

TCVN 9494: 2012

ISO 17556:2005

Xuất bản lần 1

CHẤT DẸO –

**XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN HỦY SINH HỌC HIẾU KHÍ HOÀN
TOÀN CỦA VẬT LIỆU CHẤT DẸO TRONG ĐẤT BẰNG CÁCH
ĐO NHU CẦU OXY TRONG HỒ HẤP KẾ (RESPIROMETER)
HOẶC ĐO LƯỜNG CACBON DIOXIT SINH RA**

*Plastics – Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials
in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount
of carbon dioxide evolved*

Lời nói đầu

TCVN 9494:2012 hoàn toàn tương đương với ISO 17556:2012.

TCVN 9494:2012 do Tiểu Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC61/SC11 Sản phẩm bằng chất dẻo biên soạn. Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Một số vật liệu và sản phẩm bằng chất dẻo được thiết kế và sản xuất để sử dụng ở trên mặt đất hoặc ở trong đất. Các sản phẩm này đã được nghiên cứu cho các ứng dụng mà khả năng phân hủy sinh học đem lại lợi ích từ khía cạnh kỹ thuật, môi trường, xã hội hoặc kinh tế. Ví dụ về các sản phẩm này gồm sản phẩm dùng trong nông nghiệp (các màng phủ cây), dùng trong trồng trọt (các dây buộc và các kẹp, chậu hoa, thùng), các chi tiết dùng trong tang lễ (túi đựng xác), dùng trong các hoạt động giải trí (ví dụ các đĩa bằng nhựa ném lên để tập bắn, các hộp sử dụng khi săn bắn) v.v... Trong nhiều trường hợp, việc thu gom và/hoặc tái chế các sản phẩm nhựa này hoặc là khó khăn hoặc là không kinh tế. Nhiều loại chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học đã được nghiên cứu sản xuất để có thể phân hủy sinh học và biến mất khi kết thúc vòng đời của chúng. Đã có một số tiêu chuẩn quốc tế quy định phương pháp thử để xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoặc kỵ khí hoàn toàn của vật liệu chất dẻo trong môi trường chất lỏng hoặc môi trường compost. Khi tính đến việc sử dụng và thải bỏ các chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học, điều quan trọng là phải xây dựng được phương pháp thử để xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của các chất dẻo đó ở trong đất.

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 (respirometer) hoặc đo lượng cacbon dioxide sinh ra

Plastics – Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved

CẢNH BÁO Cần có các biện pháp để phòng thích hợp khi xử lý đất do trong đất có thể tồn tại các sinh vật hoặc vi khuẩn gây bệnh. Nên cẩn thận với các chất thử độc hại và các chất chưa biết tính chất.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của vật liệu chất dẻo ở trong đất bằng cách đo nhu cầu oxy trong hô hấp kế kín hoặc đo lượng cacbon dioxide sinh ra. Phương pháp này được dùng để thiết lập mức độ phân hủy sinh học tối ưu bằng cách điều chỉnh độ ẩm của đất thử.

Nếu sử dụng đất chưa được thích ứng trước làm vật liệu cấy thì phép thử được sử dụng để mô phỏng quá trình phân hủy sinh học xảy ra trong môi trường tự nhiên; nếu sử dụng đất đã được ủ trước làm vật liệu cấy thì phương pháp này có thể được sử dụng cho mục đích nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vật liệu thử.

Phương pháp này áp dụng cho các vật liệu sau:

- Polyme tổng hợp và/hoặc tự nhiên, polyme đồng trùng hợp hoặc hỗn hợp của chúng;
- Vật liệu chất dẻo có các phụ gia như chất hóa dẻo hoặc chất màu;
- Polyme tan được trong nước;

Không áp dụng tiêu chuẩn này đối với các vật liệu mà trong các điều kiện của phép thử ức chế hoạt động của vi sinh vật trong đất. Tác động ức chế có thể xác định được bằng cách sử dụng phương pháp kiểm soát ức chế hay một phương pháp khác phù hợp. Nếu vật liệu thử ức chế vi sinh vật trong đất thì có thể sử dụng nồng độ vật liệu thử thấp hơn, sử dụng loại đất khác hoặc sử dụng đất đã được ủ trước.

TCVN 9494:2012

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 5979 (ISO 10390), *Chất lượng đất – Xác định pH*.

TCVN 6642 (ISO 10694), *Chất lượng đất – Xác định hàm lượng cacbon hữu cơ và cacbon tổng số sau khi đốt khô (phân tích nguyên tố)*.

TCVN 6651 (ISO 11274), *Chất lượng đất – Xác định đặc tính giữ nước – Phương pháp trong phòng thí nghiệm*.

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*.

TCVN 7538-6 (ISO 10381-6), *Chất lượng đất – Lấy mẫu – Phần 6: Hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất ở điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt động, sinh khối và tính đa dạng của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm*.

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 các nguyên tố bất kỳ có mặt (quá trình khoáng hóa) cộng với sinh khối mới.

3.2

Nhu cầu oxy sinh hóa (biochemical oxygen demand)

BOD

Nồng độ khối lượng oxy hòa tan bị 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.

CHÚ THÍCH Giá trị này biểu thị bằng miligam oxy tiêu thụ trên miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.3

Cacbon hữu cơ hòa tan (dissolved organic carbon)

DOC

Phần cacbon hữu cơ trong nước không thể loại bỏ được bởi quá trình phân tách pha nhất định.

CHÚ THÍCH 1 Giá trị này biểu thị bằng miligam cacbon trên 100 miligam hợp chất thử.

CHÚ THÍCH 2 Phương pháp đặc trưng để phân tách là ly tâm với gia tốc 40.000 m.s⁻² trong 15 min hoặc bằng phương pháp màng lọc có đường kính lỗ từ 0,2 µm đến 0,45 µm.

3.4

Nhu cầu oxy lý thuyết (theoretical oxygen demand)

ThOD

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

CHÚ THÍCH Giá trị này biểu thị bằng miligam oxy hấp thụ trên miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.5

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

ThCO₂

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

CHÚ THÍCH Giá trị này biểu thị bằng miligam cacbon dioxit sinh ra trên miligam hoặc gam hợp chất thử.

3.6

Giai đoạn thích ứng (lag phase)

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

3.7

Giai đoạn phân hủy sinh học (biodegradation phase)

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

3.8

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 phép thử mà sau đó không có sự phân hủy sinh học nào tiếp tục diễn ra nữa.

3.9

Giai đoạn ổn định (plateau phase)

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

CHÚ THÍCH Giá trị này được tính bằng ngày.

3.10

Điều hòa sơ bộ (pre-conditioning)

Quá trình ủ trước đất trong các điều kiện của phép thử tiếp theo nhưng không có mặt của hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ cần thử để nâng cao tính năng của phép thử thông qua sự thích nghi của vi sinh vật với các điều kiện của phép thử.

TCVN 9494:2012

3.11

Ủ trước (pre-exposure)

Quá trình ủ đất trước với hợp chất hóa học hoặc chất hữu cơ cần thử để tăng khả năng phân hủy sinh học vật liệu thử của đất thông qua sự thích nghi và/hoặc chọn lọc vi sinh vật.

3.12

Hàm lượng nước (water content)

Khối lượng nước bay hơi từ đất khi đất được sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 105 °C chia cho khối lượng đất khô.

CHÚ THÍCH Giá trị này thường là tỷ lệ giữa khối lượng của nước và khối lượng của các hạt đất trong một mẫu đất.

3.13

Tổng khả năng giữ nước (total water-holding capacity)

Khối lượng nước bay hơi từ đất đã bão hòa nước khi đất được sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 105 °C chia cho khối lượng đất khô.

3.14

Cacbon hữu cơ tổng số (total organic carbon)

TOC

Lượng cacbon liên kết có trong một hợp chất hữu cơ.

CHÚ THÍCH Giá trị này biểu thị bằng miligam cacbon trên 100 miligam hợp chất.

4 Nguyên tắc

Phương pháp này được dùng để thiết lập tốc độ phân hủy sinh học tối ưu của vật liệu chất dẻo trong đất thử bằng cách kiểm soát độ ẩm của đất và để xác định khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn của vật liệu đó.

Vật liệu chất dẻo vốn là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất được trộn với đất. Hỗn hợp này được cho vào trong một bình thử trong một khoảng thời gian, khi đó lượng oxy tiêu thụ (BOD) hay lượng cacbon dioxit sinh ra được xác định. Miễn là lượng CO₂ sinh ra được hấp thụ thì lượng BOD có thể xác định được bằng cách đo lượng oxy cần thiết để duy trì một thể tích khí không đổi trong bình của hô hấp kế hoặc bằng cách đo tự động hoặc thủ công sự thay đổi thể tích hoặc áp suất (hoặc kết hợp cả hai). Ví dụ về hô hấp kế thích hợp được trình bày trong Phụ lục A. Đo định kỳ lượng cacbon dioxit sinh ra, dựa vào động lực học quá trình phân hủy sinh học của chất thử bằng cách đưa không khí không có cacbon dioxit đi qua đất và sau đó xác định hàm lượng cacbon dioxit có trong không khí bằng phương pháp phù hợp. Ví dụ về các phương pháp phù hợp được nêu tại Phụ lục B và Phụ lục C.

Mức độ phân hủy sinh học, biểu thị bằng phần trăm, được xác định bằng cách so sánh BOD với nhu cầu oxy lý thuyết (ThOD) hoặc bằng cách so sánh lượng cacbon dioxit sinh ra với lượng cacbon dioxit sinh ra theo lý thuyết (ThCO₂). Phải tính tới ảnh hưởng của quá trình nitrat hóa lượng BOD. Phép thử kết thúc khi đạt được mức độ phân hủy sinh học không đổi hoặc chậm nhất là sau sáu tháng.

Không giống như TCVN 6858 (ISO 11266), được sử dụng để đánh giá cho nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau, tiêu chuẩn này được dùng riêng để xác định khả năng phân hủy sinh học của các vật liệu chất dẻo.

5 Môi trường thử

Quá trình ủ phải diễn ra trong bóng tối hoặc trong ánh sáng khuếch tán trong một không gian kín không có khí độc hại đối với các vi sinh vật và được duy trì ở một nhiệt độ ổn định trong khoảng $\pm 2^{\circ}\text{C}$ giữa 20°C và 28°C , ưu tiên sử dụng nhiệt độ 25°C .

6 Vật liệu

6.1 Nước cất có hàm lượng DOC nhỏ hơn 2 mg/l.

6.2 Chất hấp thụ cacbon dioxit, thường là các viên natri cacbonat.

7 Thiết bị, dụng cụ

Tất cả các dụng cụ thủy tinh phải được rửa sạch và đặc biệt không có chất hữu cơ và chất độc hại.

7.1 Hô hấp kế kín, gồm các bình thử và tất cả các thiết bị cần thiết khác, được đặt trong một không gian kín có nhiệt độ không đổi hoặc trong một thiết bị, dụng cụ ổn nhiệt (như bếp cách thủy). Ví dụ xem tại Phụ lục A.

Bất kỳ hô hấp kế nào có thể xác định được nhu cầu oxy sinh hóa với độ chính xác thích hợp đều phù hợp, ưu tiên các thiết bị tự động bổ sung oxy đã tiêu thụ sẽ không làm thiếu hụt oxy và không xảy ra sự ức chế hoạt động của vi sinh vật trong suốt quá trình phân hủy.

7.2 Dụng cụ xác định lượng cacbon dioxit sinh ra

7.2.1 Bình thử, bình thủy tinh (ví dụ bình tam giác hoặc chai) được lắp khít với ống không thấm cacbon dioxit để có thể làm sạch bằng khí và được đặt trong một không gian kín có nhiệt độ không đổi hoặc trong một thiết bị ổn nhiệt (ví dụ bếp cách thủy).

7.2.2 Hệ thống sản xuất không khí không có CO_2 , có khả năng cung cấp không khí không có CO_2 ở tốc độ vài ml/min vào từng bình thử, và giữ ổn định trong khoảng $\pm 10\%$ (xem ví dụ hệ thống bao gồm các ống thử trong Phụ lục B). Ngoài ra, có thể sử dụng thiết bị ủ như nêu tại ASTM D 5988.

7.2.3 Thiết bị phân tích để xác định chính xác lượng cacbon dioxit, Thiết bị điển hình là máy phân tích hồng ngoại cacbon dioxit, thiết bị phân tích cacbon vô cơ hòa tan (DIC), thiết bị xác định bằng cách chuẩn độ sau khi hấp thụ hoàn toàn trong một dung dịch kiềm (xem Phụ lục C) và thiết bị phân tích trọng lượng cacbon dioxit theo TCVN 9493-2 (ISO 14855-2).

7.3 Cân phân tích.

7.4 Dụng cụ đo pH.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị vật liệu thử

Vật liệu thử phải là vật liệu đã biết trước khối lượng và chứa lượng cacbon đủ để tạo một lượng BOD hoặc một lượng cacbon dioxit đủ để có thể xác định chính xác bằng các thiết bị phân tích được sử dụng. Tính lượng TOC từ công thức hóa học hoặc xác định bằng kỹ thuật phân tích phù hợp (ví dụ như phân tích nguyên tố hoặc xác định theo TCVN 6634 (ISO 8245) và tính lượng ThOD hoặc ThCO₂ (xem Phụ lục C và Phụ lục D).

CHÚ THÍCH Mặc dù phương pháp phân tích nguyên tố đối với các chất có khối lượng phân tử lớn nhìn chung kém chính xác hơn là đối với các chất có khối lượng phân tử nhỏ nhưng có thể chấp nhận độ chính xác này đối với mục đích tính toán lượng ThOD hoặc ThCO₂.

Lượng vật liệu thử phải đủ để có thể bỏ qua các sai lệch do sự tiêu thụ oxy cơ bản hoặc do lượng cacbon dioxit sinh ra từ đất thử: thường thì từ 100 mg đến 300 mg vật liệu thử trộn với 100 g đến 300 g đất là đủ. Lượng vật liệu thử tối đa bị giới hạn bởi nguồn cung cấp oxy cho hệ thống thử. Nên sử dụng 200 mg vật liệu thử với 200 g đất trừ khi đất có chứa một lượng chất hữu cơ cực lớn.

Khi sử dụng hệ thống thử trên cơ sở xác định lượng cacbon dioxit sinh ra thì có thể sử dụng lượng vật liệu thử lớn hơn (ví dụ 2 500 mg với 200 g đất) để tăng sự chênh lệch giữa khả năng sản sinh CO₂ của vật liệu thử với mẫu trắng. Hơn nữa, cần phải sử dụng lượng vật liệu thử lớn hơn nếu tiến hành xác định cân bằng khối lượng cuối (xem Phụ lục E).

Nên tiến hành để thoát khí sơ bộ vật liệu thử hoặc bổ sung vật liệu trơ vào khi cần để giảm ảnh hưởng lên sự trao đổi khí của đất trong các bình thử chứa mẫu trắng.

Nên ưu tiên sử dụng vật liệu thử ở dạng bột nhưng cũng có thể sử dụng vật liệu dạng màng, mảnh nhỏ hay các hạt định hình.

Có thể giảm kích cỡ của mẫu thử bằng cách nghiền ở nhiệt độ thấp.

Thực nghiệm đã chứng minh rằng mức độ phân hủy sinh học hoàn toàn gần như không phụ thuộc vào thể loại và hình dạng của vật liệu thử. Tuy nhiên, tốc độ phân hủy sinh học lại phụ thuộc vào thể loại và hình dạng của vật liệu. Do đó, nếu để so sánh các loại vật liệu chất dẻo khác nhau trong các phép thử có cùng thời gian thì nên sử dụng các vật liệu ở thể loại và hình dạng tương tự nhau. Nếu vật liệu thử có dạng bột thì phải sử dụng các hạt nhỏ đã biết trước sự phân bố kích thước và nên sử dụng phân bố kích thước hạt với đường kính tối đa là 250 µm. Nếu vật liệu thử không phải ở dạng bột thì kích thước của các hạt vật liệu không được lớn hơn 5 mm x 5 mm. Tương tự như vậy, kích thước của thiết bị sử dụng cũng phụ thuộc vào thể loại vật liệu thử. Phải đảm bảo chắc chắn rằng không có các thay đổi không mong muốn trong vật liệu thử do thiết kế của thiết bị được sử dụng, như là máy nghiền. Thông thường việc gia công, chế biến vật liệu không làm ảnh hưởng lớn đến sự phân hủy của vật liệu (ví dụ sử dụng vật liệu dạng bột đối với các hỗn hợp).

Có thể xác định hàm lượng hydro, oxy, nitơ, photpho và lưu huỳnh cũng như khối lượng phân tử của vật liệu thử bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu gel. Ưu tiên thử nghiệm vật liệu chất dẻo không có phụ gia như chất hóa dẻo. Khi vật liệu chứa các chất phụ gia thì cần phải có thông tin về khả năng phân hủy sinh học của các chất phụ gia để có thể đánh giá được khả năng phân hủy sinh học của chính vật liệu polyme đó.

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

8.2 Chuẩn bị vật liệu đối chứng

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

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

8.3 Chuẩn bị đất thử

8.3.1 Lấy và sàng đất

Sử dụng đất tự nhiên lấy từ phần đất bề mặt của đất đồng ruộng và/hoặc đất rừng. Nếu cần đánh giá khả năng phân hủy sinh học của vật liệu thử có thể ủ trước đất này với vật liệu thử. Sàng đất để thu được các hạt đất có kích thước nhỏ hơn 5 mm, thường dùng đất nhỏ hơn 2 mm và loại bỏ các vật liệu thực vật, đá và các vật liệu trơ khác nhìn thấy được.

Quan trọng phải loại bỏ được hoàn toàn các chất rắn hữu cơ như rơm vì chúng có thể phân hủy trong quá trình thử và ảnh hưởng đến kết quả.

Đất có thể được điều hòa sơ bộ nhưng thường không nên sử dụng đất ủ trước, đặc biệt là khi mô phỏng quá trình phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên. Tuy nhiên, tùy thuộc vào mục đích của phép thử, có thể sử dụng đất ủ trước miễn là phải nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm (ví dụ phần trăm phân hủy sinh học = x %, việc sử dụng đất ủ trước) và chi tiết phương pháp ủ. Đất ủ trước có thể được lấy từ các phép thử phân hủy sinh học trong phòng thí nghiệm phù hợp được tiến hành trong nhiều điều kiện khác nhau hoặc từ các mẫu thử thu gom từ các địa điểm có các điều kiện môi trường tương ứng (ví dụ như vùng bị ô nhiễm hoặc các nhà máy xử lý công nghiệp).

Ghi lại hiện trường lấy mẫu, địa điểm, sự có mặt của các loại cây cối hay các vụ thu hoạch trước, ngày lấy mẫu, độ sâu lấy mẫu và nếu có thể thì cả lai lịch của đất, như việc sử dụng phân bón và thuốc trừ sâu.

TCVN 9494:2012

8.3.2 Chuẩn bị đất chuẩn

Có thể sử dụng đất chuẩn thay cho đất tự nhiên như mô tả trong 8.3.1. Thành phần của đất chuẩn được nêu tại Bảng 1. Việc sử dụng đất chuẩn rất có lợi khi xác định khả năng phân hủy sinh học của vật liệu chất dẻo trong các loại đất kích cỡ lớn (đất mùn hoặc đất sét), giảm thiểu các vấn đề khi xử lý và thoát khí.

Bảng 1 – Thành phần đất chuẩn

Thành phần	Mô tả	Phần trăm biểu thị theo khối lượng khô
Cát thạch anh công nghiệp	Chủ yếu là cát mịn, trong đó hơn 50 % kích thước hạt nằm trong khoảng từ 0,05 mm đến 0,2 mm	70
Khoáng sét	Khoáng sét cao lanh (chứa nhiều hơn 30 % cao lanh) hoặc canxi bentonit	10
Đất tự nhiên	Xem 8.3.1	16
Compost đã ngấu	Sử dụng compost đã được để thoát khí tốt, lấy từ bãi compost hiếu khí. Để vi khuẩn hoạt động ổn định thì nên sử dụng compost có thời gian ủ 1 năm. Nếu không có được loại này thì sử dụng compost được ủ ít nhất từ 2 đến 3 tháng. Compost phải đồng nhất và không có các vật liệu trơ như thủy tinh, đá hoặc mảnh kim loại. Loại bỏ các chất này bằng phương pháp thủ công và sau đó sàng compost trên sàng có đường kính lọt sàng khoảng từ 2 cm đến 5 cm.	4

Cho thêm muối theo quy định trong Bảng 2 vào đất quy định trong Bảng 1, thường muối này được hòa tan trong nước và tại thời điểm điều chỉnh hàm lượng nước (xem 8.3.4).

Bảng 2 – Muối bổ sung

Thành phần	g/kg đất
KH_2PO_4	0,2
$MgSO_4$	0,1
$NaNO_3$	0,4
Urê	0,2
NH_4Cl	0,4

Một phép thử liên phòng đã được tiến hành để công nhận đất chuẩn này (xem Phụ lục G).

8.3.3 Xác định đặc tính của đất

Biết được đặc tính của đất rất cần thiết để có thể giải thích rõ ràng kết quả của việc nghiên cứu. Do vậy ít nhất phải thực hiện các phép thử sau đây trên đất đã được chọn:

- tổng khả năng giữ nước, theo TCVN 6651 (ISO 11274);
- pH của đất, theo TCVN 5979 (ISO 10390);
- hàm lượng chất hữu cơ, theo TCVN 6642 (ISO 10694).

8.3.4 Điều chỉnh hàm lượng nước và pH của đất

Điều chỉnh hàm lượng nước của đất đến giá trị thích hợp đối với vật liệu thử bằng cách bổ sung một lượng nước phù hợp vào đất hoặc bằng cách sấy khô đất trong không khí ở nơi có bóng râm sau khi cho thêm một lượng nước thích hợp. Điều chỉnh pH của đất trong khoảng từ 6,0 đến 8,0 nếu như pH của đất không nằm trong khoảng này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng nước tối ưu của đất thử phụ thuộc vào vật liệu thử. Giá trị này thường nằm trong khoảng từ 40 % đến 60 % tổng khả năng giữ nước.

Nên điều chỉnh tỷ lệ giữa cacbon hữu cơ trong vật liệu thử hoặc vật liệu đối chứng với nitơ trong đất (tỷ lệ C:N) đến ít nhất là 40:1, để đảm bảo quá trình phân hủy sinh học diễn ra tốt, nếu như tỷ lệ này chưa nằm trong khoảng đó. Có thể thực hiện việc này bằng cách bổ sung nitơ qua dung dịch amoni clorua hoặc bằng cách bổ sung dung dịch có chứa muối như quy định trong Bảng 2.

8.3.5 Xử lý và bảo quản đất

Bảo quản đất trong một bình chứa được đậy kín ở khoảng nhiệt độ $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ cho đến khi đất được sử dụng trong phép thử. Không xử lý đất bằng bất kỳ cách nào mà làm ức chế hoạt động của vi sinh vật trong đất.

Cần phải tuân thủ theo TCVN 7538-6 (ISO 10381-6) để đảm bảo việc lấy mẫu không làm ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật trong đất.

8.4 Khởi động và tiến hành phép thử

Chuẩn bị số lượng các bình thử như sau.

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

và nếu có yêu cầu:

- một bình thử dùng để kiểm tra sự phân hủy không có bản chất sinh học hoặc các thay đổi không thuộc sinh vật học của vật liệu thử (ký hiệu F_S);
- một bình thử để kiểm tra tác động ức chế của vật liệu thử (ký hiệu F_I).

Cho đất (xem 8.3) vào đáy từng bình thử và cho thêm vật liệu thử (xem 8.1) hoặc vật liệu đối chứng (xem 8.2) vào như chỉ dẫn trong Bảng 3. Ghi lại khối lượng mỗi bình thử có chứa hỗn hợp thử. Khi tiến hành đồng thời hai phép thử thì phải nêu trong báo cáo thử nghiệm.

Quan trọng là phải trộn vật liệu thử đồng nhất với đất, nếu vật liệu thử ở dạng bột và nếu vật liệu thử ở dạng mảnh thì trải rộng càng nhiều càng tốt để tăng sự tiếp xúc giữa vật liệu thử với vi sinh vật trong đất. Cũng nên nén bề mặt của hỗn hợp thử bằng một cái bay để tăng sự tiếp xúc giữa vật liệu thử với vi sinh vật trong đất.

TCVN 9494:2012

Nếu tiến hành kiểm tra sự phân hủy không có bản chất sinh học, thì chi tiết quá trình tiến hành sử dụng để ức chế hoạt động của vi sinh vật khi bắt đầu phép thử và khi duy trì điều kiện vô khuẩn trong quá trình thử phải được nêu trong báo cáo thử nghiệm.

Đặt các bình thử vào trong môi trường có nhiệt độ ổn định (xem Điều 5) và để tất cả các bình thử đạt đến nhiệt độ mong muốn. Nối các bình này với hồ hấp kế hoặc hệ thống cung cấp không khí không chứa cacbon dioxit và bắt đầu quá trình ủ.

Nếu đo sự tiêu thụ oxy thì đọc các số đo trên áp kế (nếu làm thủ công) hoặc xác định rằng máy đo sự hấp thụ oxy hoạt động tốt (hồ hấp kế tự động) (xem Phụ lục A)

Nếu xác định cacbon dioxit sinh ra thì đo lượng cacbon dioxit sinh ra (với tần suất tùy thuộc vào tốc độ sinh ra cacbon dioxit) từ mỗi bình thử bằng phương pháp phù hợp và có độ chính xác (xem Phụ lục B và Phụ lục C).

Bảng 3 – Phân bổ cuối cùng của vật liệu thử và vật liệu đối chứng

Bình thử		Vật liệu thử	Vật liệu đối chứng	Đất thử
F _T	Mẫu thử	+	-	+
F _T	Mẫu thử	+	-	+
F _T	Mẫu thử	+	-	+
F _B	Mẫu trắng	-	-	+
F _B	Mẫu trắng	-	-	+
F _B	Mẫu trắng	-	-	+
F _C	Kiểm tra hoạt tính đất	-	+	+
F _C	Kiểm tra hoạt tính đất	-	+	+
F _C	Kiểm tra hoạt tính đất	-	+	+
F _S	Kiểm tra phân hủy không có bản chất sinh học (tùy chọn)	+	-	-
F _I	Kiểm tra sự ức chế (tùy chọn)	+	+	+
+ = có; - = không có.				

Nếu tốc độ phân hủy sinh học được xem là bị chậm lại do đất thử bị khô trong suốt quá trình thử thì ngừng đo và tháo các bình thử ra khỏi hồ hấp kế hoặc hệ thống cung cấp không khí không chứa cacbon dioxit. Cân các bình thử và cho thêm một lượng nước thích hợp vào đất thử để đưa hàm lượng nước về lại như ban đầu. Nối lại các bình thử và bắt đầu đo lượng oxy bị tiêu thụ hay cacbon dioxit sinh ra. Các thao tác này phải được thực hiện sao cho không ức chế hoạt tính của các vi sinh vật trong đất và không ảnh hưởng đến việc đo sự hấp thụ oxy hoặc lượng cacbon dioxit sinh ra và phải nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm.

Khi đạt được đến mức BOD hoặc cacbon dioxit sinh ra không đổi (đạt đến giai đoạn ổn định) và không có sự phân hủy sinh học nào tiếp tục diễn ra nữa thì phép thử được coi là đã hoàn thành.

Thông thường thời gian thử không được vượt quá sáu tháng. Tuy nhiên nếu vẫn quan sát được rõ quá trình phân hủy sinh học và sau một thời gian dài vẫn chưa đạt được giai đoạn ổn định thì có thể kéo dài thêm phép thử nhưng không được quá 2 năm. Nếu phép thử kéo dài hơn sáu tháng thì định kỳ phải kiểm tra các rò rỉ có thể xảy ra. Thời gian kéo dài và việc thực hiện các phép đo đặc biệt, ví dụ để đảm bảo tính đa dạng của vi sinh vật hoặc để cung cấp đủ chất dinh dưỡng, đều phải nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm.

Khi kết thúc phép thử, tháo các bình thử ra và cân các bình thử này để kiểm tra sự giảm hàm lượng nước trong đất thử. Hoặc có thể tách cặn vật liệu thử ra khỏi đất bằng một dung môi thích hợp (nếu có thể) và cân.

9 Tính toán và biểu thị kết quả

9.1 Tính toán

9.1.1 Phần trăm phân hủy sinh học từ các giá trị oxy tiêu thụ

Đọc giá trị lượng oxy tiêu thụ trong mỗi bình thử bằng phương pháp do nhà sản xuất đưa ra theo loại hô hấp kế được sử dụng. Tính nhu cầu oxy sinh hóa (BOD_s) của vật liệu thử cụ thể theo công thức (1):

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

Trong đó

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

BOD_t là lượng BOD trong bình thử chứa vật liệu thử F_T vào thời điểm t , biểu thị bằng miligam trên kilogam đất thử, tính bằng cách chia lượng oxy tiêu thụ đo được, theo miligam, cho lượng đất thử, theo kilogam;

BOD_{Bt} là lượng BOD trong bình thử chứa mẫu trắng F_B vào thời điểm t , biểu thị bằng miligam trên kilogam đất thử;

ρ_T là nồng độ vật liệu thử trong hỗn hợp phản ứng của bình thử F_T , biểu thị bằng miligam trên kilogam đất thử.

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

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

Tương tự như trên, tính lượng BOD và phần trăm phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng F_c và nếu có, của bình thử kiểm tra sự phân hủy không có bản chất sinh học F_s và bình thử kiểm tra sự ức chế F_i . Để tính lượng ThOD, xem Phụ lục D.

TCVN 9494:2012

9.1.2 Phần trăm phân hủy sinh học từ lượng cacbon dioxit sinh ra

9.1.2.1 Lượng cacbon dioxit sinh ra theo lý thuyết từ vật liệu thử

Tính lượng cacbon dioxit sinh ra theo lý thuyết ($ThCO_2$) từ vật liệu thử, biểu thị bằng miligam theo công thức (3):

$$ThCO_2 = m \times \omega_c \times \frac{44}{12} \quad (3)$$

Trong đó

m là khối lượng vật liệu thử cho vào hệ thống thử, tính bằng miligam;

ω_c là hàm lượng cacbon của vật liệu thử, tính từ công thức hóa học hoặc phân tích nguyên tố, biểu thị bằng phần khối lượng;

44 và 12 là khối lượng phân tử của cacbon dioxit và khối lượng nguyên tử của cacbon.

Tương tự như trên tính lượng cacbon dioxit sinh ra theo lý thuyết từ vật liệu đối chứng và từ hỗn hợp vật liệu thử và vật liệu đối chứng trong bình thử F_i .

9.1.2.2 Phần trăm phân hủy sinh học

Tính phần trăm phân hủy sinh học D_i trong mỗi bình thử F_T từ lượng cacbon dioxit sinh ra trong mỗi phép đo theo công thức (4):

$$D_i = \frac{\sum m_T - \sum m_B}{ThCO_2} \times 100 \quad (4)$$

Trong đó

$\sum m_T$ là lượng cacbon dioxit sinh ra trong bình thử chứa vật liệu thử F_T từ lúc bắt đầu phép thử đến thời điểm t , tính bằng miligam;

$\sum m_B$ là lượng cacbon dioxit sinh ra trong bình thử chứa mẫu trắng F_B từ lúc bắt đầu phép thử đến thời điểm t , tính bằng miligam;

$ThCO_2$ là lượng cacbon dioxit sinh ra theo lý thuyết từ vật liệu thử, tính bằng miligam.

Tương tự như trên, tính phần trăm phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng trong bình thử kiểm tra hoạt tính của đất, F_c .

9.2 Biểu thị và giải thích kết quả

Lập bảng các giá trị BOD hoặc lượng cacbon dioxit đo được và giá trị phần trăm phân hủy sinh học tương ứng với từng thời điểm đo. Đối với mỗi bình thử, vẽ đồ thị đường cong của lượng BOD hoặc lượng cacbon dioxit sinh ra theo thời gian và đường cong phần trăm phân hủy sinh học theo thời gian.

Nếu thu được các kết quả có thể so sánh đối với hai bình thử tiến hành đồng thời thì có thể vẽ đường cong trung bình.

Mức phân hủy sinh học tối đa được xác định là giá trị trung bình của giai đoạn ổn định trên đường cong phân hủy sinh học, mô tả đặc tính phân hủy sinh học của vật liệu thử.

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

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

10 Độ tin cậy của kết quả

Phép thử được coi là có tin cậy nếu

- a) Mức độ phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng lớn hơn 60 % tại giai đoạn ổn định hoặc khi kết thúc phép thử;

và

- b) Các giá trị BOD hoặc lượng cacbon dioxit sinh ra từ ba bình thử chứa mẫu trắng F_B nằm trong khoảng 20 % giá trị trung bình tại giai đoạn ổn định hoặc khi kết thúc phép thử.

Nếu không đạt được các tiêu chuẩn này thì lặp lại phép thử bằng cách sử dụng đất được điều hòa sơ bộ hoặc được ủ trước.

11 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) tất cả thông tin cần thiết để nhận biết vật liệu thử và vật liệu đối chứng, gồm tên, thành phần và công thức hóa học (nếu biết), ThOD, ThCO₂ (gồm cả phương pháp tính toán), thể loại, hình dạng hạt, hàm lượng/nồng độ các mẫu thử và hàm lượng chất phụ gia (nếu có thể);
- c) lai lịch của vật liệu thử (các hạt nguyên bản, sản phẩm chất dẻo cuối cùng được chuyển hóa hoặc mẫu đã lão hóa), chi tiết điều kiện xử lý sơ bộ nếu có tiến hành;
- d) toàn bộ thông tin về đất gồm nguồn gốc, ngày tháng lấy đất, đặc tính, lượng sử dụng trong phép thử, điều kiện bảo quản, xử lý và chi tiết về việc ủ trước;
- e) các điều kiện thử chính gồm có lượng vật liệu thử được sử dụng, nhiệt độ và thời gian ủ;
- f) kỹ thuật phân tích được sử dụng gồm nguyên tắc của hô hấp kế và phương pháp sử dụng để đo lượng cacbon dioxit sinh ra;

TCVN 9494:2012

- g) tất cả các thao tác khác được thực hiện bao gồm việc bổ sung nước vào hỗn hợp thử trong suốt quá trình thử và kết quả phân tích hỗn hợp thử gồm cả hàm lượng nước, khi kết thúc phép thử;
- h) tất cả các kết quả thử thu được đối với vật liệu thử và vật liệu đối chứng (dạng bảng biểu và đồ thị) bao gồm lượng BOD hoặc lượng tích lũy cacbon dioxit sinh ra đo được, các giá trị phần trăm phân hủy sinh học và đồ thị của các thông số này theo thời gian;
- i) khoảng thời gian của giai đoạn thích ứng và giai đoạn phân hủy sinh học, mức phân hủy sinh học tối đa cũng như tổng thời gian thử;

và tùy chọn, các thông tin sau nếu tiến hành hoặc có xác định:

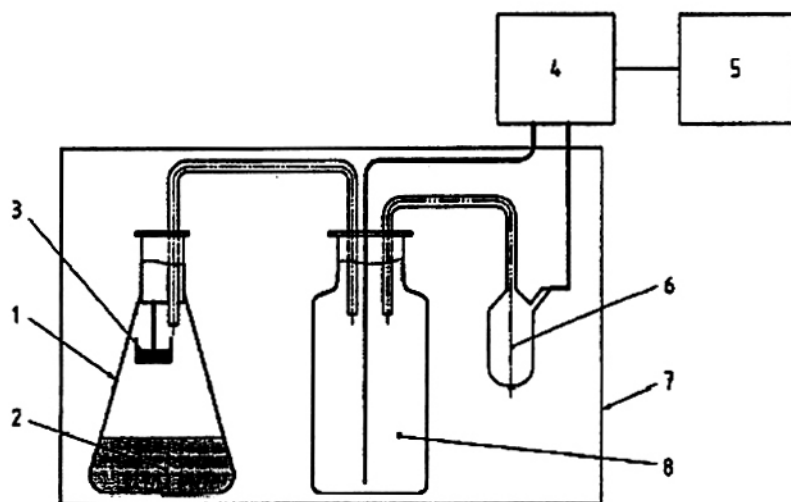
- j) lượng cặn vật liệu thử hoặc phần trăm phân hủy sinh học tính từ lượng cặn vật liệu thử;
- k) đơn vị cụm khuẩn (cfu/g) có trong đất;
- l) chi tiết phương pháp sử dụng trong thời gian thử kéo dài (lâu hơn 6 tháng) để hỗ trợ cho sự đa dạng của vi sinh vật hoặc để tránh sự thiếu hụt chất dinh dưỡng;
- m) các thông tin về vật liệu thử và lượng sử dụng nếu phép thử được thực hiện với nồng độ vật liệu thử thấp hơn để tránh các ảnh hưởng độc;
- n) bất kỳ dữ liệu nào có liên quan (ví dụ khối lượng phân tử ban đầu của mẫu thử, khối lượng phân tử của cặn polyme);
- o) bất kỳ sai khác nào so với phương pháp thử quy định.

Phụ lục A

(tham khảo)

Nguyên tắc hoạt động của một hô hấp kế (ví dụ)

Hô hấp kế như nêu tại Hình A.1 được cài đặt trong một môi trường có kiểm soát nhiệt độ (ví dụ bể cách thủy) bao gồm các bình thử nghiệm có chất hấp thụ CO_2 ở khoảng không bên trên, một thiết bị sản xuất oxy theo phương pháp điện phân, một áp kế và một thiết bị kiểm tra và thiết bị ghi để bên ngoài (máy in, thiết bị vẽ đồ thị hoặc máy tính). Đổ hỗn hợp thử vào một phần ba thể tích của bình thử nghiệm. Nếu quá trình phân hủy sinh học xảy ra, các vi sinh vật tiêu thụ oxy và sản sinh ra cacbon dioxit và cacbon dioxit bị hấp thụ hoàn toàn. Tổng áp suất trong các bình giảm xuống. Khi áp suất giảm thì quá trình điện phân oxy được khởi động lại. Sau đó, khi áp suất ban đầu được thiết lập lại thì quá trình điện phân dừng và lượng điện sử dụng tương ứng với lượng oxy bị tiêu thụ được đo liên tục và được dùng để xác định lượng oxy tiêu thụ, biểu thị theo mg/l BOD trên thiết bị ghi.



CHÚ DẪN

- | | | | |
|---|----------------------------|---|--|
| 1 | Bình thử | 5 | Máy in, thiết bị vẽ đồ thị hoặc máy tính |
| 2 | Hỗn hợp thử | 6 | Áp kế |
| 3 | Chất hấp thụ CO_2 | 7 | Không gian kín được ổn nhiệt |
| 4 | Thiết bị kiểm tra | 8 | Thiết bị sản xuất oxy |

Hình A.1 – Giải đồ của một hô hấp kế

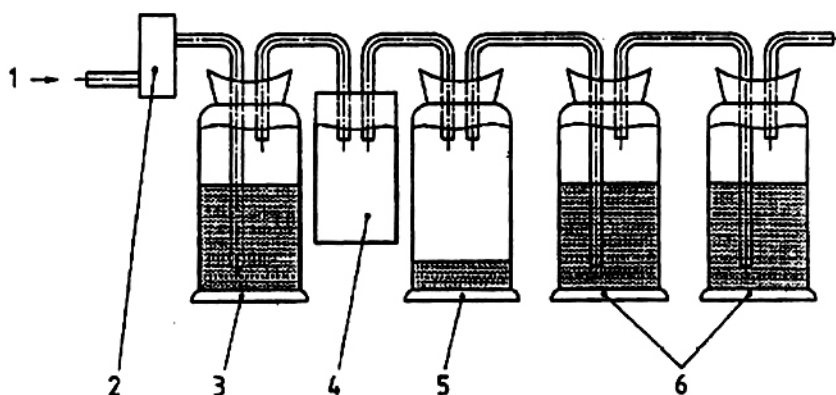
Phụ lục B

(tham khảo)

Ví dụ về hệ thống đo lường cacbon dioxit sinh ra

Lắp đặt các bình thử nghiệm vào theo như hình B.1 và nối với hệ thống ống kín khí. Thổi vào hệ thống khí không có CO_2 ở một áp suất thấp không đổi (thường ít nhất là một thể tích khí tương đương với thể tích của ba bình trên một giờ khi sử dụng nồng độ vật liệu thử cao, ví dụ 2 500 mg vật liệu thử cho 200 g đất). Đo lường bóng khí hoặc sử dụng một thiết bị kiểm soát dòng phù hợp (2) để kiểm tra tốc độ dòng khí. Sử dụng khí tổng hợp không có CO_2 hoặc khí nén. Trong trường hợp sử dụng khí nén thì loại bỏ khí CO_2 bằng cách cho khí đi qua một chai (3) chứa natri cacbonat khô hoặc cho qua ít nhất hai bình rửa khí có chứa, ví dụ như 500 ml dung dịch kali hydroxit 10 mol/L. Có thể sử dụng thêm một bình có chứa 100 ml dung dịch bari hydroxit 0,0125 mol/L và một bình rỗng để nhận biết sự hiện diện của CO_2 trong khí khi nó làm đục dung dịch này và để ngăn việc cuốn theo chất lỏng vào trong bình thử nghiệm. Nếu cần, có thể thêm dụng cụ tạo ẩm ở phía trước bình thử để làm ẩm không khí, tránh sự bốc hơi ẩm từ đất. Có thể thực hiện việc này bằng cách như là thổi khí qua một dung dịch có độ ẩm ổn định, chẳng hạn như dung dịch natri photphat đã bão hòa. Nếu quá trình phân hủy sinh học xảy ra, cacbon dioxit được sinh ra trong bình thử và được hấp thụ trong các chai chứa chất hấp thụ (6) như nêu tại Phụ lục C. Để giữ cho đất thử ẩm (bình 5) và duy trì điều kiện hiếu khí, điều chỉnh tốc độ dòng khí ở đầu vào.

Để đảm bảo sự thoát khí hoàn toàn và tránh tạo ra gradien nồng độ khí trong bình thử, đầu vào của ống phải nằm sâu trong đất để cho không khí đi xuyên qua đất thử.



CHÚ DẪN

- | | | | |
|---|----------------------------|---|----------------------------|
| 1 | Không khí vào | 4 | Dụng cụ tạo ẩm |
| 2 | Thiết bị kiểm soát dòng | 5 | Bình thử |
| 3 | Chất hấp thụ CO_2 | 6 | Chai hấp thụ CO_2 |

Hình B.1 – Glãn đồ hệ thống đo lường cacbon dioxit sinh ra

Phụ lục C

(tham khảo)

Ví dụ về các phương pháp xác định cacbon dioxit sinh ra

C.1 Xác định CO₂ bằng cách đo DIC

Khí cacbon dioxit sinh ra được hấp thụ trong dung dịch natri hydroxit (NaOH) và được xác định là cacbon vô cơ hòa tan (DIC) bằng máy phân tích DOC mà không cần tro hóa.

Chuẩn bị dung dịch 0,05 mol/L NaOH trong nước khử ion. Đo lượng DIC của dung dịch này và sử dụng giá trị mẫu trắng này khi tính CO₂ sinh ra. Nối vào dây bình thử nghiệm hai chai chứa chất hấp thụ, mỗi chai chứa 100 ml dung dịch NaOH. Dùng một xi phông nhỏ đóng đầu ra của chai cuối cùng để ngăn CO₂ từ không khí bên ngoài đi vào dung dịch NaOH. Vào các ngày xác định CO₂, lấy chai chứa chất hấp thụ sát cạnh bình thử nghiệm và lấy lượng mẫu thử đủ lớn để đo DIC (ví dụ 10 ml). Thay chai này bằng chai thứ hai và thêm một chai mới chứa dung dịch NaOH chưa sử dụng vào. Vào ngày cuối cùng, sau khi axit hóa dung dịch thử, đo lượng DIC trong cả hai chai.

Tính lượng CO₂ sinh ra theo phương trình (C.1)

$$(CO_2)_T = \frac{(DIC_T - DIC_B) \times 3,67}{10} \quad (C.1)$$

Trong đó

$(CO_2)_T$ là lượng CO₂ sinh ra, tính bằng miligam;

DIC_T là lượng DIC đo được, tính bằng miligam;

DIC_B là lượng DIC đo được trong bình trắng đối với dung dịch NaOH, tính bằng miligam;

3,67 là tỉ lệ khối lượng phân tử của CO₂ (44) trên khối lượng nguyên tử của cacbon (12);

10 là hệ số hiệu chỉnh cho việc sử dụng 100 ml dung dịch NaOH.

C.2 Phương pháp chuẩn độ bằng dung dịch bari hydroxyt

Lượng CO₂ sinh ra phản ứng với bari hydroxyt [Ba(OH)₂] và kết tủa thành bari cacbonat (BaCO₃) [xem phản ứng (C.2)]. Lượng cacbon dioxit sinh ra được xác định bằng phương pháp chuẩn độ dung dịch Ba(OH)₂ còn lại với axit clohydric (HCl) [xem phản ứng (C.3)].



TCVN 9494:2012

Hòa tan 4,0 g $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ vào nước khử ion hoặc nước cất tạo thành 1 000 ml để thu được dung dịch 0,0125 mol/L. Nên chuẩn bị một lượng đủ vào thời điểm thực hiện chuỗi phép thử, ví dụ khoảng 5 L. Lọc vật liệu rắn và xác định chính xác nồng độ bằng phương pháp chuẩn độ với dung dịch HCl chuẩn. Dùng phenolphthalein làm chất chỉ thị hoặc một máy chuẩn độ tự động để xác định điểm kết thúc. Giữ dung dịch sạch trong một bình thử được niêm phong nhằm ngăn sự hấp thụ CO_2 từ không khí.

Pha loãng 50 ml dung dịch HCl 1 mol/L (36,5 g/l) đến 1 000 ml với nước khử ion hoặc nước cất để thu được dung dịch 0,05 mol/L.

Khi bắt đầu phép thử, cho chính xác 100 ml dung dịch Ba(OH)_2 vào từng chai trong ba chai chứa chất hấp thụ. Tùy vào đặc điểm và lượng vật liệu thử mà điều chỉnh thể tích này. Định kỳ lấy chai sát với bình thử nghiệm để chuẩn độ. Cũng có thể chuẩn độ khi cần thiết ví dụ như khi chai thứ nhất bị vắn đục hay trước khi quan sát được kết tủa BaCO_3 trong chai thứ hai. Khi bắt đầu phép thử cần chuẩn độ cách ngày và khi đạt đến giai đoạn ổn định thì cách năm ngày chuẩn độ một lần. Sau khi lấy chai hấp thụ ra, ngay lập tức đẩy lại để ngăn CO_2 từ không khí đi vào. Chuyển vị trí hai chai còn lại vào vị trí gần với bình thử nghiệm và đặt vào cuối dãy một chai mới chứa dung dịch Ba(OH)_2 mới. Đặc biệt nếu phép thử diễn ra lâu hơn, xác định chính xác nồng độ của dung dịch. Xử lý tương tự với tất cả các bình chứa vật liệu thử, vật liệu đối chứng, mẫu trắng, bình kiểm soát ức chế và bình kiểm soát vật liệu cây.

Ngay khi tháo chai ra, chuẩn độ hai hoặc ba phần của dung dịch Ba(OH)_2 bằng dung dịch HCl. Ghi lại thể tích dung dịch HCl cần để trung hòa.

Tính lượng CO_2 bị hấp thụ trong bình hấp thụ theo công thức (C.4):

$$m = \left(\frac{2c_B \times V_{B0}}{c_A} - V_A \times \frac{V_{Bt}}{V_{Bz}} \right) \times c_A \times 22 \quad (\text{C.4})$$

Trong đó:

m là khối lượng CO_2 bị hấp thụ trong chai 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 của dung dịch Ba(OH)_2 khi bắt đầu phép thử, tính bằng mililit;

V_{Bt} là thể tích của dung dịch Ba(OH)_2 vào thời điểm t trước khi chuẩn độ, tính bằng mililit;

V_{Bz} là thể tích của phần dung dịch Ba(OH)_2 dùng để chuẩn độ, tính bằng mililit;

V_A là thể tích dung dịch HCl dùng để chuẩn độ, tính bằng mililit;

22 là một nửa của khối lượng phân tử CO_2 .

Khi áp dụng các điều kiện sau:

- thể tích của dung dịch $\text{Ba}(\text{OH})_2$ trước và sau khi hấp thụ chính xác là 100 ml;
- toàn bộ dung dịch dùng để chuẩn độ ($V_{B0} = V_{B1} = V_{B2}$);
- nồng độ c_B của dung dịch $\text{Ba}(\text{OH})_2$ chính xác là 0,0125 mol/L;
- nồng độ c_A của dung dịch HCl chính xác là 0,05 mol/L;

sử dụng phương trình (C.5)

$$m = 1,1 \times (50 - V_A) \quad (\text{C.5})$$

Phụ lục D

(tham khảo)

Nhu cầu oxy theo lý thuyết (ThOD)

D.1 Tính lượng ThOD

Nhu cầu oxy theo lý thuyết (ThOD) của một chất $C_cH_hCl_{cl}N_nS_sP_pNa_{na}O_o$ có khối lượng phân tử tương ứng M_r có thể tính được nếu như biết cấu tạo nguyên tố hoặc có thể xác định bằng cách phân tích nguyên tố, sử dụng công thức (D.1):

$$ThOD = \frac{16[2c + 0,5(h - cl - 3n) + 3s + 2,5p + 0,5na - o]}{M_r} \quad (D.1)$$

Cách 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 sinh ra dưới dạng hợp chất hydro. Sự oxy hóa N, P và S phải được kiểm tra bằng các phép phân tích. Việc tính toán cũng giả định rằng lượng nitơ giải phóng dưới dạng amoni. Biểu thị ThOD bằng miligam trên gam chất hoặc bằng miligam trên miligam chất.

D.2 Ví dụ: Poly (axít β -hydroxybutyric) (PHB)

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

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

$$ThOD = 1,674 \text{ 4 mg/mg PHB} = 1 \text{ 674,4 mg/g PHB}$$

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

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

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

Phụ lục E

(tham khảo)

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

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

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

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

Phụ lục F

(tham khảo)

Ví dụ về các phép thử dài hạn

F.1 Tiến triển của quá trình phân hủy sinh học cellulose, gluten bột mỳ, xơ lanh và xơ cây đậu chổi trong đất

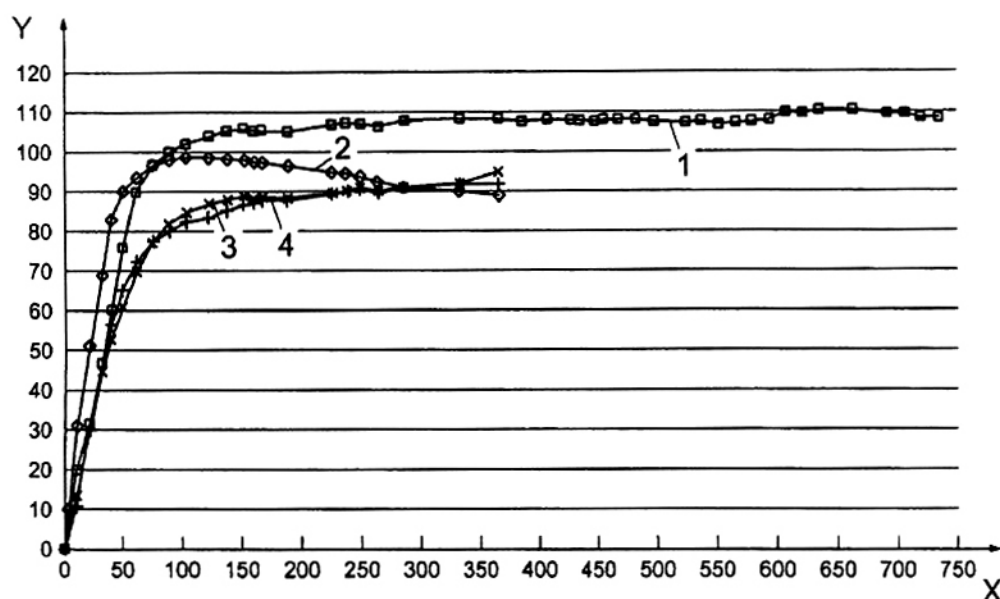
CHÚ THÍCH Các số liệu lấy từ tài liệu tham khảo [6].

- Vật liệu cấy: đất nông nghiệp (500 g, nhỏ hơn 2 mm)
- Vật liệu: cellulose (5 g), gluten bột mỳ (5 g), xơ lanh (2 g), xơ cây đậu chổi (2 g)
- Thời gian: cellulose: 2 năm
gluten bột mỳ, xơ lanh, xơ cây đậu chổi: 1 năm
- Nhiệt độ: 20 °C ± 2 °C.

Kết quả (2 phép thử song song): Xem Bảng F.1 và Hình F.1

Bảng F.1 – Phần trăm phân hủy sinh học (ví dụ đầu)

Vật liệu thử	Phần trăm phân hủy sinh học		
	%		
	1 năm		2 năm
	Trung bình	Sai lệch chuẩn	1 phép thử song song
Cellulose	108,3	2,8	108,5
Gluten bột mỳ	89,2	2,6	–
Xơ lanh	94,8	6,8	–
Xơ cây đậu chổi	91,8	5,6	–



CHÚ DẪN

- X thời gian (ngày)
 Y phần trăm phân hủy sinh học
 1 cellulose
 2 gluten bột mỳ
 3 xơ lạnh
 4 xơ chổi

Hình F.1 – Tiến triển của quá trình phân hủy sinh học của cellulose, gluten bột mỳ, xơ lạnh và xơ cây đậu chổi trong đất

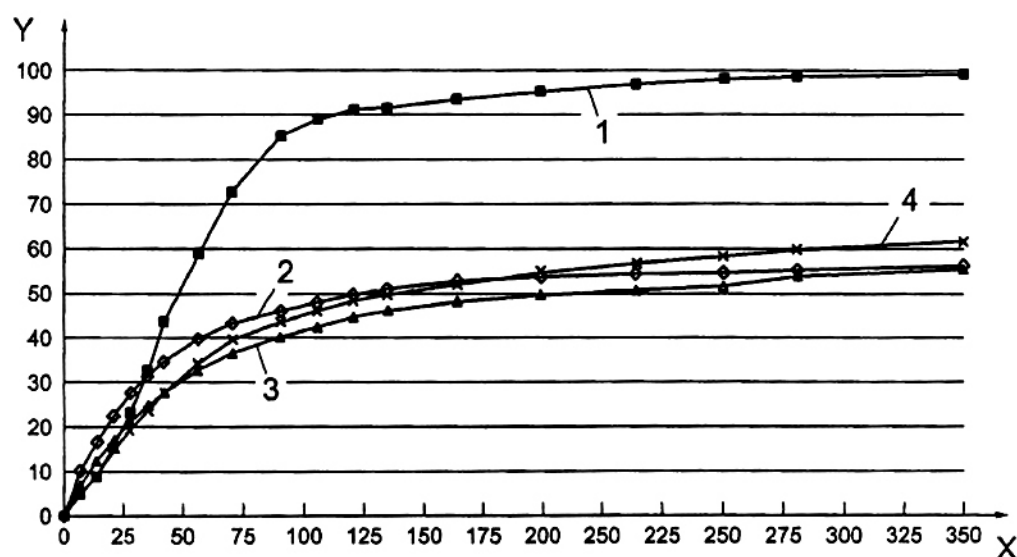
F.2 Tiến triển của quá trình phân hủy sinh học của cellulose, lá cây bulô, lá sồi, lá thông trong đất

CHÚ THÍCH Các số liệu lấy từ tài liệu tham khảo [7].

- Vật liệu cây:** đất nông nghiệp (500 g, nhỏ hơn 2 mm)
Vật liệu: cellulose (1 g), lá cây bulô (1 g), lá sồi (1 g), lá thông (1 g)
Thời gian: 1 năm
Nhiệt độ: $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
Kết quả: Xem Bảng F.2 và Hình F.2.

Bảng F.2 – Phần trăm phân hủy sinh học (ví dụ thứ hai)

Vật liệu thử	Phần trăm phân hủy sinh học	
	%	
	Tuyệt đối	Tương đối với cellulose
Cellulose	99,7	100,0
Lá cây bulô	56,2	56,4
Lá sồi	55,8	56,0
Lá thông	61,9	62,1



CHÚ DẪN

- X thời gian (ngày)
 Y phần trăm phân hủy sinh học
 1 cellulose
 2 lá cây bulô
 3 lá sồi
 4 lá thông

Hình F.2 – Tiến triển của quá trình phân hủy sinh học của cellulose, lá cây bulô, lá sồi và lá thông trong đất

F.3 Tiến triển của quá trình phân hủy sinh học của cellulose và rơm

Vật liệu cấy: hỗn hợp 1 phần đất nông nghiệp và 2 phần đất rừng (500 g, nhỏ hơn 2 mm)

Vật liệu: cellulose (1 g), rơm (1 g).

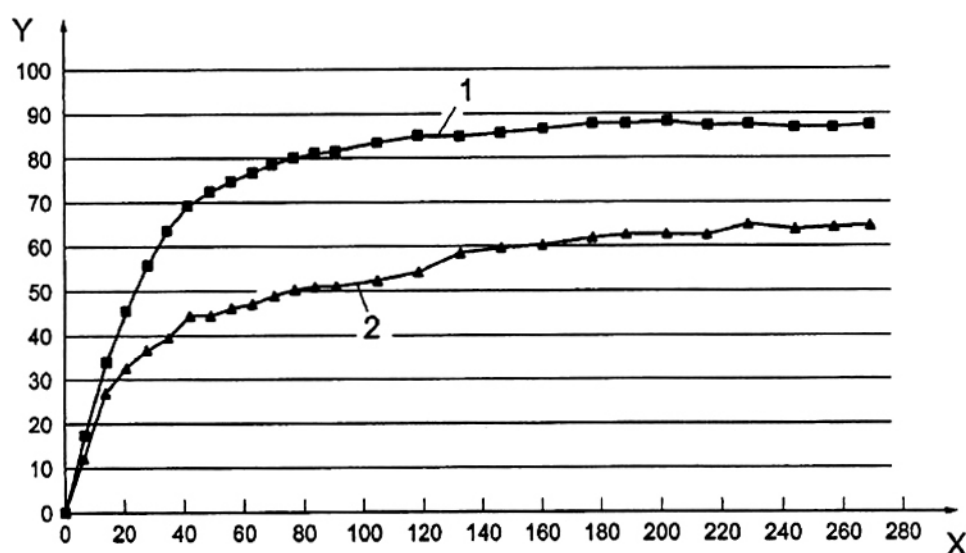
Thời gian: 270 ngày

Nhiệt độ: $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kết quả: Xem Bảng F.3 và Hình F.3.

Bảng F.3 – Phần trăm phân hủy sinh học (ví dụ thứ ba)

Vật liệu thử	Phần trăm phân hủy sinh học		
	%		Tương đối với cellulose
	Tuyệt đối		
	Trung bình	Sai lệch chuẩn	
Cellulose	89,8	1,9	100,0
Rơm	66,4	0,0	74,0

**CHÚ DẪN**

X thời gian (ngày)

Y phần trăm phân hủy sinh học

1 cellulose

2 rơm

Hình F.3 – Tiến triển của quá trình phân hủy sinh học của cellulose và rơm

Phụ lục G

(tham khảo)

Thử nghiệm liên phòng

Năm 2009, một phép thử liên phòng đã được tiến hành để công nhận việc sử dụng đất chuẩn thay cho đất tự nhiên. Thành phần của đất chuẩn được nêu trong 8.3.2. Cát và khoáng sét trong đất chuẩn cung cấp kết cấu của đất, đất tự nhiên cung cấp vi sinh vật và compost đã ngấu cung cấp các chất hữu cơ và vi sinh vật bổ sung. Sáu phòng thử nghiệm khác nhau cùng tiến hành phép thử. Từng phòng thử nghiệm lựa chọn độc lập đất để sử dụng làm "đất tự nhiên", nghĩa là vật liệu cấy cho "đất chuẩn". Vật liệu thử là vật liệu đối chứng cellulose vi tinh thể (RM) và vật liệu thử tổ hợp tinh bột/poly(butylene adipat-co-butylene terephthalat) (TM). Với mục đích của phép thử liên phòng, các phòng thử nghiệm tham gia được phép sử dụng đất thương mại bán sẵn, đất tự nhiên hoặc hỗn hợp của các loại đất khác nhau (ví dụ hỗn hợp đất rừng, một phần đất cỏ, một phần đất vườn). Khi sử dụng các vật liệu có nồng độ cao (10 g trong 800 g đất ướt), đất tự nhiên phải được bổ sung thêm hỗn hợp muối như nêu trong Bảng 2.

Tất cả các phòng thử nghiệm tham gia phải xác định khả năng phân hủy sinh học trong đất bằng cách đo lượng cacbon dioxide sinh ra bằng phương pháp phổ hồng ngoại IR hoặc phương pháp chuẩn độ hoặc phương pháp xác định trọng lượng của CO₂ theo TCVN 9493-2 (ISO 14855-2). Nhiệt độ phép thử từ 20 °C đến 28 °C. Hai phòng thử nghiệm sử dụng hỗn hợp của hai hoặc ba loại đất, hai phòng thử nghiệm sử dụng đất chọn từ đất ruộng và hai phòng sử dụng đất thương mại bán sẵn.

Giá trị phần trăm phân hủy sinh học cuối cùng được nêu trong Bảng G.1.

Bảng G.1 – Kết quả thử nghiệm liên phòng

Phòng thử nghiệm tham gia	Vật liệu cấy	Thiết bị	Thời gian ngày	Phân hủy sinh học % TM	Sai lệch chuẩn	Phân hủy sinh học % RM	Sai lệch chuẩn	Phân hủy sinh học tương đối của TM ^a
1	Đất tự nhiên	Hệ thống không khí không có CO ₂	120	33,0 ^b	2,16	70,3	0,31	47,0
1	Đất chuẩn	Hệ thống không khí không có CO ₂	120	11,8	1,17	59,0	0,5	20,1
2	Đất tự nhiên	ASTMD 5988-03, 7.2.2	120	16,9 ^b	2,9	63,8 ^b	1,4	26,5
2	Đất chuẩn	ASTMD 5988-03, 7.2.2	120	23,8 ^b	0,9	70,4 ^b	3,4	33,8
2	Đất tự nhiên	Hệ thống không khí không có CO ₂	120	21,9 ^b	0,9	69,9 ^b	1,6	31,3
2	Đất tự nhiên	ASTMD 5988-03, 7.2.2	120	18,8 ^b	0,2	61,1 ^b	0,8	30,8
2	Đất tự nhiên	ASTMD 5988-03, 7.2.2	120	19,9 ^b	1,1	81,6 ^b	2,8	24,4
3	Đất tự nhiên	Hệ thống không khí không có CO ₂	182	61	1	72 ^c	3,5	83,6
3	Đất chuẩn	Hệ thống không khí không có CO ₂	182	26	4	46	4,5	56,5
4	Đất tự nhiên	Hệ thống không khí không có CO ₂	134	59,3	2,3	60,9	1,9	97,3
4	Đất chuẩn	Hệ thống không khí không có CO ₂	134	70,8	1,78	70,1	0,0	101,0
4	Đất tự nhiên	Hệ thống không khí không có CO ₂	115	31,1	4,5	56,6	4,3	54,9
4	Đất chuẩn	Hệ thống không khí không có CO ₂	115	37,2	6,9	64,5	5,1	57,7
5	Đất tự nhiên	Hệ thống không khí không có CO ₂	70	92,6	3,2	86,5	9,0	107,1
5	Đất chuẩn	Hệ thống không khí không có CO ₂	60	74,1 ^b	0,5	77,0 ^b	6,6	96,2
6	Đất tự nhiên	Hệ thống không khí không có CO ₂	118	21,5 ^b	4,9	104 ^b	2,6	20,7
6	Đất chuẩn	Hệ thống không khí không có CO ₂	118	26 ^b	4,2	107 ^b	1,4	24,3

^a Phần trăm phân hủy sinh học tương đối của vật liệu thử TM = (% phân hủy sinh học của vật liệu thử, TM / % phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng, RM) x 100.

^b Chưa đạt được đến giai đoạn ổn định.

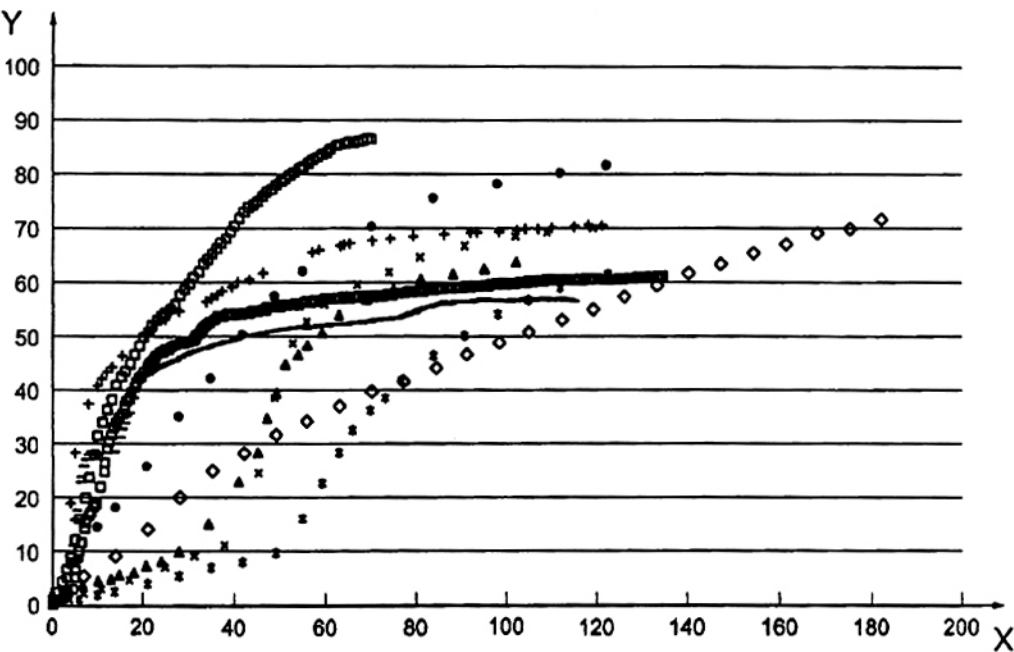
^c Vẫn còn ở giai đoạn sinh ra nhiều CO₂.

Giá trị trung bình của các giá trị phân hủy sinh học thu được từ các phòng thử nghiệm khác nhau đối với đất tự nhiên và đối với đất chuẩn được cho trong Bảng G.2. Các giá trị thu được từ phòng thử nghiệm thứ 6 không được tính vào vì giá trị phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng vượt quá 100 % đối với cả hai loại đất và chưa đạt được giai đoạn ổn định.

Bảng G.2 – Giá trị phân hủy sinh học trung bình trong đất tự nhiên và trong đất chuẩn

Vật liệu	Đất tự nhiên	Đất chuẩn
Vật liệu thử	39,39 ± 26,03	40,62 ± 25,96
Vật liệu đối chứng	69,19 ± 9,91	64,50 ± 10,91

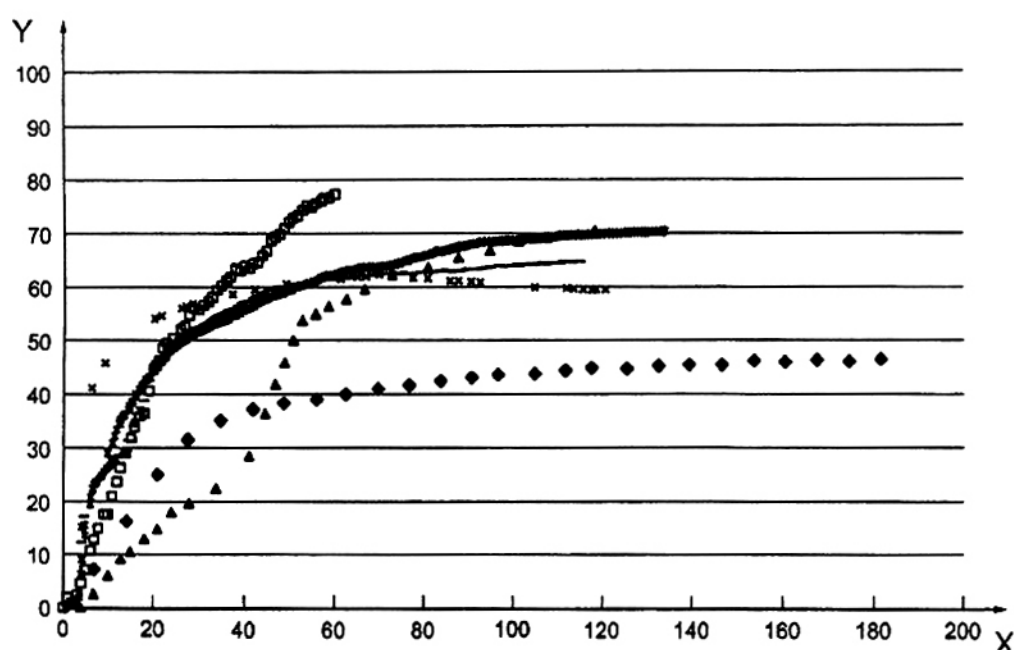
Hình G.1 và G.2 biểu diễn đường cong phân hủy sinh học của vật liệu đối chứng trong đất tự nhiên và trong đất chuẩn của các phòng thử nghiệm tham gia.



CHÚ DẪN

- X thời gian (ngày)
- Y phần trăm phân hủy sinh học

Hình G.1 – Đường cong phân hủy sinh học của cellulose vi tinh thể trong đất tự nhiên



CHÚ DẪN

X thời gian (ngày)

Y phần trăm phân hủy sinh học

Hình G.2 – Đường cong phân hủy sinh học của cellulose vi tính thể trong đất chuẩn

Độ lệch của các kết quả trong phép thử liên phòng đối với đất tự nhiên không cao khi thử với cellulose. Cellulose là vật liệu có khả năng phân hủy sinh học không bị ảnh hưởng nhiều bởi các điều kiện thử. Mặt khác, khả năng phân hủy sinh học của vật liệu thử lại có vẻ nhạy cảm với các điều kiện thử, thể hiện ở độ lệch lớn của các kết quả thử. Rất khó để biết đó là kết quả của việc sử dụng các loại đất khác nhau hay là do các chi phối khác, như các phòng thử nghiệm sử dụng các điều kiện thử khác nhau (nghĩa là nhiệt độ, tốc độ thoáng khí và nồng độ vật liệu khác nhau).

Việc chuẩn bị đất chuẩn được cấy trước với đất tự nhiên không ảnh hưởng đến độ lệch của phép thử liên phòng, có thể thấy điều này từ độ lệch chuẩn (xem Bảng G.2).

Các giá trị trung bình đối với đất chuẩn không khác nhiều so với giá trị trung bình đối với đất tự nhiên. Điều này củng cố thêm ý kiến là các yếu tố sinh học (nghĩa là chủng vi sinh vật) của đất tự nhiên là yếu tố liên quan và cũng quan trọng khi đất được sử dụng là nguồn dinh dưỡng cho đất chuẩn.

TCVN 9494:2012

Để có thể lấy lại được hợp chất khi kết thúc phép thử đối với mục đích tiến hành việc xác định cân bằng khối lượng cuối như mô tả trong Phụ lục E, thì cần phải bắt đầu phép thử với một lượng lớn vật liệu thử.

Nhìn chung, đất chuẩn giúp cho việc chuẩn hóa quy trình thử, như khi sử dụng chất nền chuẩn với kết cấu và kích thước hạt chuẩn. Cụ thể đất chuẩn có ích khi sử dụng đất có kích cỡ lớn.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6226 (ISO 8192), Chất lượng nước – Thử sự ức chế khả năng tiêu thụ oxy của bùn hoạt hóa (*Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge*).
 - [2] TCVN 6634 (ISO 8245), Chất lượng nước – Hướng dẫn xác định cacbon hữu cơ tổng số (TOC) và cacbon hữu cơ hòa tan (DOC) (*Water quality – Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)*).
 - [3] TCVN 6858 (ISO 11266) Chất lượng đất – Hướng dẫn thử trong phòng thí nghiệm đối với quá trình phân hủy sinh học của các chất hữu cơ trong đất ở điều kiện hiếu khí (*Soil quality – Guidance on laboratory testing for biodegradation of organic chemicals in soil under aerobic conditions*).
 - [4] TCVN 9493-2 (ISO 14855-2), Xác định khả năng phân hủy sinh học hiếu khí hoàn toàn của vật liệu chất dẻo trong các điều kiện của quá trình tạo compost được kiểm soát – Phương pháp phân tích cacbon dioxide sinh ra – Phần 2: Phương pháp đo trọng lượng của cacbon dioxide sinh ra trong phép thử quy mô phòng thí nghiệm.
 - [5] ASTM 5988, *Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting*.
 - [6] EU project FAIR-CT98-3919, *New functional biopolymer-natural fibre-composites from agricultural resources*.
 - [7] EU project AIR2-CT93-1099, *Biodegradability of bioplastics: prenormative research, biorecycling and ecological impacts*.
-