

**DT TCVN/QTKT xxxx:2026
ISO 18452:2021**

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 –
PHÂN TÍCH LƯỢNG CACBON DIOXIT SINH RA**

*Determination of the ultimate aerobic biodegradable of plastic materials in an aqueous
medium – Method by analysis of evolved carbon dioxide*

Lời nói đầu

DT TCVN/QTKT xxxx:2026 hoàn toàn tương đương với ISO 14852:2021.

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. Chất dẻo phân hủy sinh học hiện đang nổi lên như một trong những lựa chọn khả thi để giải quyết các vấn đề môi trường này. Các vật liệu chất dẻo, chẳng hạn như sản phẩm hoặc bao gói, được đưa đến các khu xử lý tạo compost cần có khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn. Do đó, điều rất quan trọng là việc xác định khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn của các vật liệu này và đưa ra được chỉ dẫn về khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn của chúng.

Chất dẻo – Xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của vật liệu chất dẻo trong môi trường nước – Phân tích lượng cacbon dioxit **sinh ra**

Determination of the ultimate aerobic biodegradable of plastic materials in an aqueous medium – Method by analysis of evolved carbon dioxide

CẢNH BÁO — Trong nước thải, bùn hoạt hóa 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 chúng. 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 lượng cacbon dioxit **sinh ra**. Vật liệu thử được phơi nhiễm trong môi trường tổng hợp trong điều kiện phòng thí nghiệm tiêu chuẩn với chất cấy lấy từ bùn hoạt hóa trong điều kiện hiếu khí.

Các điều kiện được sử dụng trong tiêu chuẩn này không nhất thiết phải giống với các điều kiện tối ưu để quá trình phân hủy sinh học tối đa xảy ra, nhưng phương pháp thử này được thiết kế để đo sự phân hủy sinh học của vật liệu chất dẻo và đưa ra chỉ dẫn về khả năng phân hủy sinh học tiềm ẩn của chúng.

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

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 chất phụ gia như chất hoá 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 vi sinh vật có trong chất cấy. Hiệu ứng 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)^[1]). **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

Khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn (ultimate aerobic biodegradability)

Tỷ lệ phân hủy được biểu thị bằng phần trăm của một hợp chất hữu cơ bởi vi sinh vật khi có mặt oxy tạo thành cacbon dioxit, nước và muối khoáng của nguyên tố bất kỳ có mặt (khoáng hóa) cộng với sinh khối mới

3.2

Bùn hoạt hóa (activated sludge)

Hỗn hợp vật liệu hữu cơ và sinh khối được tạo ra 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 (concentration of suspended solids)

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

Cacbon vô cơ hòa tan (dissolved inorganic carbon)

DIC

Phần cacbon vô cơ trong nước không thể loại bỏ được bằng quá trình phân tách pha quy định.

CHÚ THÍCH : Có thể đạt được sự tách pha, ví dụ, bằng cách ly tâm ở 40000 m.s^{-2} trong 15 min hoặc bằng cách lọc qua màng lọc có đường kính lỗ từ 0,2 μm đến 0,45 μm .

3.5

Lượng cacbon dioxit sinh ra theo lý thuyết (theoretical amount of evolved carbon dioxide)

ThCO₂

Lượng cacbon dioxit **sinh ra** tối đa theo lý thuyết sau khi oxy hóa hoàn toàn một hợp chất hóa học, được tính từ công thức phân tử.

CHÚ THÍCH 1: Được tính từ công thức phân tử.

CHÚ THÍCH 2: Được biểu thị bằng miligam cacbon dioxit **sinh ra** trên 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.

CHÚ THÍCH 1: Được biểu thị bằng miligam cacbon trên 100 mg hợp chất.

[TCVN 9494: 2012 (ISO 17556:2012), 3.14]

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.

CHÚ THÍCH 1: Có thể đạt được sự tách pha, ví dụ, bằng cách ly tâm 40000 m.s^{-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 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)

CHÚ THÍCH : Được tính bằng ngày.

3.9

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

Mức độ phân hủy sinh học 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.

CHÚ THÍCH: Được tính bằng phần trăm.

3.10

Giai đoạn phân hủy sinh học (biodegradation phase)

Thời gian từ khi kết thúc giai đoạn thích ứng (3.8) của một thử nghiệm cho đến khi đạt đến giai đoạn ổn định (3.11)

CHÚ THÍCH: Được tính bằng ngày.

3.11

Giai đoạn ổn định (plateau phase)

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

CHÚ THÍCH: Được tính bằng ngày.

3.12

Phơi nhiễm trước (pre-exposure)

Ủ trước chất cấy (3.14) 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

Ôn định trước (pre-conditioning)

Ủ trước chất cấy (3.14) 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

3.14

Chất cấy (inoculum)

Vi sinh vật hoặc vật liệu khác được sử dụng trong **quá trình cấy** (3.15)

CHÚ THÍCH: Còn được gọi là mẫu cấy.

3.15

Quá trình cấy (inoculation)

Đưa vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy để bắt đầu một quá trình sinh học.

4 Nguyên tắc

Khả năng phân hủy sinh học của vật liệu chất dẻo được xác định bằng cách sử dụng vi sinh vật hiếu khí, **ưa nhiệt trung bình** trong **hệ thống dung dịch nước**. Hỗn hợp thử gồm 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. Nếu sử dụng nồng độ vật liệu thử cao hơn, thì nên sử dụng môi trường thử được tối ưu hóa.

CHÚ THÍCH: Nồng độ cacbon hữu cơ thấp hơn, ví dụ từ 20 mg/l đến 40 mg/l, đã được thử nghiệm và thích hợp.

Hỗn hợp này được khuấy trong bình thử và sức khí không chứa cacbon dioxid trong một khoảng thời gian tùy thuộc vào động học của quá trình phân hủy sinh học, nhưng không quá 2 tháng. Lượng cacbon dioxid **sinh ra** trong quá trình phân hủy sinh học được xác định bằng phương pháp phân tích phù hợp, ví dụ như trong Phụ lục A và Phụ lục B.

Mức phân hủy sinh học được xác định bằng cách so sánh lượng cacbon dioxid **sinh ra** với lượng cacbon dioxid **sinh ra** theo lý thuyết (ThCO_2) và được biểu thị bằng phần trăm. Kết quả thử nghiệm là mức phân hủy sinh học tối đa, được xác định từ giai đoạn ổn định của đồ thị phân hủy sinh học. Ngoài ra, có thể tính cân bằng cacbon để cung cấp thêm thông tin về quá trình phân hủy sinh học (xem Phụ lục C).

Không giống như TCVN 6489 (ISO 9439), 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 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 ± 1 °C.

6 Thuốc thử

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

6.1 Nước cất hoặc nước khử ion, không có độ cứng (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 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 photphat khan (KH_2PO_4)	8,5 g
Kali dihydro photphat khan (K_2HPO_4)	21,75 g
Natri 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

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 ethylenđiaminetetraacetic (EDTA) 0,4 g/L.

6.2.1.5 Chuẩn bị

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

- 10 mL dung dịch A (6.2.1.1);
- 1 mL mỗi dung dịch B (6.2.1.2), C (6.2.1.3), D (6.2.1.4).

Thêm nước cho đủ 1000 mL (6.1).

Chuẩn bị môi trường thử mới trước khi sử dụng. Các dung dịch A đến C có thể được bảo quản đến 6 tháng trong bóng tối ở nhiệt độ phòng.

Điều tương tự cũng áp dụng cho dung dịch D trong trường hợp có thêm HCl hoặc EDTA.

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 thích hợp cho nồng độ cacbon hữu cơ trong vật liệu thử lên đến 2000 mg/L. Nếu sử dụng nồng độ vật liệu thử cao hơn hoặc thấp hơn, cần tăng hoặc giảm hàm lượng nitơ tương ứng để giữ tỷ lệ C:N ở mức khoảng 40:1.

6.2.2.1 Dung dịch E

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

Kali dihydro photphat khan (KH_2PO_4)	37,5 g
Natri dihydro photphat 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 F (dung dịch nguyên tố vết, tùy chọn).

Hòa tan vào 10 mL dung dịch HCl loãng (25%, 7,7 mol/L) các chất theo trình tự sau:

- a) 70 mg ZnCl_2 ;
- b) 100 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;
- c) 6 mg H_3BO_3 ;
- d) 190 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;

- e) 3 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- f) 240 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- g) 36 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- h) 33 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- i) 26 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Thêm nước (6.1) đến 1000 mL.

6.2.2.3 Dung dịch G (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 gồm 15 mg chất chiết nấm men trong 100 ml nước (6.1). Lọc dung dịch này để khử trùng bằng màng lọc (xem 7.7).

Dung dịch F và dung dịch G là tùy chọn và không bắt buộc nếu sử dụng nồng độ chất cấy đủ, ví dụ như bùn hoạt hóa. Nên chuẩn bị các phần 1 mL và bảo quản lạnh cho đến khi sử dụng.

6.2.2.4 Chuẩn bị

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

- 100 mL dung dịch E (6.2.2.1), và
- 1 mL mỗi loại dung dịch B (6.2.1.2), C (6.2.1.3), D (6.2.1.4) và, tùy chọn, F (6.2.2.2) và G (6.2.2.3).

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 pH, giá trị phải nằm trong khoảng $7,0 \pm 0,2$.

7 Thiết bị, dụng cụ

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

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

7.2 Bình thử, các vật chứa bằng thủy tinh (ví dụ: chai hoặc bình nón) được thiết kế để cho phép **thổi sạch khí** và lắc hoặc khuấy, và được trang bị ống không thấm CO_2 . Các bình phải được đặt trong phòng có nhiệt độ không đổi hoặc trong thiết bị điều nhiệt (ví dụ: **bể cách thủy**).

7.3 Hệ thống cấp khí không chứa CO₂, có khả năng cung cấp không khí không chứa CO₂ với lưu lượng từ 50 ml/min đến 100 ml/min cho mỗi bình thử, được giữ ổn định trong phạm vi $\pm 10\%$ (xem ví dụ về hệ thống, bao gồm các bình thử, trong Phụ lục A).

7.4 Thiết bị phân tích để xác định cacbon dioxit, bao gồm các thiết bị thích hợp có đủ độ chính xác, ví dụ như thiết bị phân tích CO₂ hoặc DIC hoặc thiết bị xác định bằng phương pháp chuẩn độ sau khi hấp thụ hoàn toàn trong dung dịch kiềm (xem ví dụ trong Phụ lục B). Lưu ý rằng, nếu sử dụng thiết bị phân tích có **detector** IR, thì không cần sử dụng khí không chứa CO₂.

7.5 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).

7.6 Cân phân tích

7.7 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.

7.8 Thiết bị đo pH

7.9 Máy khuấy từ hoặc thiết bị lắc

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 CO₂ có thể đo được một cách chính xác bằng hệ thống phân tích sử dụng. Tính lượng TOC từ công thức hóa học hoặc xác định nó bằng một kỹ thuật phân tích phù hợp (ví dụ: phân tích nguyên tố hoặc xác định theo TCVN 6634 (ISO 8245) và tính lượng ThCO₂). Sử dụng nồng độ vật liệu thử sao cho hàm lượng TOC ít nhất là 30 mg/l, tốt nhất là 100 mg/L. Lượng vật liệu thử tối đa bị giới hạn bởi lượng oxy cung cấp cho hệ thống thử và môi trường thử được sử dụng. Khi sử dụng lượng vật liệu thử cao hơn, nên sử dụng môi trường thử tối ưu (6.2.2) và trong mọi trường hợp, nồng độ vật liệu thử phải ở mức sao cho lượng 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 phải tăng lượng nitơ trong môi trường thử.

CHÚ THÍCH: Lượng vật liệu thử thấp hơn, tương ứng với hàm lượng TOC từ 20 mg/L đến 40 mg/L, đã được thử nghiệm và cho kết quả thích hợp.

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, ví dụ như sử dụng **sắc ký loại trừ lỏng** (xem, ví dụ, ASTM D 3536-91^[7] hoặc bất kỳ phương pháp nào khác thích hợp). Tốt nhất là 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 polymer đó.

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

8.2 Vật liệu **tham chiếu**

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

8.3.1 Tổng quan

Bùn hoạt hóa từ nhà máy xử lý nước thải chủ yếu xử lý nước thải sinh hoạt là 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. Khi cần xác định khả năng phân hủy sinh học trong một nhà máy xử lý chất thải cụ thể, thu thập chất cấy từ môi trường đó.

Có thể chuẩn bị chất cấy từ các nguồn được mô tả trong 8.3.2 để thu được hệ vi sinh vật đa dạng và đồng đúc với **đủ để tác động đến quá trình phân hủy sinh học**. Nếu sự hô hấp nội sinh của chất cấy quá cao, cần 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 (xem Điều 5).

8.3.2 Chất cấy lấy từ các nhà máy xử lý nước thải

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 thử nghiệm là nhỏ nhất. Thêm một thể tích thích hợp để thu được **hàm lượng** chất rắn lơ lửng trong khoảng từ 30 mg/L đến 1000 mg/L trong hỗn hợp cuối cùng.

Khi tiến hành xác định cân bằng cacbon (xem Phụ lục C), 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 hóa 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. 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) 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 chứa mẫu trắng (ký hiệu F_B).
- c) Hai bình để kiểm tra hoạt tính của chất cấy sử dụng vật liệu **tham chiếu** (ký hiệu F_C).

Có thể sử dụng hai bình chứa vật liệu thử, mẫu trắng và vật liệu **tham chiếu** thay vì ba bình cho mục đích sàng lọc. 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 **tham chiếu** 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.

Bảng 1 – Phân bố cuối của vật liệu thử và vật liệu tham chiếu

Bình		Vật liệu thử	Vật liệu tham chiếu	Chất cầy
F _T	Thử nghiệm	+	-	+
F _B	Thử nghiệm trắng	-	-	+
F _C	Kiểm tra chất cầy	-	+	+
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)	-	+	+

Nối các bình thử với hệ thống cấp khí không chứa CO₂ (xem Phụ lục A). Ủ ở nhiệt độ thử mong muốn (xem Điều 5) và sục khí vào các bình trong 24 h để loại bỏ cacbon dioxit khỏi hệ thống. Ở nhiệt độ cao hơn, ngăn chặn việc bổ sung hoặc thất thoát chất lỏng bằng thiết bị phù hợp. Khuấy liên tục trong suốt quá trình thử nghiệm bằng máy khuấy từ hoặc máy lắc. Nếu quan sát thấy hiện tượng tạo bọt quá nhiều, thì thay việc sục khí bằng cách sục khí từ trên xuống kết hợp khuấy. Sau giai đoạn sục khí sơ bộ, nối đầu ra khí của mỗi bình với hệ thống **thu giữ/bẫy** hoặc đo cacbon dioxit.

Nếu cần thực hiện cân bằng cacbon (xem Phụ lục C), thì lấy một thể tích đủ lớn môi trường thử đã cầy vi sinh từ mỗi bình hoặc từ các bình riêng biệt khác để xác định DOC và sinh khối tại thời điểm bắt đầu và kết thúc quá trình ủ. Cân nhắc thể tích đã lấy ra khi điều chỉnh thể tích cuối cùng hoặc khi tính toán kết quả thử nghiệm.

Cho vật liệu thử (xem 8.1), vật liệu **tham chiếu** và đối chứng âm (xem 8.2) vào các bình tương ứng được đưa ra trong Bảng 1 và bắt đầu thử nghiệm bằng cách sục khí không chứa CO₂ qua các bình để đảm bảo cung cấp đủ lượng oxy trong suốt quá trình thử nghiệm. **Tốc độ sục** từ 50 mL/min đến 100 mL/min là phù hợp.

Tùy thuộc vào tốc độ **sinh ra** cacbon dioxit tiến hành đo định kỳ lượng cacbon dioxit **sinh ra** trong mỗi bình bằng phương pháp phù hợp và đủ độ chính xác (xem Phụ lục B).

Khi lượng cacbon dioxit **giải phóng** đạt được mức độ ổn định (đạt đến giai đoạn ổn định) và không còn sự phân hủy sinh học xảy ra, thì 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 thử nghiệm có thể được kéo dài, nhưng không 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, đảm bảo không có cacbon dioxit từ bên ngoài xâm nhập vào và không bị rò rỉ).

Tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, đo độ pH, axit hóa tất cả các bình bằng 1 ml axit clohydric đậm đặc để phân hủy các cacbonat và bicarbonat, và sục khí để loại bỏ cacbon dioxit.

Tiếp tục sục khí trong 24 h và đo lượng cacbon dioxit **sinh ra** trong mỗi dãy bình (F_T , F_B , F_C , v.v ...).

9 Tính toán và trình bày kết quả

9.1 Tính toán

9.1.1 Lượng cacbon đioxit lý thuyết **sinh ra** bởi vật liệu thử

Tính toán lượng cacbon đioxit ($ThCO_2$) lý thuyết **sinh ra**, tính bằng miligam, bằng cách sử dụng Công thức (1):

$$ThCO_2 = m \times X_C \times \frac{44}{12} \quad (1)$$

trong đó

- m là khối lượng vật liệu thử được đưa vào hệ thống thử, tính bằng miligam;
- X_C là hàm lượng cacbon của vật liệu thử, được xác định từ công thức hóa học hoặc được tính toán từ phân tích nguyên tố và biểu thị dưới dạng phần trăm khối lượng;
- 44 là khối lượng phân tử của cacbon đioxit;
- 12 là khối lượng nguyên tử của cacbon.

Tính toán, theo cùng một cách, lượng cacbon đioxit lý thuyết **sinh ra** từ vật liệu **tham chiếu** trong bình F_C và hỗn hợp vật liệu thử và vật liệu **tham chiếu** trong bình F_I

9.1.2 Phần trăm phân hủy sinh học từ lượng CO_2 sinh ra

Tính phần trăm phân hủy sinh học D_t cho các bình thử F_T từ lượng cacbon dioxit sinh ra trong mỗi **khoảng thời gian đo** bằng cách sử dụng Công thức (2):

$$D_t = m \frac{\sum (CO_2)_T - \sum (CO_2)_B}{ThCO_2} \times 100 \quad (2)$$

trong đó

- $\sum (CO_2)_T$ là lượng cacbon dioxit sinh ra trong bình chứa mẫu thử F_T từ thời điểm bắt đầu thử nghiệm đến thời gian t , được biểu thị bằng miligam;
- $\sum (CO_2)_B$ là lượng cacbon dioxit sinh ra trong bình chứa mẫu trắng F_B từ thời điểm bắt đầu thử nghiệm đến thời gian t , được biểu thị bằng miligam;
- $ThCO_2$ là lượng cacbon dioxit sinh ra theo lý thuyết từ vật liệu thử, được biểu thị bằng miligam.

Nếu có thể, tính giá trị trung bình cho ba bình thử tiến hành đồng thời. Tương tự, tính phần trăm phân hủy sinh học của vật liệu **tham chiếu** trong bình kiểm tra chất cầy F_C và, nếu có, phần trăm phân hủy sinh học của hỗn hợp vật liệu thử và vật liệu **tham chiếu** trong bình kiểm soát ức chế F_I , vật liệu thử trong bình kiểm soát phân hủy không sinh học F_S và bình kiểm tra đối chứng âm F_N .

Nếu cần thực hiện cân bằng cacbon, nên tính mức độ phân hủy sinh học của vật liệu thử từ lượng cacbon dioxit **sinh ra** và hàm lượng cacbon của sinh khối hình thành trong quá trình thử nghiệm (xem Phụ lục C).

9.2 Biểu thị và giải thích kết quả

Lập bảng lượng cacbon dioxit **sinh ra** và phần trăm phân hủy sinh học cho mỗi **khoảng thời gian đo** và mỗi bình thử. Đối với mỗi bình, vẽ đồ thị **đường cong** lượng cacbon dioxit sinh ra và **đường cong** biểu diễn phần trăm phân hủy sinh học theo thời gian. Nếu thu được kết quả tương đương cho ba bình thử tiến hành đồng thời, 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 như khi **đường cong** đi lên hoặc đi xuống chậm 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 nghiệm có thể bị giới hạn trong việc so sánh các vật liệu chất dẻo có cấu trúc hóa học tương tự.

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;
- lượng cacbon dioxit sinh ra trong bình chứa mẫu trắng F_B tại thời điểm kết thúc thử nghiệm không vượt quá giá trị giới hạn trên thu được theo kinh nghiệm (giá trị này phụ thuộc vào lượng chất cầy, ví dụ các thử nghiệm liên phòng thí nghiệm đã chỉ ra trong trường hợp có 30 mg/L vật liệu khô, thì giá trị này khoảng 90 mg/L);
- lượng cacbon dioxit sinh ra trong ba bình chứa mẫu trắng F_B và từ ba bình thử F_T 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 tra ức chế, nếu có) phần trăm phân hủy sinh học nhỏ hơn 25 % và không quan sát được rõ sự phân hủy của vật liệu thử, thì 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 được rõ lượng cacbon dioxit sinh ra (> 10 %), quá trình phân hủy không sinh học có thể đã xảy ra.

Nếu bình F_N (kiểm tra đối chứng âm) được sử dụng, không được quan sát thấy lượng cacbon dioxit sinh ra (> 10 %).

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

11 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) viện dẫn tiêu chuẩn này, nghĩa là ISO 14852:2021;
- b) tất cả thông tin cần thiết để xác định vật liệu thử và vật liệu **tham chiếu**, bao gồm TOC, ThCO₂, 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 các phương pháp phát hiện cacbon dioxid và xác định TOC, DOC và sinh khối;
- f) tất cả các kết quả thử nghiệm thu được đối với vật liệu thử và vật liệu **tham chiếu** (dưới dạng bảng và đồ thị), bao gồm lượng cacbon dioxid tích lũy đo được, giá trị phần trăm phân hủy sinh học và các **đường cong** tương ứng của các thông số này theo thời gian;
- g) khoảng thời gian của giai đoạn thích ứng, pha phân hủy sinh học và mức phân hủy tối đa, cũng như tổng thời gian thử nghiệm;
- h) bất kỳ sai lệch nào so với quy trình;
- i) bất kỳ đặc điểm bất thường nào được quan sát;
- j) ngày thử nghiệm;

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

- k) 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 ;
- l) kết quả xác định cân bằng cacbon, bao gồm, ví dụ:
 - 1) lượng cacbon trong vật liệu thử bị oxy hóa thành cacbon dioxid,
 - 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, và
 - 5) tổng lượng cacbon đo được, được biểu thị bằng phần trăm lượng cacbon được đưa vào dưới dạng vật liệu thử;

m) số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu/ml) trong hỗn hợp thử đã cấy;

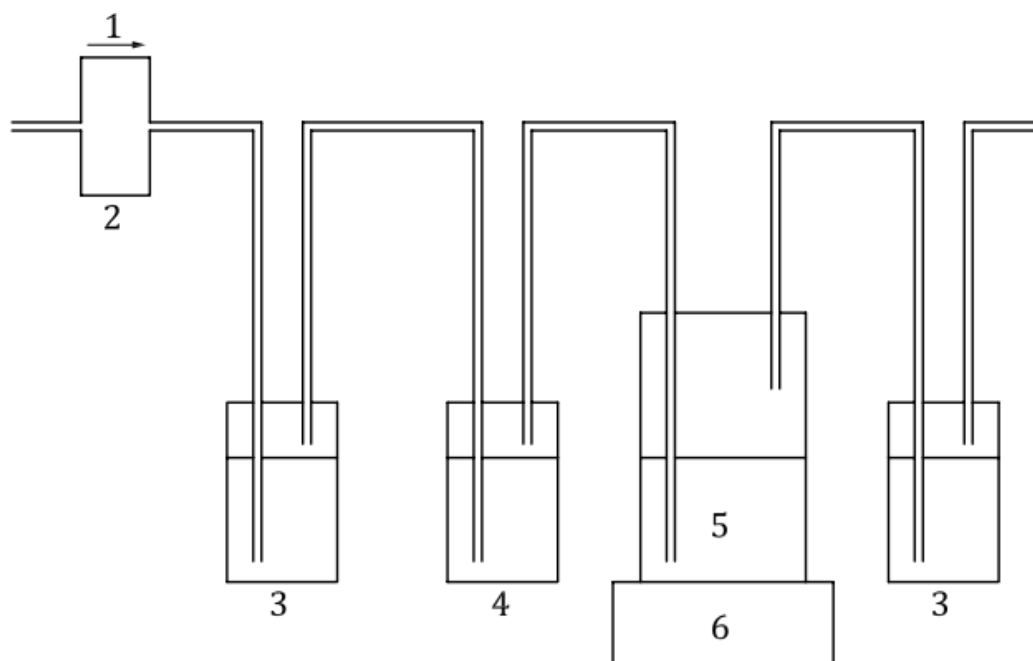
n) bất kỳ dữ liệu liên quan nào khác (ví dụ: khối lượng phân tử ban đầu của mẫu, khối lượng phân tử của polyme tồn dư).

Phụ lục A

(tham khảo)

Nguyên tắc của hệ thống đo lượng cacbon dioxit sinh ra (ví dụ)

Các bình được lắp theo dãy như Hình A.1, được nối với nhau bằng ống không thấm khí. Dẫn không khí không chứa CO₂ với tốc độ 50 mL/min đến 100 mL/min đi qua hệ thống ở áp suất thấp không đổi. Dùng bột khí hoặc sử dụng bộ điều khiển lưu lượng phù hợp để kiểm tra lưu lượng khí. Sử dụng không khí tổng hợp không chứa CO₂ hoặc khí nén. Trong trường hợp sử dụng khí nén, loại bỏ CO₂ bằng cách cho không khí đi qua một chai chứa vôi soda khô hoặc qua ít nhất hai bình rửa chứa, ví dụ, 500 mL dung dịch kali hydroxit (KOH) 10 mol/L. Sử dụng thêm một bình chứa 100 mL dung dịch bari hydroxit [Ba(OH)₂] 0,0125 mol/L để nhận biết sự hiện diện của CO₂ trong không khí bằng độ đục. Có thể sử dụng một bình trống ở giữa bình chứa chất chỉ thị và bình thử tiếp theo để ngăn chất lỏng bị lẫn vào. CO₂ được **sinh ra** trong bình thử nếu quá trình phân hủy sinh học xảy ra và được hấp thụ trong các **bình hấp thụ** tiếp theo để xác định như mô tả trong Phụ lục B.

**CHÚ DẪN**

- 1 không khí nén
- 2 Bộ điều khiển lưu lượng
- 3 Bẫy cacbon dioxit (hai bình rửa chứa kiềm)
- 4 Chất chỉ thị cacbon dioxit [Ba(OH)₂]
- 5 Bình thử
- 6 Thiết bị khuấy

Hình A.1 – Ví dụ hệ thống đo lượng cacbon dioxit sinh ra

Phụ lục B

(tham khảo)

Ví dụ về các phương pháp xác định lượng cacbon dioxit **sinh ra****B.1 Xác định CO₂ bằng cách đo DIC**

Cacbon dioxit **sinh ra** được hấp thụ trong dung dịch natri hydroxit (NaOH) và được xác định dưới dạng cacbon vô cơ hòa tan (DIC) bằng cách sử dụng, ví dụ, máy phân tích DOC mà không cần đốt cháy.

Chuẩn bị dung dịch NaOH 0,05 mol/L trong nước khử ion. Đo DIC của dung dịch này và sử dụng giá trị trắng này khi tính toán lượng CO₂ **sinh ra**. Nối vào dây bình thử hai **bình hấp thụ**, mỗi bình chứa 100 mL dung dịch NaOH. Đóng kín đầu ra của bình cuối cùng bằng một xi phông nhỏ để ngăn CO₂ từ không khí xâm nhập vào dung dịch NaOH. Vào những ngày tiến hành xác định CO₂, lấy **bình hấp thụ** bên cạnh bình thử ra và lấy một lượng mẫu đủ lớn để đo DIC (ví dụ: 10 mL). Thay thế bình bằng bình thử hai và thêm một bình mới chứa dung dịch NaOH mới chuẩn bị. Vào ngày cuối cùng, sau khi axit hóa dung dịch thử, đo lượng DIC trong cả hai chai.

Tính lượng CO₂ **sinh ra** bằng cách sử dụng Công thức (B.1):

$$m(\text{CO}_2)_T = m \frac{(\text{DIC}_T - \text{DIC}_B) \times 3,67}{10} \quad (\text{B.1})$$

trong đó

$m(\text{CO}_2)_T$	là lượng CO ₂ sinh ra, tính bằng miligam;
DIC_T	là lượng DIC đo được từ bình mẫu thử, tính bằng miligam;
DIC_B	là lượng DIC đo được từ bình trắng đối với dung dịch NaOH, tính bằng miligam;
3,67	là tỷ lệ giữa khối lượng phân tử của CO ₂ (44) và khối lượng nguyên tử của cacbon (12);
10	là hệ số hiệu chỉnh để bù trừ cho việc đã sử dụng 100 ml dung dịch NaOH.

B.2 Phương pháp chuẩn độ sử dụng dung dịch bari hydroxit

Lượng CO₂ **sinh ra** phản ứng với bari hydroxit [Ba(OH)₂] và kết tủa dưới dạng bari cacbonat (BaCO₃) [xem Công thức (B.2)]. Lượng CO₂ sinh ra được xác định bằng cách chuẩn độ lượng Ba(OH)₂ còn lại với axit clohydric (HCl) [xem Công thức (B.3)].



Hòa tan 4,0 g Ba(OH)₂.8H₂O trong nước khử ion hoặc nước cất và pha loãng đến 1000 mL để thu được dung dịch 0,012 5 mol/L. Nên chuẩn bị một lượng đủ, chẳng hạn như 5 L, mỗi lần khi tiến hành một loạt các thí nghiệm. Lọc bỏ vật liệu rắn và xác định nồng độ chính xác bằng cách chuẩn độ với dung dịch HCl chuẩn. Sử dụng phenolphthalein làm chất chỉ thị hoặc máy chuẩn độ tự động để xác định điểm kết thúc. Bảo quản dung dịch trong suốt trong bình kín để ngăn ngừa sự hấp thụ CO₂ từ không khí.

Pha loãng 50 mL dung dịch HCl 1 mol/L (36,5 g/L) đến 1000 mL bằng nước khử ion hoặc nước cất để thu được dung dịch 0,05 mol/L.

Khi bắt đầu thí nghiệm, cho chính xác 100 mL dung dịch Ba(OH)₂ vào mỗi bình trong ba **bình hấp thụ**. Tùy thuộc vào tính chất và lượng vật liệu thử, điều chỉnh thể tích **bẫy**. Định kỳ lấy bình gần bình thử nhất ra để chuẩn độ. Việc này nên được thực hiện khi cần thiết, ví dụ như khi bình đầu tiên bị đục và trước khi quan sát thấy bất kỳ kết tủa BaCO₃ nào trong bình thứ hai. Khi bắt đầu thí nghiệm, có thể cần chuẩn độ hai ngày một lần và sau đó cứ năm ngày một lần khi đạt đến giai đoạn ổn định. Sau khi lấy **bình hấp thụ** ra, bịt kín ngay lập tức bằng nút để tránh CO₂ xâm nhập từ không khí. Di chuyển hai bình còn lại đến gần bình thử và đặt ở cuối dãy một bình mới chứa đầy dung dịch Ba(OH)₂ mới. Đặc biệt, nếu thời gian thử nghiệm dài hơn, xác định nồng độ chính xác của dung dịch. Xử lý tất cả các bình chứa vật liệu, vật liệu **tham chiếu**, mẫu trắng, kiểm soát ức chế và kiểm tra chất cấy theo cùng một cách.

Ngay sau khi lấy bình ra, chuẩn độ hai hoặc ba phần dung dịch Ba(OH)₂ bằng dung dịch HCl. Ghi lại thể tích dung dịch HCl cần thiết để trung hòa.

Tính khối lượng CO₂ bị bẫy trong **bình hấp thụ** bằng Công thức (B.4):

$$m = \left(\frac{2c_B \times V_B}{C_A} - V_A \times \frac{V_{B_i}}{V_{B_Z}} \right) \times C_A \times 22 \quad (\text{B.4})$$

trong đó

- m là khối lượng CO₂ bị bẫy trong **bình hấp thụ**, tính bằng miligam;
- c_A là nồng độ chính xác của dung dịch HCl, tính bằng mol trên lít;
- c_B là nồng độ chính xác của dung dịch Ba(OH)₂, tính bằng mol trên lít;
- V_{B0} là thể tích dung dịch Ba(OH)₂ khi bắt đầu thí nghiệm, tính bằng mililit;
- V_{Bt} là thể tích dung dịch Ba(OH)₂ tại thời điểm t, trước khi chuẩn độ, tính bằng mililit;
- V_{BZ} là thể tích các phần dung dịch Ba(OH)₂ được sử dụng để chuẩn độ, tính bằng mililit;
- V_A là thể tích dung dịch HCl được sử dụng để chuẩn độ, tính bằng mililit
- 22 là một nửa khối lượng phân tử của CO₂.

Khi các điều kiện sau được áp dụng:

- thể tích dung dịch Ba(OH)₂ trước và sau khi hấp thụ chính xác là 100 mL;

- toàn bộ dung dịch được sử dụng để chuẩn độ ($V_{B0} = V_{Bt} = V_{BZ}$);
- Nồng độ c_B của dung dịch $Ba(OH)_2$ chính xác là 0,0125 mol/L;
- Nồng độ c_A của dung dịch HCl chính xác là 0,05 mol/L;

sử dụng Công thức (B.5)

$$m = 1,1 \times (50 - V_A) \quad (B.5)$$

Phụ lục C

(tham khảo)

Ví dụ về việc xác định cân bằng cacbon

C.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 CO_2 sinh ra hoặc nhu cầu oxy sinh hóa (BOD) thường không đủ để đặc trưng và định lượng quá trình phân hủy sinh học của chúng. Trong quá trình phân hủy sinh học, sinh khối mới được hình thành bởi vi sinh vật và một phần cacbon trong vật liệu thử được chuyển hóa thành sinh khối nhưng không bị oxy hóa sinh hóa. Do đó, các thông số phân tích như lượng CO_2 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 của 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 được 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 sinh ra dưới dạng cacbon dioxit, cacbon được tạo ra dưới dạng sinh khối mới, cacbon chuyển hóa thành các chất chuyển hóa hữu cơ hòa tan trong nước, cacbon được xác định dưới dạng DOC và cacbon còn lại trong vật liệu polymer 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.

C.2 Quy trình thử

Xác định lượng cacbon dioxit sinh ra như mô tả trong 8.4.

Lấy mẫu môi trường đã cấy vi sinh vật tại thời điểm bắt đầu, trước khi thêm vật liệu thử và vào thời điểm kết thúc quá trình ủ. Việc lấy mẫu phải được thực hiện cẩn thận để thu được các mẫu đại diện. Cho các mẫu qua màng lọc hoặc ly tâm chúng ở tốc độ khoảng $40\,000\text{ m.s}^{-2}$.

Đối với mỗi mẫu xác định lượng sinh khối trên màng lọc hoặc trong cặn bằng các phương pháp thích hợp, ví dụ như bằng cách đo protein. Xác định hoặc giả định lượng cacbon trong sinh khối và tính toán lượng tăng cacbon hữu cơ trong sinh khối từ sự chênh lệch đó.

Xác định, theo TCVN 6634 (ISO 8245), lượng DOC trong dịch lọc từ mỗi mẫu và tính toán lượng tăng cacbon hữu cơ. Nếu có thể, 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 còn lại sau khi kết thúc thử nghiệm bằng cách sử dụng toàn bộ mỗi 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 D) hoặc gián tiếp. Trong trường hợp trực tiếp, chiết và cân các polyme còn lại và tính lượng cacbon từ thành phần đã biết của chúng.

Một phương pháp khả thi để xác định gián tiếp là rửa, sấy khô, cân phần cặn và xác định **tổng lượng cacbon hữu cơ** (TOC). Sau đó, trừ lượng cacbon sinh khối (xem ở trên) khỏi TOC để thu được lượng cacbon trong các polyme còn lại. Một cách khác là cân chính xác lượng 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 cặn** dựa trên khối lượng thu được.

C.3 Tính toán cân bằng cacbon

Tính lượng cacbon bị oxy hóa sinh hóa C_{CO_2} (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 nghiệm **sinh ra** CO_2 (xem 9.1.2), sử dụng Công thức (C.1):

$$C_{CO_2} = \frac{C_{MAT} \times D_t}{100} \quad (C.1)$$

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, có xét đến lượng cacbon đo được hoặc ước tính trong sinh khối C_{Bs} và C_{Be} , được đưa ra trong Công thức (C.2):

$$C_{BIO} = C_{Be} - C_{Bs} \quad (C.2)$$

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 C_{Ds} và thời điểm kết thúc C_{De} được đưa ra trong Công thức (C.3):

$$C_{DOC} = C_{De} - C_{Ds} \quad (C.3)$$

Xác định lượng cacbon hữu cơ trong các polyme còn lại sau khi kết thúc thí nghiệm C_{POL} .

Tính giá trị chênh lệch lượng cacbon chuyển hóa dưới dạng phần trăm so với lượng cacbon đưa vào (C_{MAT}) và cộng lại để thu được lượng cacbon tính toán C_{CALC} (%) được đưa ra trong Công thức (C.4):

$$C_{CALC} = C_{CO_2} + C_{BIO} + C_{DOC} + C_{POL} \quad (C.4)$$

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

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_{Bs}	C_{Be}	C_{BIO}	C_{Ds}	C_{De}	C_{DOC}	C_{CO_2}
mg/l	3,2	61,0	57,8	2,0	22,0	20,0	261
% C_{MAT}			17,2			6,0	78

Cân bằng cacbon tính toán: $C_{\text{CALC}} = 78 \% + 17 \% + 6 \% = 101 \% C_{\text{MAT}}$.

Ví dụ này được lấy từ Thư mục tài liệu tham khảo [9].

Phụ lục D

(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 lượng và khối lượng phân tử của polyme còn lại sau khi kết thúc nghiên cứu phân hủy sinh học. Phương pháp sau đây hoặc một 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 trong 10 min đến 20 min để chiết xuất các polyme còn lại. Tách lớp dung môi hữu cơ ra khỏi lớp nước. Thêm dung môi mới và lặp lại quy trình.
- b) Gộp các 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 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 thử có khối lượng phân tử đã biết. Mối quan hệ giữa thời gian lưu và khối lượng phân tử được thu được từ sắc ký đồ thu được. 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).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] 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*
 - [2] TCVN 6489 (ISO 9439), *Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước – Phép thử sự **giải phóng** cacbon dioxit*
 - [3] 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*
 - [4] TCVN 6625 (ISO 11923), *Chất lượng nước – Xác định chất rắn lơ lửng bằng cách lọc qua cái lọc sợi thủy tinh*
 - [5] ISO/TR 15462, *Water quality – Selection of tests for biodegradability*
 - [6] TCVN 9494:2012 (ISO 17556:2012), *Chất dẻo – Xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của vật liệu chất dẻo trong đất bằng cách đo nhu cầu oxy trong hô hấp kế hoặc đo lượng cacbon dioxit sinh ra*
 - [7] ASTM D 3536-91, *Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (GEL Permeation Chromatography – GPC)*
 - [8] Müller R.-J., Augusta J., Pantke M., *An Interlaboratory Investigation into Biodegradation of Plastics; Part 1: A Modified Sturm Test. Material and Organisms.* 1992, **27** (3) pp. 179–189
 - [9] Püchner P., Mueller W.R., Bardtke D., *Assessing the Biodegradation Potential of Polymers in Screening and Long-Term Test Systems.* J. Environ. Polym. Degrad. 1995, **3** pp. 133–143
 - [10] 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
 - [11] Sperandio A., 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
 - [12] Urstadt S., Augusta J., Müller R.-J., Deckwer W.-D., *Calculation of Carbon Balances for the Evaluation of Biodegradability of Polymers.* J. Environ. Polym. Degrad. 1995, **3** (3) pp. 121–131
-