

TCVN 6621 : 2000

ISO 7827 : 1994

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – ĐÁNH GIÁ SỰ PHÂN HUỶ SINH
HỌC HIẾU KHÍ "CUỐI CÙNG" CỦA CÁC HỢP CHẤT HỮU
CƠ TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC – PHƯƠNG PHÁP
PHÂN TÍCH CACBON HỮU CƠ HOÀ TAN (DOC)**

*Water quality – Evaluation an aqueous medium of the
"ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds –
Method by analysis of dissolved organic cacbon (DOC)*

HÀ NỘI -2000

Lời nói đầu

TCVN 6621 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 7827 : 1994

TCVN 6621 : 2000 do Ban Kỹ thuật Tiêu chuẩn TCVN/TC 147 Chất lượng nước biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành

Chất lượng nước – Đánh giá sự 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)

Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds – Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC)

Cảnh báo: Chú ý an toàn - Bùn và nước cống hoạt hóa chứa nhiều mầm bệnh nguy hiểm. Cần phải cẩn thận khi làm việc với chúng. Chất thử độc và bản chất của chúng nếu chưa biết càng cẩn thận hơn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này trình bày phương pháp đánh giá sự phân hủy sinh học "cuối cùng" của các hợp chất hữu cơ ở nồng độ đã cho bằng vi khuẩn hiếu khí.

Những điều kiện trình bày trong tiêu chuẩn này không nhất thiết luôn luôn là những điều kiện tối ưu để sự phân hủy sinh học xảy ra ở mức độ cực đại.

Phương pháp này áp dụng cho các hợp chất hữu cơ mà chúng:

- hòa tan ở nồng độ đủ dùng dưới các điều kiện thử (10 mg/l đến 40 mg/l DOC);
- không bay hơi hoặc áp suất hơi có thể bỏ qua trong các điều kiện thử (xem chú thích 5 điều 8.3);
- không hấp phụ đáng kể trên thủy tinh hoặc bùn hoạt hóa (xem chú thích 6 điều 8.3);
- không ức chế vi sinh vật ở nồng độ đã chọn. Tác dụng ức chế có thể xác định theo 8.3 hoặc bằng phương pháp khác [thí dụ TCVN 6226: 1996 (ISO 8192)].

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 6226: 1996 (ISO 8192 : 1986) Chất lượng nước - Thử sự ức chế tiêu thụ oxy bởi bùn hoạt hóa.

TCVN 6634: 2000 (ISO 8245 : 1987) Chất lượng nước - Hướng dẫn xác định cacbon hữu cơ tổng số (TOC).

ISO 9408 : 1991 Chất lượng nước - Đánh giá sự phân hủy sinh học "cuối cùng" của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước - Phương pháp xác định yêu cầu oxy trong máy thở kín.

TCVN 6489: 1999 (ISO 9439 : 1990) Chất lượng nước - Đánh giá sự phân hủy sinh học "cuối cùng" của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước - Phương pháp phân tích cacbon dioxyt được giải phóng.

ISO 9887 : 1992 Chất lượng nước - Đánh giá sự phân hủy sinh học của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước - Phương pháp bùn hoạt nửa liên tục (SCAS).

ISO 9888 : 1991 Chất lượng nước - Đánh giá sự phân hủy sinh học của các hợp chất hữu cơ trong môi trường nước - Phương pháp thử tĩnh (phương pháp Zahn - Wellens).

3 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, những định nghĩa sau đây được áp dụng:

3.1 Phân hủy sinh học "cuối cùng": Mức phân hủy sinh học đạt được khi chất thử được sử dụng hoàn toàn bởi vi sinh vật để tạo ra cacbon dioxit, nước, muối khoáng và tế bào mới của vi sinh vật (sinh khối).

3.2 Phân hủy sinh học sơ cấp: Mức phân hủy sinh học đạt được khi chất thử chưa bị vô cơ hóa nhưng đã có thay đổi về cấu trúc do hoạt động của vi sinh vật.

3.3 Nồng độ chất rắn lơ lửng (của bùn hoạt hóa): Lượng chất rắn thu được khi lọc hoặc ly tâm một thể tích bùn trong những điều kiện riêng và sấy ở 105 °C đến khối lượng không đổi.

4 Nguyên tắc

Xác định sự phân hủy sinh học các hợp chất hữu cơ như vi sinh vật hiếu khí bằng cách dùng môi trường thử. Hợp chất hữu cơ là nguồn cacbon duy nhất và là năng lượng trong môi trường. Nồng độ ban đầu của hợp chất cacbon hữu cơ là trong khoảng 10 mg/l và 40 mg/l.

Khi cần thì có thể dùng nồng độ trên 40 mg/l.

Đo cacbon hữu cơ hòa tan (DOC) khi bắt đầu (ngày 0) và khi kết thúc sự thử (ngày thứ 28 hoặc hơn nếu cần) và ít nhất ở ba khoảng thời gian ở giữa.

Xác định phần trăm giảm DOC ở mỗi khoảng. Đánh giá sự phân hủy sinh học dựa trên số liệu này.

Phân tích riêng có thể cho thông tin thêm về phân hủy sinh học ban đầu.

5 Môi trường thử

Ủ tiến hành trong tối hoặc ánh sáng khuếch tán, ở nơi kín, nhiệt độ được duy trì ở 20 °C đến 25 °C và không có hơi độc với vi sinh vật.

6 Thuốc thử

Chỉ dùng thuốc thử tinh khiết phân tích.

6.1 Nước cất hoặc nước loại ion, chứa ít hơn 10 % lượng DOC ban đầu được đưa vào để thử.

6.2 Môi trường thử

6.2.1 Thành phần

6.2.1.1 Dung dịch a)

Kali dihydrophosphat khan (KH_2PO_4).....	8,5 g
Dikali hydrophosphat khan (K_2HPO_4).....	21,75 g
Dinatri hydrophosphat ngậm hai nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	33,4 g
Amoni clorua (NH_4Cl).....	0,5 g
Nước cất (6.1) làm đầy đến	1000 ml.

Chú thích 1 – Kiểm tra thành phần đúng của môi trường được bằng cách đo pH và giá trị này phải là 7,4.

6.2.1.2 Dung dịch b)

Hoà tan 22,5 g magiê sunphat ngậm 7 phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) trong 1000 ml nước (6.1).

6.2.1.3 Dung dịch c)

Hòa tan 27,5 g canxi clorua (CaCl_2) khan trong 1000 ml nước (6.1).

6.2.1.4 Dung dịch d)

Hòa tan 0,25 g sắt (III) clorua ngậm 6 phân tử nước ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) trong 1000 ml nước (6.1). Chuẩn bị dung dịch này trước khi dùng.

Chú thích 2 - Không cần pha dung dịch này trước khi sử dụng nếu thêm 1 giọt axit clohidric (HCl) đặc hoặc axit ethylendiamin tetra (EDTA) 0,4 g/l.

TCVN 6621: 2000

6.2.2 Chuẩn bị

Đối với 1 lit môi trường thử, bổ sung vào 500 ml nước (6.1) các dung dịch sau:

- 10 ml dung dịch a);
- 1 ml mỗi dung dịch b) đến d).

Làm thành 1000 ml bằng nước.

7 Thiết bị, dụng cụ

Dụng cụ thủy tinh phải rửa cẩn thận, đặc biệt là không chứa chất hữu cơ hoặc chất độc.

Dụng cụ phòng thí nghiệm là

7.1 Máy, đủ nhạy để đo cacbon hữu cơ hòa tan [xem TCVN 6634: 2000 (ISO 8245)].

7.2 Máy ly tâm

7.3 Thiết bị lắc, để thoáng khí và trộn.

7.4 pH mét

7.5 Bình nón, dung tích thích hợp (thí dụ 2000 ml).

7.6 Thiết bị lọc, với màng lọc cỡ lỗ từ 0,2 đến 0,45 μm , nó hấp phụ hợp chất hữu cơ hoặc giải phóng hợp chất cacbon ở mức tối thiểu.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị dung dịch thử

8.1.1 Dung dịch chất thử

Chuẩn bị dung dịch gốc chất thử trong nước (6.1) hoặc trong môi trường thử (6.2). Pha loãng một lượng thích hợp dung dịch này trong môi trường thử để đạt nồng độ cacbon hữu cơ cuối cùng trong khoảng 10 mg/l và 40 mg/l.

8.1.2 Dung dịch chất đối chứng

Chuẩn bị dung dịch gốc chất đối chứng (một chất hữu cơ đã biết sự phân hủy sinh học như natri axetat, natri benzoat, anilin) bằng cách tương tự 8.1.1 để thu được nồng độ cacbon hữu cơ cuối cùng trong khoảng 10 mg/l và 40 mg/l.

8.1.3 Dung dịch để kiểm tra sự ức chế

Chuẩn bị trong môi trường thử (6.2) chất thử và chất đối chứng ở nồng độ như 8.1.1 và 8.1.2.

8.2 Chuẩn bị cấy

Chuẩn bị vi khuẩn để cấy sao cho thu được quần thể vi sinh vật có đủ hoạt tính phân hủy sinh học.

Chú thích 3 – Trong một vài trường hợp có thể dùng các vi khuẩn đã cấy tăng sinh trước (pre-exposed) để cấy, miễn sao phải ghi rõ trong kết quả thử (thí dụ phần trăm phân hủy sinh học bằng x %) và phương pháp cấy tăng sinh trước được ghi chi tiết trong báo cáo thử nghiệm

Loại vi khuẩn này có thể thu được từ sự thử phân hủy sinh học trong phòng thí nghiệm dưới những điều kiện khác nhau [thí dụ thử Zahn-Wellens (ISO 9888) và SCAS (ISO 9887)] hoặc từ mẫu lấy ở nơi có các điều kiện môi trường thích hợp (thí dụ ở những trạm xử lý các hợp chất tương tự hoặc nơi ô nhiễm).

Dùng một thể tích thích hợp để cấy (xem chú thích 4).

Chú thích 4 – "Thể tích thích hợp" nghĩa là

- đủ quần thể vi khuẩn để gây ra đủ hoạt tính phân hủy sinh học;
- phân hủy chất đối chứng ở phần trăm đã định;
- cho 10^3 đến 10^6 tế bào hoạt động/ml;
- không gây quá 30 mg/l chất rắn lơ lửng trong hỗn hợp cuối cùng.

Hàm lượng DOC trong phần cấy phải nhỏ hơn 10 % hàm lượng DOC đưa vào từ hợp chất thử (thí dụ < 4 mg/l ở nồng độ chất thử 40 mg/l). Nếu cần và nếu có thể thì rửa phần cấy.

8.2.1 Cấy từ nước thải thứ cấp

Lấy chất cấy từ nước thải thứ cấp của một trạm xử lý, hoặc trạm thí nghiệm làm việc chủ yếu với nước thải sinh hoạt. Nếu cần thì làm đặc chất cấy bằng lọc hoặc ly tâm. Trộn đều và giữ phần cấy ở điều kiện thoáng khí, dùng trong ngày lấy.

Từ phần đã lấy, chuẩn bị cấy như sau:

- để lắng khoảng 1 h;
- lấy một thể tích thích hợp ở phần trên để cấy.

8.2.2 Cấy từ bùn hoạt hóa

Lấy bùn hoạt hóa từ bể sục khí của trạm xử lý hoặc từ trạm thí nghiệm làm việc chủ yếu với nước thải sinh hoạt. Trộn đều và để thoáng khí, dùng trong ngày lấy.

Trước khi dùng hãy xác định nồng độ chất rắn lơ lửng. Nếu cần thì làm đặc bùn bằng cách để lắng sao cho thể tích bùn thêm vào mẫu thử là nhỏ nhất. Thêm một thể tích thích hợp để chất rắn lơ lửng đạt 30 mg/l ở hỗn hợp cuối cùng.

TCVN 6621: 2000

8.2.3 Cấy từ nước mặt

Lấy nước mặt thích hợp. Nếu cần thì lọc hoặc ly tâm. Để ở nơi thoáng và dùng trong ngày lấy.

Lấy thể tích thích hợp để cấy.

8.3 Thử

Chọn một số bình nón (7.5) thể tích thích hợp (thí dụ 2000 ml, hoặc loại khác cũng có thể dùng) để có:

- ít nhất 2 bình thử (kí hiệu F_T) chứa 1000 ml dung dịch thử (8.1.1);
- ít nhất 2 thử trắng (kí hiệu F_B) chứa 1000 ml môi trường thử (6.2);
- ít nhất 1 bình dùng để kiểm tra phương pháp (kí hiệu F_C) chứa 1000 ml dung dịch chất đối chứng (8.1.2);
- một bình (nếu cần) để kiểm tra hiệu ứng ức chế của chất thử (kí hiệu F_I) chứa 1000 ml dung dịch 8.1.3;
- nếu cần để kiểm tra sự giảm phi sinh học thì dùng 1 bình (kí hiệu F_S) chứa 1000 ml dung dịch 8.1.1 nhưng không được cấy, làm triệt khuẩn bằng cách thêm, ví dụ như 1ml/l dung dịch chứa 10 g/l thuỷ ngân (II) clorua $HgCl_2$ hoặc chất độc vô cơ thích hợp khác, để triệt hoạt tính của vi khuẩn. Nếu phân tích các chất rất dễ phân hủy thì thêm cùng một lượng chất độc đó sau khi phép thử đã bắt đầu được 2 tuần lễ (xem chú thích 5 và 6).

Chú thích –

- 5 Bằng cách so sánh phần trăm giảm của bình F_I và F_S có thể xác định xem chất thử có đang qua quá trình bị giảm các chất hữu cơ hay không, do cơ chế phi sinh học hay do cơ chế hóa lý như hấp phụ và giải hấp. Các kết quả cần ghi vào báo cáo.
- 6 Khi cấy bằng bùn hoạt hóa, chất thử có thể bị hấp phụ mạnh trên bùn. Có thể kiểm tra điều đó bằng cách thử như bình F_S nhưng có cấy (8.2). Chỉ có chất tinh khiết hoặc gần tinh khiết được thử, nhưng nếu hỗn hợp được thử thì chứng tỏ hấp phụ chọn lọc các thành phần có thể xảy ra.

Tiến hành cấy các bình F_T , F_B , F_C và nếu cần cả bình F_I với một thể tích thích hợp (8.2) và trộn lượng chứa trong các bình (xem chú thích 4). Nói chung 1 ml đến 10 ml chất cấy là đủ cho 1000 ml dung dịch thử.

Trong khi thử, giữ các bình trên thiết bị lắc (7.3) và để ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C.

Để trừ phần nước thất thoát do bay hơi thì trước khi thử mẫu cần kiểm tra thể tích môi trường, và nếu cần thì bổ sung bằng nước (6.1).

Khi bắt đầu thử (ngày 0) và kết thúc (ngày 28) và ít nhất 3 lần ở khoảng trung bình (thí dụ ngày 7, 14, 21) lấy một thể tích nhỏ từ các bình F_T , F_B , F_C và nếu cần cả F_I . Có thể đo ở khoảng thời gian ngắn hơn hoặc tiến hành thử ở thời gian lớn hơn 28 d. Khi bắt đầu và kết thúc thử, lấy mẫu từ bình F_S . Nếu bình F_S được cấy (xem chú thích 6 và 7) thì lấy mẫu sau 0 ngày và 1 ngày. Lọc các phần mẫu này qua màng lọc (7.6) hoặc nếu có sự hấp phụ trên màng thì ly tâm ở 40 000 m/s² trong 15 min.

Đo nồng độ DOC trong các mẫu ít nhất hai lần cho mỗi thời kì và mỗi bình. Để có thông tin thêm về sự phân hủy sinh học đầu tiên có thể làm những phân tích riêng. Nồng độ đo trong dung dịch thử ở ngày đầu (ngày 0) được dùng như nồng độ bắt đầu trong tính toán.

Cuối cùng nếu mức độ phân hủy đã đủ (> 80 %) và không đổi trước 28 d thì sự thử được xem như kết thúc ở đó. Cũng có thể kéo dài sự thử quá từ 1 tuần đến 2 tuần nếu sự phân hủy là rõ ràng nhưng chưa đạt giá trị không đổi.

Khi đo cacbon hữu cơ bị trì hoãn đến 48 h thì giữ mẫu ở 4 °C, ở nơi tối và trong bình kín đậy nắp. Nếu các mẫu được giữ quá 48 h thì để ở - 18 °C . Có thể thêm chất độc vô cơ, thí dụ 20 ml/l dung dịch thủy ngân (II) clorua (HgCl₂) 10 g/l để hạn chế hoạt tính vi khuẩn và để ở 4 °C.

9 Tính toán và biểu thị kết quả

9.1 Tính toán

Cho mỗi bình thử, xác định phần trăm giảm của cacbon hữu cơ hòa tan D_t được tính theo công thức sau

$$D_t = \left(1 - \frac{\rho_t - \rho_{Bt}}{\rho_0 - \rho_{B0}}\right) \times 100$$

trong đó

ρ_0 là giá trị DOC trung bình ở thời điểm 0 của bình thử F_T , tính bằng miligam trên lít

ρ_{B0} là giá trị DOC trung bình ở thời điểm 0 của bình thử trắng F_B , tính bằng miligam trên lít

ρ_t là giá trị DOC trung bình ở thời điểm t của bình thử F_T , tính bằng miligam trên lít

ρ_{Bt} là giá trị DOC trung bình ở thời điểm t của bình thử trắng F_B , tính bằng miligam trên lít

Làm tròn kết quả phần trăm.

Chú thích

7 Sự giảm vô sinh (bình F_S) có thể cũng tính bằng phương trình trên, nhưng không chú ý đến giá trị trắng (nếu F_S được cấy để kiểm tra độ hấp phụ thì quan sát giá trị trắng). Nếu thấy sự giảm hợp chất hữu cơ lớn thì có thể không có sự khác nhau giữa sự giảm phi sinh học và sinh học. Khi đó thì những phép thử dựa trên các thông số đặc trưng cho quá trình sinh học cần được làm, như thử bằng máy đo hô hấp (ISO 9408) hoặc thử sự sinh ra CO₂ [TCVN 6489: 1999 (ISO 9439)].

8 Sự giảm của hỗn hợp chất thử và chất đối chứng trong kiểm tra ức chế (bình F_I) có thể được tính bằng cùng công thức. Nếu sự giảm hỗn hợp ít hơn 35 % trong 14 ngày thì chất thử được xem là độc và ức chế sự phân hủy sinh học của chất đối chứng. Trường hợp này cần lặp lại sự thử ở nồng độ nhỏ hơn của chất thử hoặc nuôi cấy.

9.2 Biểu thị kết quả

Lập bảng sự giảm phần trăm DOC cho mỗi khoảng nồng độ và mỗi bình thử. Nếu kết quả tương tự ở phép thử kép (xem 10.1) thì vẽ đường cong sự giảm trung bình theo thời gian (xem thí dụ ở phụ lục A).

Một vài thông số của sự phân hủy có thể được xác định từ đường cong này: thời gian trễ, thời gian phân hủy và mức phân hủy cực đại như đã viết trong 9.2.1 đến 9.2.3. Nếu chất thử không giảm đáng kể phi sinh học (thí dụ bằng hấp phụ) và đường cong có dạng điển hình với pha giảm và thời gian trễ thì hãy qui định sự giảm DOC đo được cho phân hủy sinh học.

9.2.1 Thời gian trễ t_1

Trên hầu hết các đường cong phân hủy ta thấy có thời gian trễ. Thời gian trễ thường được định nghĩa là thời gian kể từ khi cấy đến khi DOC giảm ít nhất 10 % giá trị ban đầu. Thời gian trễ thường thay đổi và độ tái lập thấp. Ghi thời gian trễ theo ngày.

9.2.2 Mức phân hủy cực đại

Mức phân hủy cực đại được định nghĩa là mức mà trên đó không xảy ra sự phân huỷ tiếp theo trong quá trình thử.

9.2.3 Thời gian phân hủy t_2

Thời gian phân hủy t_2 được định nghĩa là thời gian ở cuối t_1 cho đến khi đạt được 90 % mức phân hủy cực đại. Ghi thời gian phân hủy theo ngày.

10 Giá trị của sự thử

10.1 Phép thử được xem là có giá trị khi bình thử chứa cùng nồng độ chất thử và cấy thì khác biệt giữa giá trị phân huỷ tìm thấy ít hơn 20 % sự giảm DOC ở cuối phép thử. Nếu không như vậy thì phải lặp lại phép thử.

10.2 Các kết quả thử được xem là có giá trị khi thử với một trong các chất đối chứng thì phần trăm phân hủy sau 14 ngày phải lớn hơn 70 %. Nếu không như vậy thì lặp lại phép thử.

11 Báo cáo kết quả

Báo cáo phải gồm những thông tin sau

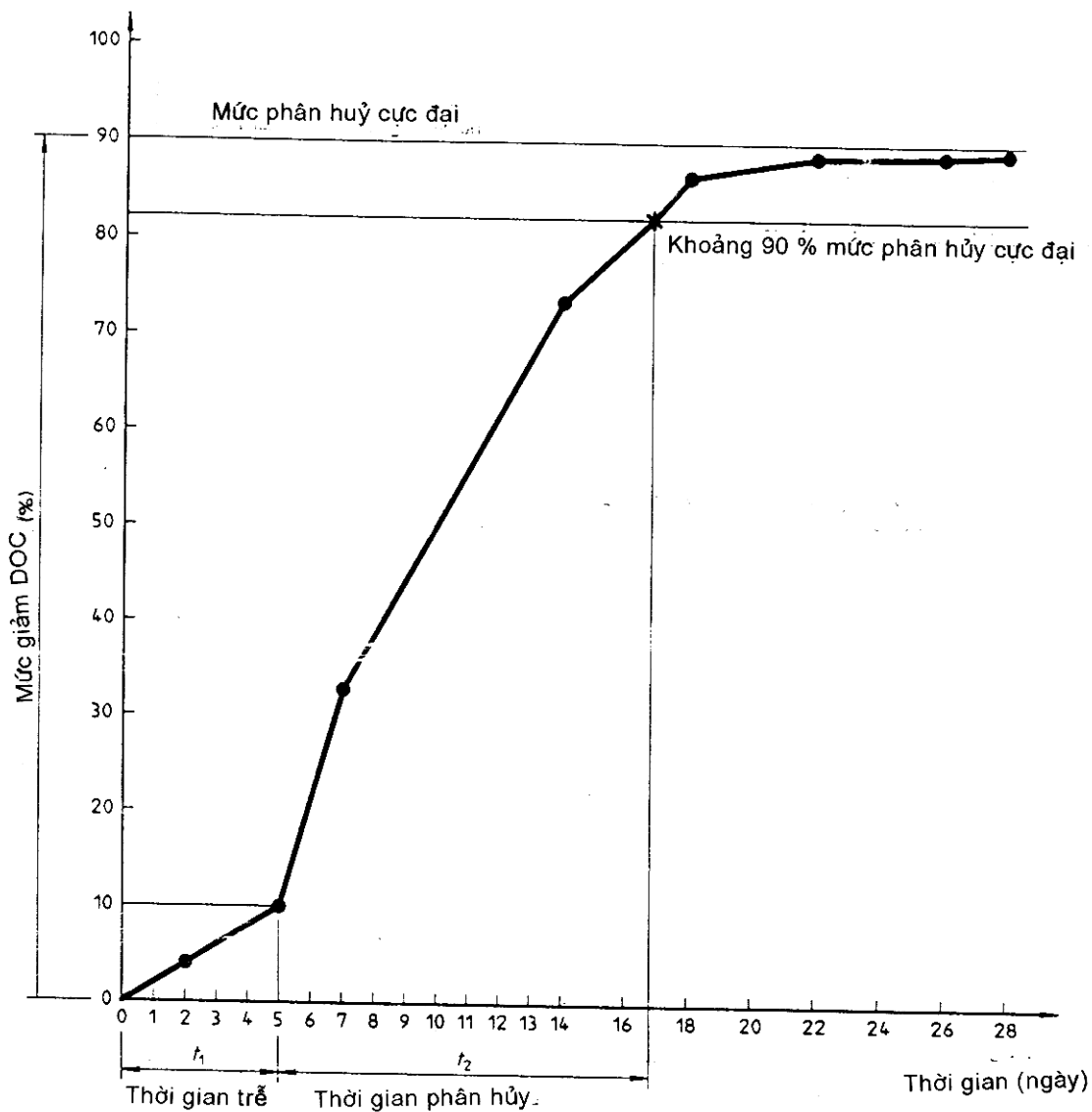
- a) trích dẫn tiêu chuẩn này;
- b) mọi thông tin để nhận dạng chất thử;
- c) mọi số liệu (thí dụ ở dạng bảng) thu được và đường cong phân huỷ;

- d) nồng độ chất thử đã dùng và giá trị DOC ở nồng độ đó;
- e) tên chất đối chứng đã dùng và sự phân huỷ thu được với chất này;
- f) nguồn, đặc tính, nồng độ hoặc thể tích chất cấy đã dùng và thông tin về mọi xử lý trước;
- g) những đặc tính chính của máy phân tích DOC đã dùng;
- h) nhiệt độ ủ của phép thử;
- i) phần trăm phân huỷ thu được ở bình F_s nếu có làm (kiểm tra sự giảm vô sinh);
- j) phần trăm phân huỷ thu được ở bình F_1 (thử độc tố) và công bố độc tố trong hợp chất thử;
- k) lý do loại bỏ sự thử (xem mục 10);
- l) mọi thay đổi so với phương pháp này và mọi tình huống có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(tham khảo)

Đường cong phân hủy điển hình



Hình A.1