

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13913:2023

ISO 16221:2001

Xuất bản lần 1

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC –
HƯỚNG DẪN XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN HỦY
SINH HỌC TRONG MÔI TRƯỜNG BIỂN**

Water quality –

Guidance for determination of biodegradability in the marine environment

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13913:2023 hoàn toàn tương đương với ISO 16221:2001.

TCVN 13913:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Các tiêu chuẩn về thử nghiệm độ phân hủy sinh học của các chất và nước thải trong môi trường nước đã được ban kỹ thuật ISO/TC 147 xây dựng. Tất cả các phương pháp này đã được tổng hợp trong ISO 15462, có thể chỉ được sử dụng để xác định và dự đoán sự phân hủy sinh học trong nước ngọt. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, ví dụ như các chất đã sử dụng ngoài khơi, nơi thực sự cần thử khả năng phân đã sinh học trong môi trường biển. Tiêu chuẩn này mô tả việc thử nghiệm khả năng phân hủy sinh học trong hệ thống thử nghiệm biển, và việc thử nghiệm này dựa vào hướng dẫn OECD đã được thiết lập và kinh nghiệm đã thu được từ nhóm làm việc tại Ủy ban Oslo và Pari (OSPARCOM) nhóm này đã chọn các phương pháp tiêu chuẩn ISO phù hợp, đáp ứng với các điều kiện biển và đã kiểm tra trong thử nghiệm liên phòng.

Chất lượng nước –

Hướng dẫn xác định khả năng phân hủy sinh học trong môi trường biển

Water quality –

Guidance for determination of biodegradability in the marine environment

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định năm phương pháp xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của các hợp chất hữu cơ trong môi trường biển bởi các vi sinh vật hiếu khí trong các hệ thống thử nghiệm tĩnh nước. Các phương pháp phân hủy tiêu chuẩn đã được xây dựng để thử nghiệm trong nước ngọt được sửa đổi và điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện nước biển. Các phương pháp này bao gồm phép thử đánh giá sự phân hủy cuối cùng của cacbon hữu cơ hòa tan (DOC) TCVN [6621 (ISO 7827)], phép thử chai kín [TCVN 6828 (ISO 10707)], phép thử chai kín hai pha [TCVN 6664 (ISO 10708)], phép thử giải phóng của CO₂ [TCVN 6489 (ISO 9439)] và phép thử khoảng trống CO₂ (ISO 14593).

Các phương pháp này áp dụng cho các hợp chất hữu cơ:

- Tan trong nước ở các điều kiện của phép thử được sử dụng;
- Ít tan trong nước ở dưới các điều kiện của phép thử được sử dụng, trong trường hợp này có thể cần đến các biện pháp đặc biệt để đạt được sự phân tán tốt của hợp chất (ví dụ, xem ISO 10634);
- Dễ bay hơi, với điều kiện là sử dụng phép thử thích hợp với các điều kiện phù hợp;
- Không ức chế vi sinh vật thử nghiệm ở nồng độ đã chọn cho các thử nghiệm. Sự có mặt của các hiệu ứng ức chế có thể được xác định theo quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Các điều kiện được mô tả trong tiêu chuẩn này không phải lúc nào cũng tương ứng với các điều kiện tối ưu để xảy ra mức phân hủy sinh học tối đa. Đối với các phương pháp phân hủy sinh học trong nước ngọt, xem ISO 14593 và ISO 15462, và đối với phân hủy sinh học ở nồng độ thấp, xem ISO 14592.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 6621 (ISO 7827), *Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân hủy sinh học hiếu khí “cuối cùng” của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước – Phương pháp phân tích cacbon hữu cơ hòa tan (DOC)*.

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 giải phóng cacbon đioxit*.

TCVN 6628 (ISO 10707), *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 – Phương pháp phân tích nhu cầu oxy sinh hóa (thử nghiệm bình kín)*.

TCVN 6664 (ISO 10708), *Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân hủy sinh học hiếu khí cuối cùng của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước – Xác định nhu cầu oxy sinh hóa dùng bình thử kín hai pha*.

ISO 14592-1, *Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân hủy sinh học hiếu khí của các hợp chất hữu cơ ở nồng độ thấp – Phần 1: Thử nghiệm lô bình lắc với nước mặt hoặc huyền phù nước mặt/trầm tích (Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake-flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions)*.

ISO 14592-2, *Chất lượng nước – Đánh giá khả năng phân hủy sinh học hiếu khí của các hợp chất hữu cơ ở nồng độ thấp – Phần 2: Mô hình dòng sông chảy liên tục có kèm theo sinh khối (Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 2: Continuous flow river model with attached biomass)*.

ISO 14593, *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 – Phương pháp phân tích cacbon vô cơ trong bình kín (phép thử khoảng trống CO₂) (Water quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO₂ headspace test))*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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)

Sự phân hủy hợp chất bất hòa học hoặc chất hữu cơ bởi vi sinh vật trong sự có mặt của oxy thành cacbon đioxit, nước và muối khoáng của các nguyên tố khác có mặt (khoáng hóa) và thường tạo ra sinh khối mới.

3.2**Phân hủy sinh học sơ bộ (primary biodegradation)**

Sự thay đổi cấu trúc (biến đổi) của một hợp chất hóa học do các vi sinh vật dẫn đến làm mất tính chất cụ thể.

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

Tất cả lượng cacbon có trong chất hữu cơ được hòa tan và tạo được tạo huyền phù trong mẫu nước.

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

Phần cacbon hữu cơ trong mẫu nước không thể tách ra bằng cách tách pha quy định.

CHÚ THÍCH: Các ví dụ về tách pha quy định là ly tâm ở 40000 ms^{-2} trong 15 min hoặc lọc qua màng lọc cỡ lỗ từ $0,2\text{ }\mu\text{m}$ đến $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

3.5**Tổng cacbon vô cơ (total inorganic carbon)****TIC**

Tất cả cacbon có trong mẫu nước có nguồn gốc từ cacbon đioxit và cacbonat.

3.6**Cacbon vô cơ hòa tan (dissolved inorganic carbon)****DIC**

Phần cacbon trong mẫu nước không thể tách ra bằng cách tách pha quy định.

CHÚ THÍCH: Các ví dụ về tách pha quy định là ly tâm ở 40000 ms^{-2} trong 15 min hoặc lọc qua màng lọc cỡ lỗ từ $0,2\text{ }\mu\text{m}$ đến $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

3.7**Nhu cầu oxy hóa học (chemical oxygen demand)****COD**

Nồng độ khối lượng của oxy tương đương với lượng oxy hóa xác định được tiêu thụ bởi hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ khi mẫu nước được xử lý bằng chất oxy hóa đó ở điều kiện xác định.

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp này, COD được tính bằng miligam oxy hấp thụ trên miligam (hoặc gam) hợp chất thử nghiệm.

3.8**Nhu cầu oxy sinh hóa (biochemical oxygen demand)****BOD**

Nồng độ khối lượng oxy hòa tan được tiêu thụ trong các điều kiện xác định bởi quá trình oxy hóa sinh học hiếu khí của hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ trong mẫu nước.

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp này, BOD được tính bằng miligam oxy tiêu thụ trên miligam (hoặc gam) hợp chất thử nghiệm.

3.9

Nhu cầu oxy lý thuyết (theoretical oxygen demand)

ThOD

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

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp này, ThOD được tính bằng miligam oxy hấp thụ trên miligam (hoặc gam) hợp chất thử nghiệm.

3.10

Lượng lý thuyết của cacbon đioxit hình thành (theoretical amount of formed carbon dioxide)

ThCO₂

Lượng cacbon đioxit theo lý thuyết được hình thành sau khi oxy hóa hoàn toàn một hợp chất hóa học, được tính từ công thức phân tử

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp này, ThCO₂ được tính bằng miligam oxy hấp thụ trên miligam (hoặc gam) hợp chất thử nghiệm.

3.11

Lượng cacbon vô cơ lý thuyết (theoretical amount of inorganic carbon)

ThIC

Lượng cacbon vô cơ theo lý thuyết được hình thành sau khi oxy hóa hoàn toàn một hợp chất hóa học, được tính từ công thức phân tử.

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp này, ThIC được tính bằng miligam oxy hấp thụ trên miligam (hoặc gam) hợp chất thử nghiệm.

3.12

Pha trễ (lag phase)

Thời gian tính từ khi bắt đầu thử nghiệm cho đến khi đạt được sự thích nghi 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 đã tăng lên khoảng 10 % phân hủy sinh học.

CHÚ THÍCH: Pha trễ được tính bằng ngày.

3.13

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

Mức phân hủy sinh học của một hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ trong phép thử, trên mức đó không xảy ra sự phân hủy sinh học trong quá trình thử nghiệm.

CHÚ THÍCH: Giá trị này được tính bằng phần trăm.

3.14**Pha phân hủy sinh học (biodegradation phase)**

Thời gian tính từ khi kết thúc pha trễ của phép thử cho đến khi đạt được khoảng 90 % mức phân hủy sinh học tối đa.

CHÚ THÍCH: Pha này được tính bằng ngày.

3.15**Pha ngang bằng (plateau phase)**

Thời gian tính từ khi kết thúc pha phân hủy sinh học cho đến khi kết thúc phép thử.

CHÚ THÍCH: Pha này được tính bằng ngày.

3.16**Tiếp xúc trước (pre-exposure)**

Ủ trước chất cấy với sự có mặt của hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ thử nghiệm, với mục đích tăng khả năng của chất cấy này để phân hủy sinh học vật liệu thử bởi sự thích nghi và/hoặc chọn lọc các vi sinh vật.

3.17**Ổn định trước (preconditioning)**

Ủ trước chất cấy trong các điều kiện của phép thử tiếp theo mà không có hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ thử nghiệm, với mục đích cải thiện hiệu suất của phép thử bằng cách làm cho vi sinh vật thích nghi với các điều kiện thử nghiệm.

4 Nguyên tắc

Tiêu chuẩn này mô tả năm phương pháp xác định khả năng phân hủy sinh học của các hợp chất hữu cơ trong môi trường biển bởi các vi sinh vật hiếu khí sử dụng hệ thống thử tĩnh trong nước. Các phương pháp phân hủy tiêu chuẩn được xây dựng để thử nghiệm trong nước ngọt đã được sửa đổi, điều chỉnh phù hợp và được sử dụng cho mục đích này.

Hỗn hợp thử nghiệm được chuẩn bị có chứa nước biển tự nhiên hoặc nhân tạo, vi khuẩn biển và hợp chất hữu cơ ở nồng độ thích hợp, là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Hỗn hợp thử nghiệm và đối chứng được ủ ở nhiệt độ mong muốn. Quá trình phân hủy sinh học hoàn toàn được thực hiện trong một khoảng thời gian xác định bằng cách đo các thông số tóm tắt như được mô tả trong các phương pháp thử nghiệm cơ bản. Việc phân hủy sinh học dựa trên DOC (cacbon hữu cơ hòa tan) được xác định bằng cách so sánh nồng độ đo được khi bắt đầu và khi kết thúc thử nghiệm như quy định trong [TCVN 6621 (ISO 7827)]. BOD (nhu cầu oxy sinh hóa) được đo và so sánh với nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD) hoặc nhu cầu oxy hóa học (COD) đo được như quy định trong thử nghiệm bình kín [TCVN 6628 (ISO 10707)] và thử nghiệm bình kín hai pha [TCVN 6664 (ISO 10708)]. Cacbon đioxit (CO₂) giải phóng được xác định và so sánh với cacbon đioxit lý thuyết (ThCO₂) sử dụng thử nghiệm giải phóng CO₂ [TCVN 6489 (ISO 9439)] và

TIC (tổng cacbon vô cơ) được xác định và so sánh với cacbon vô cơ lý thuyết (ThIC) theo phép thử khoảng trống CO₂ (ISO 14593).

Nếu có yêu cầu và nếu có phương pháp phân tích cụ thể cho từng chất, có thể thu được thông tin về khả năng phân hủy sơ bộ bằng cách đo sự hao hụt hợp chất thử nghiệm trong quá trình thử nghiệm hoặc sự phân hủy sinh học có thể được xác định ở nồng độ thấp sử dụng các hợp chất thử nghiệm đánh dấu phóng xạ (thường là ¹⁴C) (ISO 14592).

5 Môi trường thử nghiệm

Quá trình ủ phải diễn ra ở nơi tối hoặc trong ánh sáng khuếch tán, ở nhiệt độ mong muốn, thường từ 15 °C đến 25 °C, dao động không quá ± 1 °C trong quá trình thử nghiệm. Trong các trường hợp nghiên cứu để mô phỏng các tình huống môi trường, thì các thử nghiệm có thể được thực hiện ngoài khoảng nhiệt độ này.

6 Thuốc thử

Sử dụng môi trường nước biển tự nhiên (6.2) hoặc nước biển nhân tạo (6.3). Chỉ sử dụng thuốc thử cấp phân tích đã được công nhận.

6.1 Nước, nước cất hoặc nước khử ion, chứa ít hơn 1 mg DOC trên lít.

6.2 Nước biển tự nhiên

6.2.1 Lấy mẫu và xử lý trước

Sử dụng nước biển tự nhiên. Thu lấy mẫu nước vào vật chứa được làm sạch kỹ và vận chuyển đến phòng thử nghiệm, tốt nhất là trong vòng hai ngày. Trong quá trình vận chuyển, không được để nhiệt độ của mẫu vượt quá đáng kể từ 10 °C đến 30 °C.

Cung cấp các thông tin sau:

- Địa điểm và độ sâu nơi nước biển được lấy,
- Tình trạng ô nhiễm và dinh dưỡng của địa điểm lấy mẫu (ví dụ: nồng độ nitrat, amoni và phosphat) và về bên ngoài của mẫu,
- Ngày lấy mẫu và thời gian tính từ khi lấy mẫu đến khi bắt đầu phép thử,
- Nhiệt độ lúc thu mẫu,
- Độ mặn và DOC [ví dụ được xác định bằng TCVN 6634 (ISO 8245)].

Khi nước biển tự nhiên được sử dụng, thông thường sẽ có đủ vi sinh vật và không cần nuôi cấy thêm.

Nên xác định số lượng vi khuẩn dị dưỡng hình thành khuẩn lạc trong nước biển tự nhiên, ví dụ: bằng cách đếm đĩa sử dụng thạch nước biển. Nồng độ vi khuẩn thích hợp trong các bình thử nghiệm ở khoảng

10^5 tế bào/mL. Khi nước biển tự nhiên có mật độ vi khuẩn quá thấp thì nuôi cấy như mô tả đối với nước biển nhân tạo (6.3). Kiểm tra hoạt độ của nước biển tự nhiên bằng hợp chất đối chiếu.

CHÚ THÍCH 1: Thông thường, nước biển tự nhiên và chất cấy không được tiếp xúc (phơi nhiễm) trước với hợp chất thử nghiệm, để cho phép dự đoán chung về phân hủy trong môi trường. Trong một số trường hợp nhất định, tùy thuộc vào mục đích của phép thử, có thể sử dụng chất cấy tiếp xúc trước, điều này phải được nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm (ví dụ: phần trăm phân hủy sinh học = $x\%$, sử dụng chất cấy tiếp xúc trước) và phương pháp tiếp xúc trước được nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm. Chất cấy được phơi nhiễm trước có thể thu được từ các phép thử phân hủy sinh học trong phòng thử nghiệm nước biển được tiến hành trong nhiều điều kiện khác nhau hoặc từ các mẫu được thu thập từ các địa điểm có các điều kiện môi trường phù hợp (ví dụ: các khu vực bị ô nhiễm).

CHÚ THÍCH 2: Số lượng vi khuẩn cho phép thử có thể tăng lên, ví dụ: ly tâm và tái huyền phù trong lượng mẫu nước biển nhỏ hơn.

Có thể xử lý mẫu trước để giảm nồng độ DOC hoặc BOD trong mẫu trắng. Ủ mẫu ở nơi tối hoặc trong ánh sáng khuếch tán ở nhiệt độ thử nghiệm, trong điều kiện hiếu khí tối đa một tuần. Khi chất cấy được thêm vào có chứa quá nhiều DOC (thêm chất thử nghiệm > 10 % cacbon hữu cơ), rửa bằng nước biển nhân tạo (6.3) và ly tâm để loại lượng dư. Tổng hàm lượng cacbon vô cơ (TIC) trong nước biển tự nhiên thường cao; nếu vậy, giảm giá trị này theo ISO 14593. Đo pH của mẫu nước biển. Sục bằng không khí không có CO_2 trong khoảng 1 h trong khi duy trì pH ở 6,5 sử dụng axit clohydric (HCl) đặc. Cuối cùng, khôi phục độ pH về giá trị ban đầu bằng natri hydroxit (NaOH).

Trước khi sử dụng, loại bỏ các hạt thô khỏi nước biển bằng cách lọc sử dụng ví dụ: giấy lọc thô hoặc bằng phương pháp lắng. Để có đủ khả năng đệm và cung cấp chất dinh dưỡng cho dung dịch thử, cần bổ sung chất dinh dưỡng khoáng (6.2.2) môi trường vô cơ thông thường của phép thử phân hủy sinh học tiêu chuẩn, trừ các dung dịch có magiê sunfat và canxi clorua, vì các chất khoáng này thường có đủ nồng độ trong nước biển tự nhiên.

6.2.2 Chất dinh dưỡng khoáng

Đối với 1 000 mL môi trường thử, cho 10 mL dung dịch a) và 1 mL dung dịch b) dưới đây vào khoảng 800 mL nước biển tự nhiên (6.2) và thêm nước biển tự nhiên (6.2) đến 1 000 mL.

6.2.2.1 Dung dịch a)

Hòa tan:

kali dihydrophosphat khan (KH_2PO_4)	8,5 g
dikali hydrophosphat khan (K_2HPO_4)	21,75 g
dinatri hydrophosphat ngậm hai phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33,4 g
amoni clorua (NH_4Cl)	0,5 g
trong nước (6.1) và thêm nước đến	1 000 mL

6.2.2.2 Dung dịch b)

Hòa tan 0,25 g sắt (III) clorua ngậm sáu phân tử nước ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) trong nước (6.1), thêm nước đến 1 000 mL. Chuẩn bị mới dung dịch này trước khi sử dụng hoặc thêm một giọt axit clohydric (HCl) đặc để tránh kết tủa.

6.3 Nước biển nhân tạo

Sử dụng các loại nước biển nhân tạo có sẵn hoặc chuẩn bị dung dịch nước có thành phần sau. Đối với 1 000 mL môi trường thử, cho khoảng 800 mL dung dịch g), 1 mL mỗi dung dịch từ h) đến j) và thêm dung dịch g) đến 1000 mL.

Khi nước biển nhân tạo được sử dụng làm môi trường thử nghiệm, cần phải cấy để có đủ hoạt độ phân hủy sinh học. Sử dụng chất cấy mọi vật liệu có nguồn gốc từ biển, ví dụ: nước biển đã lọc, huyền phù trầm tích biển, vi khuẩn từ các bộ lọc của bể cá biển. Lấy chất cấy thích hợp và cho vào nước biển nhân tạo để thu được đủ nồng độ vi khuẩn trong phép thử (xem 6.2.1). Kiểm tra hoạt tính của nước biển nhân tạo đã cấy bằng hợp chất đối chứng. Đối với mọi yêu cầu giảm DOC trong chất cấy và thích nghi trước, xem 6.2.1.

6.3.1 Dung dịch a)

Hòa tan:

natri clorua (NaCl)	47,8 g
natri sunfat (Na_2SO_4)	8,0 g
kali clorua (KCl)	1,4 g
natri hydrocacbonat (NaHCO_3)	0,04 g
kali bromua (KBr)	0,2 g
axit boric (H_3BO_3)	0,06 g
natri florua (NaF)	0,006 g
trong nước (6.1) và thêm nước đến	1 000 mL

6.3.2 Dung dịch b)

Hòa tan 203,3 g magie sunfat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) trong nước (6.1), thêm nước (6.1) đến 1 000 mL.

6.3.3 Dung dịch c)

Hòa tan 147 g canxi clorua ngậm hai phân tử nước ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) trong nước (6.1), thêm nước (6.1) đến 1 000 mL.

6.3.4 Dung dịch d)

Hòa tan 26,61 g stronti clorua ngậm sáu phân tử nước ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) trong nước (6.1), thêm nước (6.1) đến 1 000 mL.

6.3.5 Dung dịch e)

Hòa tan 136,1 g dikali hydrophosphat (K_2HPO_4) khan trong nước (6.1), thêm nước (6.1) đến 1000 mL.

6.3.6 Dung dịch f)

Hòa tan 26,74 g amoni clorua (NH_4Cl) trong nước (6.1), thêm nước (6.1) đến 1 000 mL.

6.3.7 Dung dịch g)

Để thu được dung dịch g), trộn 500 mL dung dịch a), 53,3 mL dung dịch b), 10,3 mL dung dịch c), 0,9 mL dung dịch d), 1,25 mL dung dịch e) và 1 mL dung dịch f) và thêm nước (6.1) đến 1000 mL. Dung dịch g) có độ mặn khoảng 35 %.

6.3.8 Dung dịch h)

Hòa tan 15 mg chất chiết nấm men trong 100 mL nước (6.1) ngay trước khi sử dụng.

6.3.9 Dung dịch i)

Hòa tan:

mangan sunfat ngậm một phân tử nước ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	60,46 mg
kẽm sunfat ngậm bảy phân tử nước ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	85,6 mg
amoni molybdat ngậm bốn phân tử nước ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	73,7 mg
trong nước (6.1), thêm nước đến	1 000 mL

6.3.10 Dung dịch j)

Hòa tan 89 mg sắt (III) clorua ngậm sáu phân tử nước ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) trong nước (6.1), thêm nước đến 1000 mL. Chuẩn bị mới dung dịch này trước khi sử dụng hoặc thêm một giọt axit clohydric đặc (HCl) để tránh kết tủa.

6.4 Dung dịch thử nghiệm**6.4.1 Hợp chất thử nghiệm**

Chuẩn bị dung dịch gốc của hợp chất thử nghiệm hòa tan đủ trong nước (6.1) và cho một lượng thích hợp dung dịch này vào các bình thử nghiệm để thu được nồng độ cuối cùng của hợp chất thử nghiệm như trong các phương pháp chuẩn cơ bản. Thêm trực tiếp các hợp chất dễ bay hơi hoặc các hợp chất có độ hòa tan trong nước thấp vào bình thử nghiệm theo phương pháp phù hợp cho mục đích này (xem Bảng 2). Xác định chính xác lượng được thêm vào.

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

6.4.2 Hợp chất đối chiếu

Sử dụng để làm hợp chất đối chiếu là hợp chất hữu cơ có khả năng phân hủy sinh học đã biết, như anilin hoặc natri benzoat, có mức phân hủy > 60 % đối với BOD và CO₂, > 70 % đối với DOC và 80 % đối với các phân tích chất cụ thể và dự kiến có đường phân hủy sinh học điển hình. Chuẩn bị dung dịch gốc của hợp chất đối chiếu trong nước (6.1) theo cách tương tự như đối với hợp chất thử nghiệm hòa tan trong nước (6.4.1), để thu được nồng độ cuối cùng của hợp chất đối chiếu như được chỉ ra trong các phương pháp chuẩn cơ bản.

6.4.3 Dung dịch kiểm tra ức chế

Nếu cần (ví dụ: khi không có sẵn thông tin về độc tính của hợp chất thử nghiệm), thì chuẩn bị dung dịch trong nước (6.1) có chứa cả hợp chất thử nghiệm (6.4.1) và hợp chất đối chiếu (6.4.2) với lượng thích hợp để thu được cùng nồng độ dự kiến có trong phép thử.

7 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị như được nêu trong các phương pháp tiêu chuẩn cơ bản.

Xin lưu ý rằng độ mặn và nhiệt độ sẽ ảnh hưởng đến phép đo oxy trong nước biển. Chỉ sử dụng thiết bị đo oxy mà kết quả có thể được điều chỉnh theo độ mặn.

8 Quy trình thử nghiệm

Chuẩn bị đủ số lượng bình thử nghiệm như được mô tả trong các phương pháp tiêu chuẩn cơ bản để có:

- Ít nhất hai bình thử (ký hiệu F_T) cho hợp chất thử nghiệm (6.4.1) trong môi trường thử đã có chất cấy (6.2 hoặc 6.3);
- Ít nhất hai bình mẫu trắng (ký hiệu F_B) chỉ chứa môi trường thử nghiệm đã cấy (6.2 hoặc 6.3);
- Ít nhất một bình, để kiểm tra quy trình (ký hiệu F_C) chứa hợp chất đối chiếu (6.4.2) và môi trường thử đã cấy (6.2 hoặc 6.3);
- Nếu cần, ít nhất một bình để kiểm tra ảnh hưởng ức chế có thể có của hợp chất thử nghiệm (ký hiệu F_I) chứa dung dịch (6.4.3) và môi trường thử đã cấy (6.2 hoặc 6.3);
- Nếu cần, ít nhất một bình để kiểm tra sự loại bỏ quá trình phi sinh học có thể xảy ra (ký hiệu F_S) chứa hợp chất thử nghiệm (6.4.1) và môi trường thử chưa cấy (6.2 hoặc 6.3). Không thêm chất cấy và khử trùng bằng cách bổ sung hợp chất độc vô cơ phù hợp để ngăn hoạt động của vi sinh vật. Sử dụng, ví dụ, 1 mL trên lít dung dịch chứa 10 g/L thủy ngân (II) clorua (HgCl₂). Sau khi thử nghiệm bắt đầu hai tuần, thêm tiếp cùng một lượng chất độc.

CHÚ THÍCH 1: Thủy ngân clorua là hợp chất vô cơ độc phù hợp với các thử nghiệm phân hủy sinh học. Do thủy ngân clorua chỉ được sử dụng với một lượng rất nhỏ nên không có nguy cơ gây hại cho môi trường

CHÚ THÍCH 2: Để thu được đường phân hủy sinh học, cần chuẩn bị đủ bình cho các phương pháp mà chỉ có thể thực hiện các phép xác định đơn lẻ và các bình phải được sử dụng cho các phép đo [TCVN 6628 (ISO 10707) và ISO 14593]. Số lượng bình thử nghiệm phụ thuộc trực tiếp vào số lượng phép đo mong muốn.

Bổ sung các lượng thích hợp của môi trường thử nghiệm (6.2 hoặc 6.3), các hợp chất thử nghiệm (6.4.1) và hợp chất đối chiếu (6.4.2) vào các bình tương ứng theo Bảng 1 để thu được nồng độ thử mong muốn và thể tích thử cuối cùng như nêu trong các tiêu chuẩn phương pháp cơ bản (Bảng 2).

Bảng 1 – Phân phối cuối cùng của các hợp chất thử nghiệm và đối chiếu

Bình	Môi trường thử nghiệm	Hợp chất thử nghiệm	Hợp chất đối chiếu	Chất cấy
F _T Hợp chất thử nghiệm	+	+	–	+
F _T Hợp chất thử nghiệm	+	+	–	+
F _B Mẫu trắng	+	–	–	+
F _B Mẫu trắng	+	–	–	+
F _C Kiểm tra chất cấy	+	–	+	+
F _I Kiểm chứng ức chế (tùy chọn)	+	+	+	+
F _S Kiểm tra loại bỏ quá trình phi sinh học (tùy chọn)	+	+	–	–

Bảng 2 – Quy định kỹ thuật của thử nghiệm

Tiêu chuẩn phương pháp cơ bản	Nồng độ hợp chất thử nghiệm mg/L	Thông số phân tích	Thời gian thử nghiệm ngày	Sự phù hợp với các hợp chất ít tan trong nước	Sự phù hợp với hợp chất dễ bay hơi
TCVN 6621 (ISO 7827)	5 đến 40 (DOC)	DOC	60	không	không
TCVN 6628 (ISO 10707)	2 đến 10 (chất)	BOD	60	có	có
TCVN 6664 (ISO 10708)	100 (ThOD)	BOD	60	có	không
TCVN 6489 (ISO 9439)	20 (TOC)	CO ₂	60	có	không
ISO 14593	20 đến 40 (TOC)	TIC	60	có	có

CHÚ THÍCH 3: Việc loại bỏ DOC có thể do phân hủy sinh học nhưng còn do các quá trình phi sinh học như hấp phụ lên chất cấy hoặc lên thành bình hoặc tách và hấp phụ trên ống trong trường hợp các hợp chất thử dễ bay hơi và do đó không phải trong trường hợp nào cũng là bằng chứng rõ ràng của sự phân hủy sinh học.

Đo độ pH và chỉnh đến giá trị từ 7 đến 8, nếu cần. Sử dụng độ pH đã cho trong trường hợp nước biển tự nhiên. Đặt tất cả các bình thử vào nồi cách thủy hoặc phòng có nhiệt độ không đổi, để nhiệt độ bình đạt đến nhiệt độ mong muốn (xem Điều 5), đậy kín bình và bắt đầu ủ. Lấy các thông số đo được như đã nêu trong các tiêu chuẩn cơ bản (xem Bảng 2). Đo các thông số phân tích tại thời điểm đầu (thời điểm 0), thời điểm kết thúc (thời điểm *t*) của pha thử nghiệm và tại các thời điểm gian thích hợp để thu được đường phân hủy sinh học. Khi theo dõi sự phân hủy sơ bộ, thì xác định nồng độ của hợp chất thử nghiệm bằng

phép phân tích cụ thể trong bình F_T và F_s khi kết thúc phép thử (thời điểm t). Trong trường hợp sử dụng phép thử riêng rẽ các chất đánh dấu phóng xạ, cần có các kỹ thuật đánh giá (xem ví dụ: ISO 14592).

Nếu thu được mức phân hủy sinh học gần như không đổi (pha ngang bằng) và dự kiến không có sự phân hủy sinh học tiếp thì phép thử được coi là hoàn thành. Các điều kiện thử nghiệm của môi trường biển thường ít thuận lợi hơn so với điều kiện thử nghiệm của các hệ thống thử nghiệm bùn ao. Do đó, thời gian thử nghiệm cần được kéo dài so với thời gian thông thường là 28 ngày trong các thử nghiệm lô thủy sinh. Thời gian thử nghiệm tối đa là 60 ngày. Vào ngày thử nghiệm cuối, cần thực hiện tất cả các công việc cần thiết như trong các tiêu chuẩn cơ bản. Nếu hợp chất thử nghiệm có chứa nitơ, xác định nồng độ cuối cùng của nitrat và nitrit trong trường hợp đo BOD và xem xét mọi quá trình nitrat hóa như được nêu trong các phương pháp cơ bản.

9 Tính và biểu thị kết quả

Biểu thị các giá trị đo được và tính toán sự phân hủy sinh học cuối cùng và phân hủy sinh học ban đầu (tùy chọn) của hợp chất thử nghiệm nêu trong các tiêu chuẩn cơ bản tương ứng.

Lập bảng các giá trị đo được và tỷ lệ phần trăm phân hủy sinh học cho từng khoảng thời gian đo và từng bình thử nghiệm. Dựng đồ thị đường phân hủy sinh học, tính bằng phần trăm, theo thời gian. Nếu các kết quả thu được đối với các bình thử nghiệm lặp lại hai lần F_T (chênh lệch < 20 %) thì dựng đường trung bình, nếu không thì dựng các đường cho từng bình. Một số thông số có thể được xác định và biểu thị từ đường đồ thị này, đặc biệt (nếu có đủ dữ liệu) thời gian trễ, thời gian phân hủy và mức phân hủy tối đa.

Xác định giá trị trung bình của phần trăm phân hủy sinh học trong pha ngang bằng hoặc sử dụng giá trị cao nhất, ví dụ: khi đường đồ thị bắt đầu giảm từ pha pha ngang bằng và biểu thị mức phân hủy sinh học tối đa này là "mức phân hủy sinh học của hợp chất thử nghiệm" trong báo cáo thử nghiệm.

Nếu sử dụng việc loại bỏ DOC để xác định quá trình phân hủy sinh học, thì lưu ý rằng sự loại bỏ DOC này ra khỏi nước là phép đo ban đầu. Nếu chất thử nghiệm không được loại ra đáng kể về mặt phi sinh học (ví dụ: bằng cách hấp phụ hoặc loại bỏ vào không khí) và đường đồ thị loại bỏ có hình dạng điển hình, với các pha trễ, pha phân hủy và pha ngang bằng, hoặc nếu có thêm thông tin về khả năng phân hủy sinh học, ví dụ: từ các thử nghiệm trong môi trường bùn ao có sẵn, thì coi việc loại bỏ DOC đo được là do phân hủy sinh học.

Theo cách tương tự, tính toán mức phân hủy sinh học của hợp chất đối chiếu, F_c và nếu có, F_s của kiểm tra loại bỏ phi sinh học và kiểm soát ức chế F_i và dựng các đường đồ thị.

Thông tin về độc tính của hợp chất thử nghiệm có thể hữu ích trong việc diễn giải các kết quả thử nghiệm cho thấy mức phân hủy sinh học thấp. Nếu trong bình F_i phần trăm phân hủy < 25 % và quan sát thấy sự phân hủy không đủ của hợp chất thử nghiệm trong bình F_T , thì có thể giả định rằng hợp chất thử nghiệm bị ức chế. Trong trường hợp này, phép thử phải được lặp lại sử dụng nồng độ thử thấp hơn hoặc chất cấy khác. Nếu trong bình F_s (kiểm tra loại bỏ phi sinh học nếu có), quan sát thấy một lượng đáng kể (> 10 %) DOC, CO_2 hoặc BOD, thì quá trình loại bỏ phi sinh học có thể đã xảy ra.

10 Hiệu lực của kết quả

Phép thử được coi là hợp lệ nếu phần trăm phân hủy trong bình Fc (kiểm tra chất cầy) lớn hơn 60 % (trong trường hợp đo DOC là 70 %) vào ngày thứ 14.

11 Kết quả thử nghiệm liên phòng

Các phương pháp được sử dụng trong tiêu chuẩn này, trừ phép thử loại bỏ DOC, đã được kiểm tra trong phép thử liên phòng do OSPARCOM tổ chức. Các kết quả được công bố trong tài liệu tham khảo [1] (xem Thư mục tài liệu tham khảo).

Bảng 3 – Kết quả của thử nghiệm vòng OSPARCOM

Hợp chất thử	Phân hủy sinh học >60 % sau 28 ngày % của kết quả	Phân hủy sinh học >60 % sau 60 ngày % của kết quả	Thời gian trễ trung bình Ngày	Thời gian trung bình để đạt được 50 % phân hủy sinh học tối đa Ngày
Kali benzoat	A:100 B:100 C:91 D:100	A:100 B:100 C:100 D:100	A:1,6 B:0,9 C:2,1 D:2,4	A: 2,1 B: 2,9 C: 4,6 D:2,6
Anco Green B	A:60 B:92 C:75 D:71	A:80 B:100 C:83 D:85	A:2,4 B:1,3 C:3,0 D:2,1	A: 3,9 B: 2,5 C: 5,9 D: 6,1
Aquamul BII	A:0 B:0 C:0 D:0	A:0 B:0 C:0 D:0	A-D đến 60	–
Pentaerythritol	A:0 B:0 C:0 D:0	A:0 B:36 C:18 D:14	A: >60 B: 21-60 C:28-60 D:14-60	–
CHÚ THÍCH A: TCVN 6489 (ISO 9439) B: TCVN 6628 (ISO 10707) C: TCVN 6664 (ISO 10708) D: ISO 14593; Aquamull BII và Anco Green B là các dung dịch khoan.				

Các kết luận trong báo cáo của OSPARCOM là cả bốn phương pháp đều phù hợp để thử nghiệm khả năng phân hủy sinh học nước biển, cho các kết quả có thể so sánh được, nhưng mỗi phương pháp đều có những ưu và nhược điểm riêng. Sự lựa chọn phụ thuộc vào thiết bị của phòng thử nghiệm và các thông số hợp chất cụ thể.

Phép thử loại bỏ DOC [TCVN 6621 (ISO 7827)] và phép thử bình kín [TCVN 6628 (ISO 10707)] đã được áp dụng làm Hướng dẫn 306 của OECD. Các phương pháp này đã được kiểm tra trong các thử nghiệm liên phòng do Ủy ban Châu Âu tổ chức và là những phương pháp thử nghiệm đã biết và thường đã được chấp nhận.

12 Báo cáo thử nghiệm

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

- Viện dẫn tiêu chuẩn này và các tiêu chuẩn cơ bản được sử dụng;
- Tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết hợp chất thử nghiệm;
- Tất cả các dữ liệu được đo và tính toán (ví dụ ở dạng bảng) thu được và đường cong phân hủy;

TCVN 13913:2023

- d) Nồng độ của hợp chất thử nghiệm và chất đối chiếu được sử dụng;
- e) Tên của hợp chất chuẩn được sử dụng và sự phân hủy thu được với hợp chất này;
- f) Nguồn và đặc điểm của nước biển và thông tin về các xử lý sơ bộ;
- g) Nhiệt độ ủ của phép thử;
- h) Nếu có, thông tin về tách phi sinh học và ức chế và tuyên bố về độc tính của hợp chất thử nghiệm;
- i) Các lý do trong trường hợp loại bỏ phép thử;
- j) Mọi thay đổi đối với quy trình chuẩn hoặc các trường hợp khác có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] *Biodegradability of chemical substances in seawater* – Results of the four OSPARCOM ring tests – Final report November 1996. Available from ELF Akvamiljo Mekjarvik 12, N-4070 Randaberg.
 - [2] TCVN 6491 (ISO 6060), *Chất lượng nước – Xác định nhu cầu oxy hóa học*.
 - [3] TCVN 6634 (ISO 8245), *Chất lượng nước – hướng dẫn xác định cacbon hữu cơ tổng số (TOC) và cacbon hữu cơ hòa tan (DOC)*.
 - [4] TCVN 6948 (ISO 10634), *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*.
 - [5] ISO/TR 15462, *Water quality – Selection of tests for biodegradability*.
 - [6] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (1993) – 306, *Biodegradability in Seawater*. Available from the Organization for Economic Cooperation and Development, 2, rue André Pascal, F-75775 Paris Cedex 16.
-