mgCO_2\ produced)_B}{ThCO_2} \times 100 \quad (G.2)$$

trong đó:

$(\text{mg CO}_2 \text{ được tạo ra})_T$	là lượng cacbon dioxit sinh ra trong bình F_T giữa thời điểm bắt đầu thử nghiệm và thời điểm kết thúc thử nghiệm, được biểu thị bằng miligam;
$(\text{mg CO}_2 \text{ được tạo ra})_B$	là lượng cacbon dioxit sinh ra trong bình F_B chứa mẫu trắng giữa thời điểm bắt đầu thử nghiệm và thời điểm kết thúc thử nghiệm, được biểu thị bằng miligam;
ThCO_2	là lượng cacbon dioxit lý thuyết được tạo ra bởi vật liệu thử, được biểu thị bằng miligam.

Tương tự, tính phần trăm phân hủy sinh học của vật liệu tham chiếu trong bình kiểm tra chất cầy F_C .

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] TCVN 6226 (ISO 8192), *Chất lượng nước – Phép thử sự ức chế khả năng tiêu thụ oxy của bùn hoạt hóa dùng để oxy hóa các hợp chất cacbon và amoni*
- [3] TCVN 6664 (ISO 10708), *Chất lượng nước – Đánh giá sự phân hủy sinh học ưa khí cuối cùng các chất hữu cơ trong môi trường – Xác định nhu cầu oxy sinh hóa dùng bình thử kín hai pha*
- [4] TCVN 6625 (ISO 11923), *Chất lượng nước – Xác định chất rắn lơ lửng bằng cách lọc qua cái lọc sợi thủy tinh*
- [5] PÜCHNER. P. (1994), *Screening-Testmethoden zur Abbaubarkeit von Kunststoffen unter aeroben und anaeroben Bedingungen, Dissertation, Stuttgart University Fakultät für Bauingenieurwesen, Stuttgarter Berichte zur Abfallwirtschaft, 59, Erich Schmidt Verlag, Berlin*
- [6] 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 hô hấp kế kín*
- [7] TCVN 6918 (ISO 10634), *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*
- [8] ISO/TR 15462, *Water quality – Selection of tests for biodegradability*
- [9] JIS K 6950:1994, *Plastics Testing Method for Aerobic Biodegradability by Activated Sludge*
- [10] 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*
- [11] SAWADA. H. (1994), *Field Testing of Biodegradable Plastics, Edited by Y. Doi and K. Fukuda, Biodegradable Plastics and Polymers, Elsevier, Amsterdam, pp. 298–312*
- [12] SPERANDIO, A., and PÜCHNER, P. *Bestimmung der Gesamtproteine als Biomasse-Parameter in wässrigen Kulturen und auf Trägermaterialien aus Bio-Reaktoren, gwf Wasser. Abwasser. 1993, 134 pp. 482–485*