

ICS 83.080.01

G 31



中华人民共和国国家标准

GB/T 32106-202X / ISO 14853:2016

塑料 在水性培养液中最终厌氧生物分解能力的测定 通过测量生物气体产物的方法

Plastics — Determination of the ultimate anaerobic biodegradation of plastic materials in an aqueous system — Method by measurement of biogas production

(IDT ISO 14853:2016)

征求意见稿

2025-8-26

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准使用翻译法等同采用ISO 14853-2016《塑料 水性培养液中塑料最终厌氧生物分解率的测定 采用测定生物气体的方法》。

本标准代替GB/T 32106-2015，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 范围和中修改了试验周期为90天；
- 删除了引用文件；
- 5.2增加了磷酸二氢钾；
- 5.6增加了样品要求；
- 7.4中参比材料组数量增加至3组；
- 7.7新增IC测试过程；
- 8.3中公式5.62修改为56.2；
- 9.3中明确了参比材料60d后生物分解率>70%。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由全国生物基材料及降解制品标准化技术委员会（TC380）归口。

本标准起草单位：扬州惠通科技股份有限公司、深圳光华伟业股份有限公司、浙江华发生态科技有限公司、北京工商大学、惠通北工生物科技（北京）有限公司、北京丰德兰志包装技术有限公司、安徽华驰环保科技有限公司、北京微构工场生物技术有限公司、浙江海正生物材料股份有限公司、合肥恒鑫生活科技股份有限公司、宁波家联科技股份有限公司、富岭科技股份有限公司、安徽丰原生物科技股份有限公司、广东崇熙环保科技有限公司、彤程化学（中国）有限公司、重庆市联发塑料科技股份有限公司、深圳市正旺环保新材料有限公司、惠州俊儿塑料科技有限公司、深圳万达杰环保新材料股份有限公司、江西轩品新材料有限公司、漳州绿塑新材料有限公司、营口正大实业有限公司、扬州惠通新材料有限公司、漳州杰安塑料有限公司、四川大学、清华大学、浙江绿禾生态科技股份有限公司、北京永华晴天科技发展有限公司、轻工业塑料加工应用研究所。

本标准主要起草人：张建纲、杨义浒、孙元正、刁晓倩、付烨、沈坤良、徐景美、汪纯球、徐绚明、陈志明、梁伟、张福祥、周义刚、江桂兰、胡新福、纪传侠、魏杰、赵燕超、周久寿、张坚洪、赵英杰、蒋苏臣、郑伟春、魏达、王鹏、许燕龙、刘志忠、王玉忠、田国强、吴刚、郭宝华、宓可钧、刘赞桥、李字义。

本文件所代替文件的历次版本发布情况为：

GB/T 32106，2015年首次发布。

引 言

随着塑料使用量的增加，其回收和处置已变成一个热点，回收是首选处理方式，但塑料要完全回收是困难的。一些塑料如渔具、农业用覆盖膜和水溶性的聚合物等就比较难回收利用，常常从封闭的垃圾处理循环系统中泄漏到环境中去，采用生物分解塑料是解决这类环境问题的有效途径之一。被送至厌氧消化处理设备的塑料产品或包装材料应尽可能地生物分解，所以测定这些材料在厌氧环境中的生物分解能力就显得很重要。

警告：废水、活性污泥、土壤和堆肥中可能含有潜在致病菌，因此，处理时应采取适当的防护措施。处理毒性试验化合物或性质未知的化合物时须特别小心。

塑料 在水性培养液中最终厌氧生物分解能力的测定

通过测量生物气体产物的方法

1 范围

本标准规定了在水性培养液中测定塑料最终厌氧生物分解能力的一种试验方法。

本标准采用的试验条件不一定为产生最大生物分解率的最佳条件。尽管污泥在工业厌氧消化设备可以有更长的保留时间，但通常为25~30d，本标准规定试验周期可以至90d。

本方法适用于以下材料：

天然和/或合成聚合物、共聚物及它们的混合物；

含有如增塑剂、颜料等添加物的塑料；

水溶性聚合物；

在试验条件下，不会抑制接种物中微生物活性的材料。抑制作用可应用抑制控制或其他适当方法来测定（见ISO 13641）。如果试验材料对接种物有抑制作用，可在较低的试验浓度下使用其他接种物或已预曝置的接种物。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

ISO 8245 水质 总有机碳（TOC）和溶解有机碳（DOC）的测定指南（Water quality — Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon （DOC））

ISO 13641（所有部分）：水质 厌氧菌产气量的抑制测定(Water quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

最终厌氧生物分解 ultimate anaerobic biodegradation

在无氧条件下，有机化合物被微生物分解为二氧化碳（CO₂）、甲烷（CH₄）、水（H₂O）及其所含元素的矿化无机盐以及新的生物质。

3.2

初级厌氧生物分解 primary anaerobic biodegradation

化合物在微生物作用下发生结构变化（转变）导致特定性能丧失。

3.3

消化污泥 digested sludge

废水和活性污泥混合物在约 35℃的厌氧消化器中进行接种，以降低生物质和气味并提高污泥的脱水能力。

注：消化污泥由厌氧发酵菌以及产生二氧化碳和甲烷的产甲烷菌共同组成。

3.4

消化污泥的悬浮固体浓度 concentration of suspended solids in digested sludge

将已知体积的活性污泥过滤或离心，在105℃温度下干燥至恒重所得到的固体量。

3.5

溶解有机碳 dissolved organic carbon; DOC

溶解在水中无法以特别相分离方法（如40 000 $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ 转速离心分离15 min或孔径0.2 μm ~0.45 μm 过滤膜过滤）而分离的有机碳。

3.6

无机碳 inorganic carbon; IC

溶解或分散于液体水相中的无机碳以及污泥沉淀后上清液中可重获的无机碳。

3.7

总干固体 total dry solids

将已知体积的材料或堆肥在105℃温度下干燥至恒重所得到的固体量。

3.8

生物气体理论释放量 theoretical amount of evolved biogas; Thbiogas

有机试验材料在厌氧条件下完全生物分解时所能生成的生物气体（ $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ ）理论最大值，可由分子式计算得到，以标准条件下每毫克试验材料释放出的生物气体的毫升数表示（ mL 生物气体/ mg 试验材料）。

3.9

二氧化碳理论释放量 theoretical amount of evolved carbon dioxide; Th CO_2

有机试验材料完全氧化时所能生成的二氧化碳理论最大值，可由分子式计算得到，以每毫克试验材料释放出的二氧化碳的毫克数表示（ $\text{mg CO}_2 / \text{mg}$ 试验材料）。

3.10

甲烷理论释放量 theoretical amount of evolved methane; Th CH_4

有机试验材料完全还原时所能生成的甲烷理论最大值，可由分子式计算得到，以每毫克试验材料释放出的甲烷的毫克数表示（ $\text{mg CH}_4 / \text{mg}$ 试验材料）。

3.11

迟滞阶段 lag phase

从试验开始一直到适应（或选定了）降解微生物产生，并且试验材料的生物分解程度已经增加至最大生物分解率10%时所需要的天数。

3.12

平稳阶段 plateau phase

从生物分解阶段结束至试验结束时所需的天数。

3. 13

生物分解阶段 biodegradation phase

从迟滞阶段结束至达到最大生物分解率的90 %时所需的天数。

3. 14

最大生物分解率 maximum level of biodegradation

试验中，试验材料不再发生生物分解时的生物分解率，以百分率（%）表示。

4 原理

本标准是在水性培养液中、无氧条件下测定塑料的生物分解能力。首先将消化污泥使用前进行洗涤，使其含有极少量无机碳（IC），并稀释至总干固体浓度为1 g/L~3 g/L。将有机碳（OC）浓度为20 mg/L~200 mg/L的试验材料与消化污泥在温度为35 ℃±2 ℃的密闭容器、厌氧条件下培养一段时间（通常不超过90d）。在此条件下，试验材料会生物分解为二氧化碳（CO₂）和甲烷（CH₄），CO₂和CH₄的产生会导致试验容器顶部压力或体积增加，所以可以根据测定压力或体积的增加量来获得所释放的生物气体量。由于在试验条件下，一部分二氧化碳会溶解在水性培养液中或转换成碳酸氢盐或碳酸盐，这部分二氧化碳所含的有机碳也是试验材料有机碳生物分解的一部分。这部分的二氧化碳所含的碳元素含量，在试验结束时可通过测定水性培养液中无机碳（IC）的方法来获得。以上转化成生物气体和无机碳的总碳量，和试验材料本身所含的碳总量（可通过测量或分子式计算得到）的百分比，即为试验材料的生物分解百分率。

试验的过程可以通过不间断地测定生物气体来进行监控。作为附加信息，初级厌氧生物分解率可以通过试验前后特定性能测定来获得。

本标准规定的方法主要目的是测定厌氧条件下塑料的生物分解能力，如果要用于测定厌氧条件下碳回收率，则可以参考附录G的规定进行。

5 试剂和材料

5. 1 蒸馏水或去离子水

DOC含量应小于2 mg/L。

5. 2 试验培养基

所有试剂为分析纯。

按照以下规定的组分含量，制备试验培养基。

无水磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄	0.27 g
十二水合磷酸氢二钠	Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	1.12 g
氯化铵	NH ₄ Cl	0.53 g
二水合氯化钙	CaCl ₂ •2H ₂ O	0.075 g
六水合氯化镁	MgCl ₂ •6H ₂ O	0.10 g
四水合氯化亚铁	FeCl ₂ •4H ₂ O	0.02 g
刃天青（氧气指示剂）		0.001 g
九水合硫化钠	Na ₂ S•9H ₂ O	0.1 g
无水磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄	0.27 g
微量元素原液（可选项）		10 mL
维生素原液（可选项）	1号维生素溶液	0.5 mL

2号维生素溶液	0.5 mL
加无氧水定容至	1L
如果需要的话，可用无机酸或碱调节培养基的pH 7.0 ± 0.2。	
为确保厌氧条件，使用前向水中通氮气20min并立即使用。	
使用新制备的硫化钠或使用前进行洗涤和干燥以保证其充足的还原能力。为确保严格的厌氧条件，推荐在培养基制备后加入少量连二亚硫酸钠至培养基变为无色。使用浓度应小于等于10 mg/L，超过此浓度可能产生抑制效应。	

5.3 微量元素溶液（可选项）

建议向试验培养基中补充下列微量元素以改善厌氧分解过程，尤其是使用低接种物浓度时：		
四水合氯化锰	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.05 g
硼酸	H ₃ BO ₃	0.005 g
氯化锌	ZnCl ₂	0.005 g
二水合氯化铜	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.003 g
二水合钼酸钠	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.001 g
六水合氯化钴	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g
六水合氯化镍	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g
亚硒酸钠	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	0.005 g
二水合钨酸钠	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.002 g
加无氧水定容至		1L
每升试验培养基使用10 mL微量元素溶液。		

5.4 维生素溶液（可选项）

5.4.1 1号维生素溶液

4-氨基苯甲酸	40 mg
D-维生素H	10 mg
溶于热水（5.1）	500 mL
冷却后加入：	
泛酸，钙盐	50 mg
二盐酸吡哆胺	150 mg
二氯化硫胺	1.0 mg
使用既不吸附也不释放大量有机碳的膜过滤器（孔径为0.45 μm）过滤溶液，并在4℃的暗室中保存。	
每升试验培养基使用0.5 mL维生素溶液。	

5.4.2 2号维生素溶液

氰钴维生素（维生素B12）	10 mg
溶于水（5.1）	100 mL
使用既不吸附也不释放大量有机碳的膜过滤器（孔径为0.45 μm）过滤溶液，并在4℃的暗室中保存。	
每升试验培养基使用0.5 mL维生素溶液。	

5.5 防护溶液

氯化钠	200 g
溶于水（5.1）	1000 mL
用柠檬酸进行酸化	5 g
加入pH指示剂如溴酚蓝或甲基橙以确保试验期间溶液保持酸性。	

5.6 试验材料

试验材料通常作为固体加入，有机碳浓度为20mg/L~200 mg/L。试验材料尽可能使用粉末形状。

试验材料最好以粉末形式使用，但也可以薄膜、碎片、碎片或成型制品的形式引入。试验材料的形式和形状可能会影响其生物降解性。如果要比较不同种类的塑料材料，最好使用类似的形状。如果试验材料以粉末形式使用，则应使用已知窄尺寸分布的颗粒。建议粒径分布最大为250 μm 。此外，所使用的测试设备的尺寸可能取决于测试材料的形式。

不抑制微生物的塑料的生物分解能力可在有机碳浓度大于200 mg/L时测定，此时，需确保培养基的缓冲能力和矿化无机盐含量充足。

5.7 参比材料

使用一种已知可以厌氧生物分解聚合物（如聚 β -羟基丁酸酯、纤维素或PEG 400）作为参比材料。

尽可能使参比材料的形状、尺寸、溶解性和浓度与试验材料相当。

使用与试验材料相同的方法准备参比材料。

5.8 抑制控制（可选项）

将试验材料和参比材料分别加入到装有试验培养基（5.2）的容器中，浓度与5.6和5.7中的规定一致。或者，上清液中的IC可以通过溶解的IC以二氧化碳的形式释放来间接测定，可以在顶部空间中测量，如7.7所述。

6 仪器

6.1 实验设备

需要通用实验设备和6.1.1~6.1.2设备

6.1.1 培养器或水浴设备或沙浴设备

恒温控制在35 $^{\circ}\text{C} \pm 2$ $^{\circ}\text{C}$ 。

6.1.2 碳分析仪（可选项）

适用于无机碳含量范围为1 mg/L~200 mg/L的无机碳直接测定。

6.2 压力法测量生物气体用仪器

6.2.1 耐压玻璃试验容器

通常容量为0.1 L~1 L，均配有能承受200000 Pa压力的阻气隔膜（例见附录A）。

顶空容量应为总容量的10%~30%。若气体被定期释放，顶空容量选择10%左右合适；若气体只在试验结束后释放，顶空容量则选择30%更合适。

注：在实际的操作中，推荐使用丁基橡胶瓶塞和带螺纹的铝环封闭血清瓶。

6.2.2 压力试验装置

压力计一个，与大小合适的注射器针头相连，并配有气密的三通阀，释放多余的压力。

根据产品说明书对设备校准后再使用。

注：因为计算时设备自身的体积可忽略不记的，尽量缩减管子和阀的内部体积，减小误差是必要的。

6.3 容量法测生物气体时所需器材

6.3.1 玻璃试验容器（锥形烧瓶或玻璃瓶）

标称尺寸为0.1 L~1 L。装250 mL的溶液时，选用300 mL的容器较为适宜。为避免起泡，可在顶空预留10%~20%的体积。

容器应设置气体采样口（见附录B），并使用气密的导管将容器连接至装有酸化盐溶液（见5.5防护溶液）的带刻度的气体采集玻璃管中。标有刻度的玻璃管需与一个膨胀罐连接，该膨胀罐可上下移动，使罐内酸化溶液的液面与玻璃管内溶液的液面保持同一高度。

7 试验步骤

7.1 总则

执行以下步骤的试验内容时，应采取一定措施尽可能减少消化污泥与氧气的接触。例如，可以在充满氮气的手套箱中工作，或用氮气吹洗试验容器后再使用。

7.2 消化污泥

从主要处理生活污水的污水处理厂的消化池中收集消化污泥，确保采集到的是活性污泥。考虑到气体膨胀及安全因素，应选择高密度聚乙烯或类似材料制成的广口瓶，切勿使用玻璃瓶。将污泥装至距瓶口1cm的位置处即可，然后密封。样品运送至实验室后，可直接转移到实验室级别的消化池，然后排出多余的生物气体。

或者也可以将实验室培养的厌氧污泥用于接种。

采用污泥预培养的方法，需要减少背景气体的产生和空白的影响。污泥中无须添加任何营养物或基质，在35℃±2℃下连续消化7天。

已有研究表明，大约5天的预培养，能够有效地减少空白产生的气体，且停滞期或培养期气体不会出现过多的增长。对于难以生物分解的试验材料，可考虑采用预培养的方法得到更合适的接种液。在这种情况下，将有机碳浓度为5 mg/L-20 mg/L的试验材料加入消化后污泥中。预接种的污泥在使用前须小心清洗。在试验报告中写明是否执行过预接种步骤。

7.3 接种液的制备

在使用前清洗污泥，应将最终用于试验的培养液中无机碳的含量降至20 mg/L以内。最终，将污泥悬浮在一定体积的试验培养基（5.2）中，测定其总固体含量（3.7）。试验容器中的总固体浓度应在1 g/L~3 g/L的范围内。在执行上述操作时，应将污泥与氧气的接触降至最低（如在氮气环境下操作）。

7.4 培养液试样与对照组的制备

试验材料至少需要三组（F_T），空白对照（F_B）、阳性对照（参比材料）（F_P）至少三组。此外，还可以为每个试验材料设置抑制对照进行一组或多组的试验（F_I）（见表1）。不同的试验材料可使用相同的空白和对照同时进行试验。将7.3中制备的稀释的接种液等分并加入各容器中，这样就可以确保各容器中的总固体浓度一致（1 g/L~3 g/L）。将试验材料（5.6）和参比材料（5.7）加至相应的容器中。正常情况下，培养液试样中有机碳浓度应为100 mg/L。对于有毒性物质的试验材料，如果只考虑初级生物分解能力，有机碳浓度可能降至20mg/L，甚至更低。

注：如果采用较低的试验浓度，会导致试验结果离散程度较高。

在空白试验中，用等量的无氧水（5.1）替代试验材料进行试验。在进行试验之前，多准备一份培养液试样用于试验pH值、总固体浓度和无机碳浓度（后两者可选）。

如果需要的话，用少量稀释的无机酸或碱溶液将pH调至7.0±0.2。各试验容器中添加等量的中和剂。如果需要试验初级降解能力，从额外的试验容器中挑选一份合适的样本，并采用合适的方法检测样品中试验材料的浓度。如果培养液试样需要搅拌，在容器中放入磁力搅拌子。对于所有的试验容器（6.2.1），确保溶液的总体积（V_L）和顶空体积（V_H）是相同的。

注：V_L和V_H见第8章。

如果需要的话，可添加无氧的试验培养基（5.2）。用气密的塞子封闭容器，放入恒温箱（6.1.1）中培养。

表 1. 试样与对照试验方案

容器	试验材料	参比材料（生物可降解）	接种物
F _{T1} 试样	+		+
F _{T2} 试样	+		+
F _{T3} 试样	+		+
F _{B1} 空白			+
F _{B2} 空白			+

F _{B3} 空白			+
F _{P1} 阳性对照		+	+
F _{P2} 阳性对照		+	+
F _{P3} 阳性对照		+	+
试验前的额外分析	+		+
F _I 抑制对照（可选）	+	+	+

7.5 培养与气体检测

7.5.1 总则

污泥的培养应在密闭的容器中进行，温度恒定在35 ℃ ±2 ℃，该温度有利于厌氧消化。此外，需在实验开始前用纯氮气充满容器，去除所有的氧气。

7.5.2 气体压力测定（见附录 A）

容器在35 ℃ ±2 ℃下培养约1小时后，其中的气体达到平衡，多余的气体会被排放至空气中（例如，轮流摇晃各容器，将压力计的针头插进瓶塞，当压力计的度数为0时打开阀门）。在这个阶段或进行中途的试验时，顶空压力小于大气压力，需向容器中引入氮气重建与大气压力相当的压力环境。关闭阀门，在黑暗条件下继续培养，确保容器各个部分的温度都维持在要求的水平。

培养24 h~48 h后，观察容器内的状况。如果上清液呈现明显的粉色，此样品作废。这种颜色来自于刃天青，表明容器中有氧气的渗入。该体系可承受少量的氧气，但是较高浓度的氧气会严重抑制无氧生物分解过程。

每周都需要混合各个容器中的混合物2-3次，可采用磁力搅拌或小心摇晃容器的方法混合几分钟。每次压力试验前，也需重新混合。将注射器针头穿过容器的瓶塞，同时与压力计相连，即可测定气体压力。采用百帕作为压力单位。

通过摇晃的方式使接种物重新悬浮，以确保气体平衡。当测试试验压力时，将顶部空间中的气体维持在培养温度。谨慎操作，以防容器中的水进入注射器针头中，如果这种情况发生，需将沾水的部件弄干，并更换一个新针头。

检测生物气体的总产量可采用两种方法：1）每周试验容器内的气体压力，然后将多余的气体排入空气；2）在试验结束后测量容器内的最终压力。但是，更推荐第一种方法，这样就可以得到中途的压力读数。通过这些读数，可以判断何时终止试验并进行下一步的动力学试验。

7.5.3 利用容积测量装置进行气体测量（见附录 B）

使用一个标有刻度的玻璃管收集产生的生物气体，玻璃管通过防护溶液与大气隔绝，这样管内压力在试验过程中就能基本保持恒定（除非大气压力发生变化）。容器在35 ℃ ±2 ℃下培养约1h后，将多余的气体排放至空气中（例如，轮流摇晃各容器；将注射器针头插进瓶塞，排出气体，直到气体收集管中防护液的液面到达0刻度为止。）确保膨胀罐中防护液的液面与气体收集管中的液面保持在同一水平。取下注射器针头，继续在黑暗条件下培养污泥，并确保容器各个部分的温度均能到达要求的培养温度。

气体体积可以直接从气体收集管上读出。为确保气体体积读数是在大气压下进行的，读数前要先调整膨胀罐的位置，使罐内液面与气体采集管的液面齐平（具体操作见附录B）。实验过程中多次测量气体体积、压力及温度（通常每天一次），以确定气体的生成速率。在培养的早期阶段，应增加测量的次数，但是随着时间的推移，测量的频率可以适当减小。

7.6 试验周期

试验周期通常为 60 天。如果由压力或体积参数得到的生物分解曲线已经达到稳定状态（见 3.12），试验可以提前结束。如果正常试验周期将要结束时，还没有出现明显的平稳状态，该试验可以延长直至达到平稳状态。但是，试验的周期不应超过 90 天。

7.7 无机碳的测定

在试验的末期完成最后一次压力试验或体积试验之后，待污泥沉淀，打开各容器，立即测定上清液中无机碳的浓度（mg/L）。此处上清液无需离心或过滤（见注释）。完成无机碳的测定之后，记录pH值。对空白组、参比材料组及可选的对照组进行相同的测定。

或者，上清液中的IC可以通过释放溶解的IC作为二氧化碳间接测定，该二氧化碳可以在顶部空间中测量。在最后一次测量气体压力后，将每个测试容器中的压力调整到大气压。通过密封容器的隔膜加入浓无机酸（如1M H₃PO₄或1M H₂SO₄），将每个容器的内容物酸化至pH约1。将摇动的容器在（35±2）°C下培育约24小时，并使用压力计测量释放的二氧化碳产生的气体压力。

注：离心或过滤会导致部分溶解性CO₂的损失。如果上清液样品不能立即进行分析，可以将其密封在合适的小瓶中（不要留有顶空），于4 °C下保存，保存时间不超过2天。

在一些情况下，尤其是多个不同的试验材料采用同一组空白或对照组时，应对各组别增加试验项，即测定中途无机碳浓度。该项试验应参照以下步骤执行。

测量完气体压力或未排出多余气体前的气体增量之后，不要打开容器，而是通过注射器穿过瓶塞吸取极少量的上清液（每份样品量相等），用于测定其中的无机碳浓度。取样之后，将多余气体从容器中排出（见7.5）。

注：即使上清液的体积只有少量的减少（如1%左右），也会造成顶空体积的显著增加。如果有必要，增加8.2公式中顶空体积（V_H）的值。

7.8 特定分析

如果需要测定初级厌氧降解能力，在试验开始和结束时，需进行一些特定的分析，用试验材料进行重复测定（见7.4）。这些分析项目会造成顶空体积（V_H）与液体体积（V_L）的变化，那么在计算时应把这些变化考虑在内。

8 结果的计算与表述

8.1 顶空中碳含量

1摩尔的甲烷和1摩尔的二氧化碳各含有12g的碳元素。根据公式（1），计算一定体积的排放气体中碳的含量。

$$m = 12000 \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中，

m—一定体积排放气体中所含碳的质量，单位为毫克（mg）；

12000—碳的相对原子质量，单位为毫克（mg）；

n—气体摩尔数。

8.2 使用压力计测量生物气体时，顶空中碳含量的计算

根据气体定律，即公式（2），计算 n 值。

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中，

n—气体的摩尔数；

p—气体压力，单位为帕斯卡（Pa）；

V—气体体积，单位为立方米（m³）；

R—摩尔气体常数（8.314 J/mol·K）；

T为培养温度，单位为开尔文（K）。

根据公式（3）计算试验材料试验组的顶空中，气体产物所含碳的净重（减去空白组的平均值）。

式中，

$$m_h = \frac{12000 \times 0.1 \times (\Delta p \times V_H)}{RT} \quad \dots\dots\dots (3)$$

m_h —顶空中气体产物所含碳的净重单位为毫克（mg）；

V_H —顶空体积，单位为升（L）；

Δp —试验组容器中初始压力与最终压力差值（单位为毫巴（hbar））的平均值减去空白组平均值所得的差；

0.1—毫巴转换为帕斯卡，升转换立法米时的转换因子；

12000—碳的相对原子质量单位为毫克（mg）。

如果培育温度一直维持在正常值 35℃(308° K)，可使用公式（4）计算 m_h 值。

$$m = 0.468 \times (\Delta p \times V_H) \dots\dots\dots(4)$$

如果这个值在合适的范围内，可以绘制生物分解过程中累计的压力增值 Δp （毫巴）随时间的变化曲线。从这一变化曲线上，我们可以找到停滞期（见3.11），并确定停滞期持续的天数（曲线见附录C）

8.3 使用容积法计算顶空中碳含量

当采用容积法（如液体置换系统）确定产生的生物气体时，根据公式（2.1）、（3.1）及（4.1）计算 n 和 m_h 。

$$n = \frac{(p - p_w) \cdot V}{RT} \dots\dots\dots(2.1)$$

$$m_h = \frac{12000 \times 0.1 \times (p - p_w) \times \Delta V_H}{RT} \dots\dots\dots(3.1)$$

$$m_h = 0.468 \times (p - 56.2) \times \Delta V_H \dots\dots\dots(4.1)$$

式中，

p_w —培养温度下，水蒸汽的压力，单位为毫巴（hbar）（水蒸气压力表见附录 E）；

p —大气压力，单位为毫巴（hbar）；

56.2—35 ° C 下的水蒸气压力，单位为毫巴（hbar）；

ΔV_H —试验组容器的顶空中，初始体积与最终体积差值（单位为升（L））的平均值减去空白组的平均值所得的差；

其他符号的定义见公式（2）、（3）或（4）。

8.4 液体中无机碳的含量

根据公式（5），计算试验容器中液体的碳含量。

$$m_L = \rho_{IC,net} \cdot V_L \dots\dots\dots(5)$$

式中，

m_L —液体中无机碳的质量，单位为毫克（mg）；

$\rho_{IC,net}$ —试验末期各试验组与空白组的容器中无机碳的平均浓度，单位为毫克/升（mg/L）；

V_L —容器中液体的体积，单位为升（L）。

8.5 转化为气体的碳总量

根据公式（6），计算转化为气体的碳的总量。

$$m_t = m_h + m_L \dots\dots\dots(6)$$

式中，

m_t —转化为气体的碳的总质量，单位为毫克（mg）；

m_h 和 m_L 的定义见 8.2 和 8.4。

8.6 试验材料中的碳含量

根据公式（7）及试验材料的含碳量，计算试验材料中碳的质量。

$$m_v = \rho_{C,v} \cdot V_L \dots\dots\dots(7)$$

式中，

m_v —试验材料中碳的质量，单位为毫克（mg）；

$\rho_{C,v}$ —试验材料中碳的浓度，单位为毫克/升（mg/L）；

V_L —容器中液体的体积，单位为升（L）。

8.7 生物分解率的计算

根据公式（8），用顶空气体测量法计算生物分解率；根据公式（9），计算总的生物分解率。

$$D_h = \frac{m_h \times 100}{m_v} \dots\dots\dots (8)$$

$$D_t = \frac{m_t \times 100}{m_v} \dots\dots\dots (9)$$

式中，

D_h —顶空气体测量法得到的生物分解率（%）；

D_t —总的生物分解率（%）；

m_h 、 m_v 和 m_t 的定义分别参见 8.2、8.6 及 8.5。

9 结果的有效性

9.1 厌氧条件的维持

计算时只采用未混入氧气的容器的数据，即，溶液未变为粉色。采用正确的厌氧操作技术将氧气的污染控制到最低的水平。

9.2 降解的抑制

同时添加试验材料与参比材料的容器中产生的气体，至少应与只添加参比材料的容器所产生的气体等量。如果结果不是这样，则说明气体的生成受到了抑制。此时就需要将试验材料的浓度降低重新进行试验，但试验材料的有机碳浓度不得低于20mg/L（见7.4）。

9.3 试验的有效性

如果参比材料在稳定状态下**60d后的生物分解率大于70%（见参考文献9）**，则认为试验有效（见参考文献[4]）。如果试验结束时pH超出了7.0±1.0 的范围且生物分解不够充分，则应使用具有更强缓冲能力的试验培养基（5.2）重新进行试验。如果阳性对照组的生物分解率小于70%（根据顶空中生物气体和液体中无机碳含量进行计算），**且不同容器中参考物质的生物降解率之差大于平均值的20%**，则认定此试验无效，需用新鲜的接种液重新试验。

10 试验报告

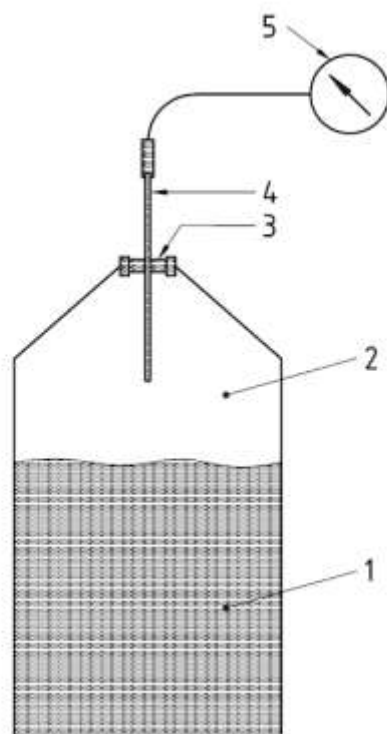
试验报告的必备信息如下：

- a) 本标准号；
- b) 用于鉴定试验材料和参比材料的所有必要信息，包括总有机碳含量、碳的理论释放量、二氧化碳理论释放量、甲烷理论释放量、化学成分与化学式（已知的）、形状、形式及样品中的含量/浓度；
- c) 烧瓶中试验材料的浓度；
- d) **如果测试为避免毒性作用而在降低的测试项目浓度下进行的，则需要提供所有可用信息；**
- e) 测量污泥产生的生物气体的具体方法（如压力测定装置或体积测量系统）及用于测量无机碳的仪器的使用情况；
- f) 采用列表形式（参见附录D）列出从试验组、空白组、阳性对照组及抑制对照组测得的所有试验结果（如压力（hPa）、体积（mL）和无机碳浓度（mg/L）），以及相应的统计处理结果；
- g) 接种物的信息，包括来源、采集和使用日期、储存方法、处理方法、针对试验材料的适应调整及其他预培养操作；
- h) 培养温度；
- i) 容器中液体的体积（ V_L ）和顶空体积（ V_H ）；

- j) 试验开始和结束时，培养液试样的pH值和无机碳含量；
- k) 如果进行了特定的分析，则需要列出试验开始和结束时试验材料的浓度；
- l) 通过顶空体积测量法绘制的生物分解曲线；
- m) 试验材料和参比材料的生物分解百分率（平均值），最终结果用一个范围表示（10%的范围），例如20%~30%；
- n) 停滞期和降解期的持续时间及试验周期。

附录 A
(资料性附录)

采用测量气体压力的增加量测定产生的生物气体的设备示例



说明：

1-试验培养液（容量 VL）；

2-顶空（容量 VH）；

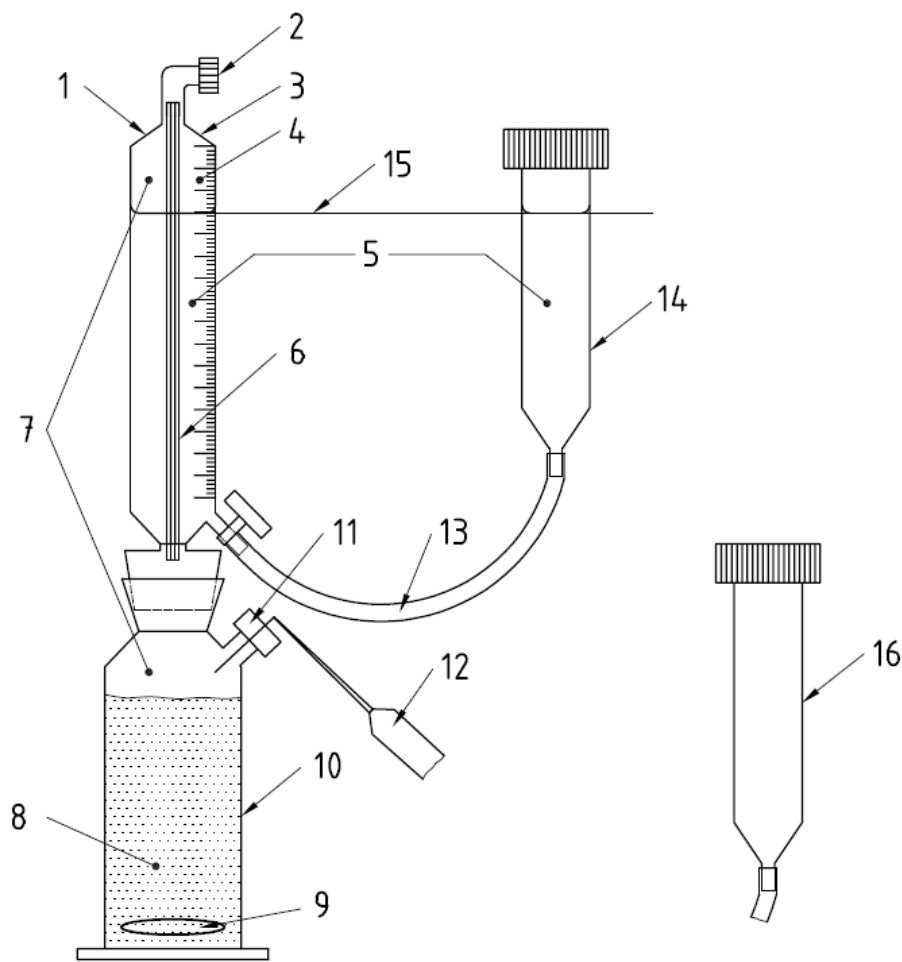
3-密封装置；

4-注射器针头；

5-压力计。

图A.1 采用测量气体压力的增加量测定产生的生物气体的设备示例

附录 B
(资料性附录)
采用容量法测定产生的生物气体的设备示例



说明：

- 1-标有刻度的气体收集玻璃管
(容量为150 mL到200 mL)；

2-气体采样口；

3-最小顶空5mL；

4-顶空气体；

5-防护溶液；

6-允许释放气体进入收集管的玻璃管；

7-顶空 (容量 V_H)；

8-试验培养液 (容量 V_L)；
- 9-磁力搅拌器；

10-试验容器 (容量为300 mL到350 mL)；

11-气体或液体采样口；

12-吹洗探针；

13-柔性连接管；

14-高度可调的防护溶液储存器 (通大气)；

15-位置0 (测量位置)；

16-位置1 (检查密封性)。

图B.1 采用容量法测定产生的生物气体的设备

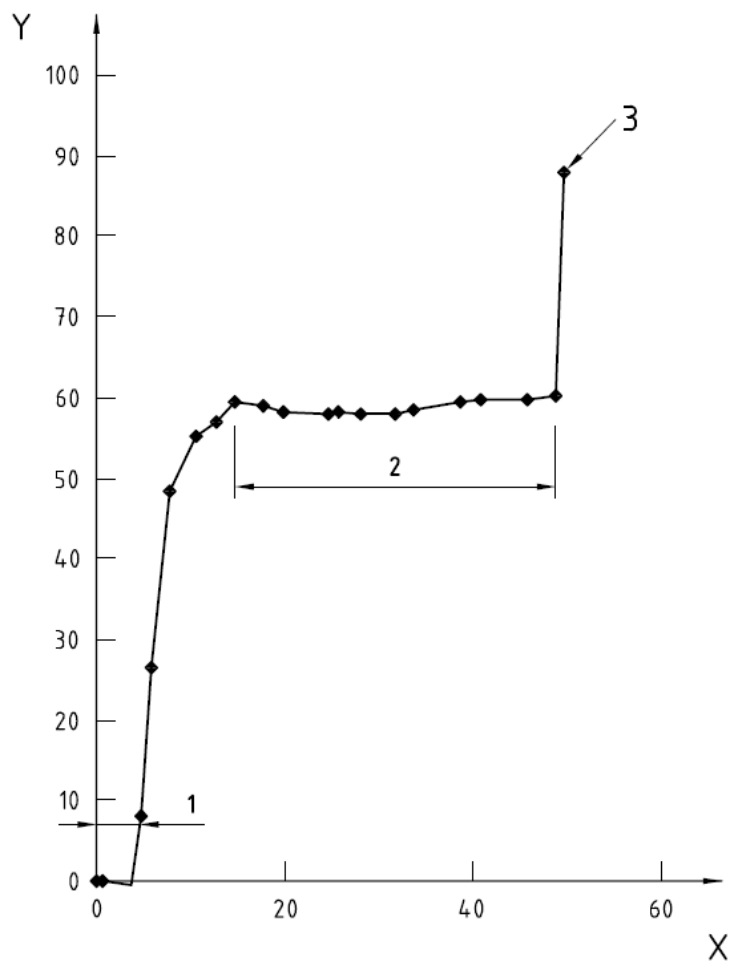
B.1 使用氮气或氩气吹洗试验容器

为了确保体系内的无氧环境，当试验容器与气体采集管相连时，在培养液表面通入无氧气体。这一步骤可通过试验容器采样口上安置的吹洗探针进行，具体方法如下。关闭气体采集管上的气体采样口，这样多余的气体就会将防护溶液推入储液罐中。然后打开气体采样口，直到防护溶液重新灌入气体采集管（但是不要灌的太满，将顶空体积维持在5mL左右）。将吹吸步骤重复2~3次。移除吹洗探针，检查容器的密闭性。

B.2 密闭性检查

在气体采集管与试验容器相连的情况下，用防护溶液填满气体采集管后，关闭气-液采集口。为了降低气体采集器中的压力，将防护液储存器（通过柔性导管与气体采集器相连）移至位置 1。如果该体系未密封，防护溶液会从气体采集管流向储存器。如果该体系不漏气，将储存器的位置升至位置 0。处于位置 0 时，储存器中防护溶液的液面与气体采集管的液面持平，此时的生物气体体积即是在大气压下测定的。

附录 C
(资料性附录)
生物分解曲线示例



说明：
X-时间（天）；
Y-生物分解率（%）；
1-迟滞阶段；
2-平稳阶段；
3-+IC

图C.1 生物分解曲线示例

附 录 D
(资料性附录)
厌氧生物分解试验数据表示例

本附录给出了采用压力（压力计）测量法和体积测量法时用的数据表。

厌氧生物分解能力试验——压力测量法用数据表格

实验室: _____ 试验材料: _____ 试验序号: _____

试验温度: _____ °C 顶部空间 (V_H): _____ (L) 液体体积 (V_L): _____ (L) 试验材料组成碳 $\rho_{C,v}$: _____ (mg/L) m_v^a _____ (mg)

表D.1 厌氧生物分解能力试验——压力测量法用数据表格

[illegible]

^a 试验容器中碳, $m_v(\text{mg})$: $m_v = p_{c,v} \times V_L$

^b 35℃培养温度下的顶空碳, m_h(mg): $m_h = 0.468(\Delta p \cdot V_H)$

^c 由测量的顶空气体量计算生物分解率: $D_h = \frac{m_h \times 100}{m_v}$

^d 液体碳, $m_L(\text{mg})$: $m_L = \rho_{IC, \text{ net}} \bullet V_L$

^e 总气体碳, $m_t(\text{mg})$: $m_t = m_h + m_L$

^f 总生物分解率, $D_t(\%)$: $D_t = \frac{m_t \times 100}{m_v}$

厌氧生物分解能力试验——容积测量法用数据表格

实验室：_____试验材料：_____试验序号：_____

试验温度：_____℃顶部空间（V_H）：_____（L）液体体积（V_L）：_____（L）试验材料组成碳 $\rho_{C,v}$ ：_____（mg/L） m_v ^a_____（mg）

表D.2 厌氧生物分解能力试验——容积测量法用数据表格

天数	大气 压 强 hPa	V ₁ (试验) 生物气 体mL	V ₂ (试验) 生物气 体mL	V ₃ (试验) 生物气 体mL	V (空白) 生物气 体mL	V ₄ (空白) 生物气 体mL	V ₅ (空白) 生物气 体mL	V ₆ (空白) 生物气 体mL	V (空白) 平均值 生物气体 mL	V (净值) 试验平均 值-空白， 生物气体 mL	△V (净值)，累 计 生物气体 mL	m _h 顶空碳 ^b mg	D _h 生物分解 率 ^c %
		$\rho_{IC,1}$ 试验 mg/L	$\rho_{IC,2}$ 试验 mg/L	$\rho_{IC,3}$ 试验 mg/L	ρ_{IC} 试验 平均值 mg/L	$\rho_{IC,4}$ 空白 mg/L	$\rho_{IC,5}$ 空白 mg/L	$\rho_{IC,6}$ 空白 mg/L	ρ_{IC} 空白 平均值 mg/L	$\rho_{IC,net}$ 试验平均 值-空白 mg/L	m _L 液体碳 ^d mg	m _t 总碳 ^e mg	D _t 总生物分 解率 ^f %
IC(结束)													
pH(结束)													

^a 试验容器中碳, $m_v(\text{mg})$: $m_v = p_{C,v} \times V_L$

^b 35℃培养温度下的顶空碳, $m_h(\text{mg})$: $m_h = 0.468 \times (p - p_w) \times \Delta V_h$ ，其中p指大气压强， p_w 指水蒸气压强

^c 由测量的顶空气体量计算生物分解率: $D_h = \frac{m_h \times 100}{m_v}$

^d 液体碳, $m_L(\text{mg})$: $m_L = \rho_{IC, net} \bullet V_L$

^e 总气体碳, $m_t(\text{mg})$: $m_t = m_h + m_L$

^f 总生物分解率, $D_t(\%)$: $D_t = \frac{m_t \times 100}{m_v}$

附 录 E
(资料性附录)
不同温度下水的蒸气压力表

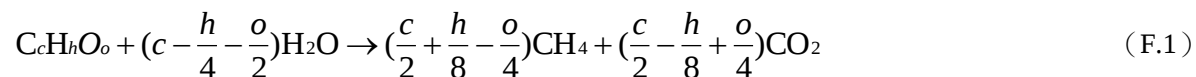
表E. 1不同温度下水的蒸气压力表

T ℃	p kPa		T ℃	p kPa
20	2.3388		31	4.4953
21	2.4877		32	4.7578
22	2.6447		33	5.0335
23	2.8104		34	5.3229
24	2.9850		35	5.6267
25	3.1690		36	5.9453
26	3.3629		37	6.2795
27	3.5670		38	6.6298
28	3.7818		39	6.9969
29	4.0078		40	7.3814
30	4.2455		41	7.7840

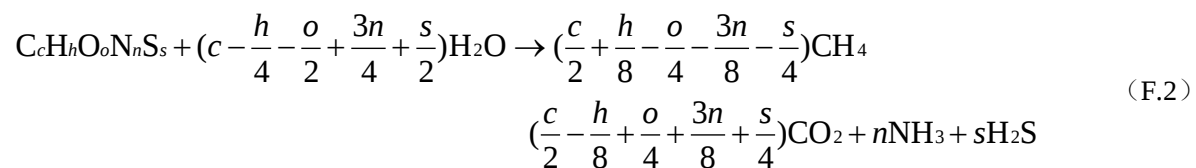
数据来源于 CRC 化学和物理手册^[11]。

附 录 F
(资料性附录)
CO₂ 与 CH₄ 理论释放量的计算

根据 Buswell 和 Mueller[2]提供的方程 (F.1), 可计算理论上 CO₂ 和 CH₄ 的最大释放量。



将方程 (F.1) 扩展为方程 (F.2), 可用于计算含有氮/硫的材料。



Buswell 和 Mueller 提出的方程不适用于 Fe₂O₃ 或 SO₄²⁻等氧化剂存在的情况下。

附 录 G

（资料性附录）

碳回收率的测定示例

G.1 原理

试验材料的组成通常比其他低分子量的物质要复杂得多。释放出的二氧化碳量的测定不足以定性和定量材料的生物分解能力。在生物分解过程中，微生物会产生新的生物物质，试验材料中的一部分碳转化为生物物质而不是被生物化学氧化。 CO_2 产量、无机碳含量及 CH_4 产量等试验参数通常无法完全达到理论值，即使在试验材料完全被降解的情况下也是如此。因此，较低的测量值有时会让我们误以为降解不够充分。由于厌氧菌的繁殖效率较低，产生的新生物物质低于需氧培养体系，否则可用来估计试验开始和结束时的生物物质。然而，厌氧环境下生物物质的测量与计算通常难以得到令人满意的结果。为了更准确计算生物分解能力，可进行碳回收率的测定。

回收率的测定涉及以下碳含量的测定：以 CO_2 气体形式排放的碳、水溶性无机碳、甲烷气体形式排放的碳、新生物物质中的碳、降解过程中产生的水溶性有机代谢物（DOC）及未降解的高分子材料中的碳含量。将这些碳的总和与试验前材料样本本身含有有机碳含量进行比较，可得出碳回收率。

G.2 试验步骤

G.2.1 测定生物气体量（ CO_2 和 CH_4 ）

G.2.2 测定水相中无机碳含量

G.2.3 测定过滤后的培养液或上清液（如 ISO 8245）中溶解性有机碳的含量，计算有机碳的增加量尝试鉴别形成溶解性有机碳的物质，从而判断是否产生水溶性代谢物。

试验开始和结束时都要测定溶解性有机碳含量。如果存在水溶性聚合物，应通过特定检测才能确定其是否为样品被降解的部分。当试验结束时测得的溶解性有机碳含量非常高，须仔细检测。因为这表明存在代谢物或聚合物组分，但是它们可能是在环境中积累的。

G.2.4 在未添加试验材料时，测定培养基中的生物物质；在培养期结束时测定培养液中的生物物质。采得的样品应具有代表性。使用膜滤器过滤样品或在 $40\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ 下将样品离心（见 3.5）。

选取合适的方法，测定滤液或者离心液中的生物物质。测定或假设生物物质中的碳含量，并根据试验开始和结束时的差值来计算有机碳的增加量。

注：采用蛋白质测定、脂质/DNA 测定、或代谢活性测定等间接方法很难准确计算出生物物质中的碳含量。由于样品中较高的生物物质，通过间接方法得到的测量值会对回收率的计算带来较大误差。例如，在使用蛋白质测定法时，通常的做法是将蛋白质与碳的比例设定为 1:1，但是这个比例会根据生理因素和营养因素发生变化，因而计算结果并不准确。事实上，对于计算生物物质中的碳含量，目前尚无令人满意的直接方法。

G.2.5 在试验结束时，使用所有剩余的培养液测定高分子材料的含量。虽然这一测定较为困难，但还是可以通过直接（聚合物的特定分析）或间接地方法实现。直接法即为提取并测定残余高分子材料的含量，通过已知成分来计算其中的碳含量。间接法是指将洗净吹干后的残渣称重，测定总有机碳含量。然后减去生物物质中的碳含量（通过生物物质测定获得的数据），即可得到残余高分子材料中的碳含量。

G.3 回收率的计算

根据公式（G.1）、（G.2）和（G.3），计算各试验容器中通过生化反应产生的碳含量（ CO_2 、IC 和 CH_4 ）（即包括试验材料产生以及排放到顶空气体中的碳含量，以及溶解在液体中的碳含量）。

$$C_{\text{CO}_2} = (C_{\text{CO}_2})_{T1 / T2 / T3} - \text{Mean}(C_{\text{CO}_2})_{B1 / B2 / B3} \dots\dots\dots (\text{G.1})$$

$$C_{\text{CH}_4} = (C_{\text{CH}_4})_{T1 / T2 / T3} - \text{Mean}(C_{\text{CH}_4})_{B1 / B2 / B3} \dots\dots\dots (\text{G.2})$$

$$C_{IC} = (C_{IC})_{T_1 / T_2 / T_3} - \text{Mean}(C_{IC})_{B_1 / B_2 / B_3} \dots\dots\dots (G.3)$$

式中,

C_{CO_2} , C_{IC} , C_{CH_4} , 为加入的试验材料经生化反应转化而成的 CO_2 、 IC 及 CH_4 的含量, 单位为毫克(mg);

$T_1/T_2/T_3$, 表示试验容器 Nos. 1 至 3;

$B_1/B_2/B_3$, 表示空白组的容器 Nos. 1 至 3。

如公式 (G.4) 所示, 通过比较培养实验开始和结束时的生物质 ($C_{BiO (start)}$ 和 $C_{BiO (end)}$) 的差异, 计算各个装有 CBIO 试验材料的容器中生物质所含碳的增加量。

$$C_{BIO} = C_{BIO(end)}T_1 / T_2 / T_3 - C_{BIO(start)}T_1 / T_2 / T_3 \dots\dots\dots (G.4)$$

式中,

C_{BIO} 为加入的试验材料经生化反应转化成生物质的碳的含量, 单位为毫克 (mg);

$C_{BIO(end)}$ 为试验结束时容器中的生物质所含的碳含量, 单位为毫克 (mg);

$C_{BIO(start)}$ 为试验开始时容器中生物量所含的碳含量, 单位为毫克 (mg)。

根据公式 (G.5), 通过比较试验开始和结束时溶解性有机碳的浓度 ($C_{DOC (start)}$ 和 $C_{DOC(end)}$), 来计算培养过程中各试验容器中溶解性有机碳的增加量 C_{DOC} 。

$$C_{DOC} = C_{DOC(end)}T_1/T_2/T_3 - C_{DOC(start)}T_1/T_2/T_3 \dots\dots\dots (G.5)$$

式中,

C_{DOC} 为加入的试验材料经生化反应转化为 DOC 的碳的含量, 单位为毫克 (mg);

$C_{DOC(end)}$ 为试验结束时试验容器中溶解性有机碳的含量, 单位为毫克 (mg);

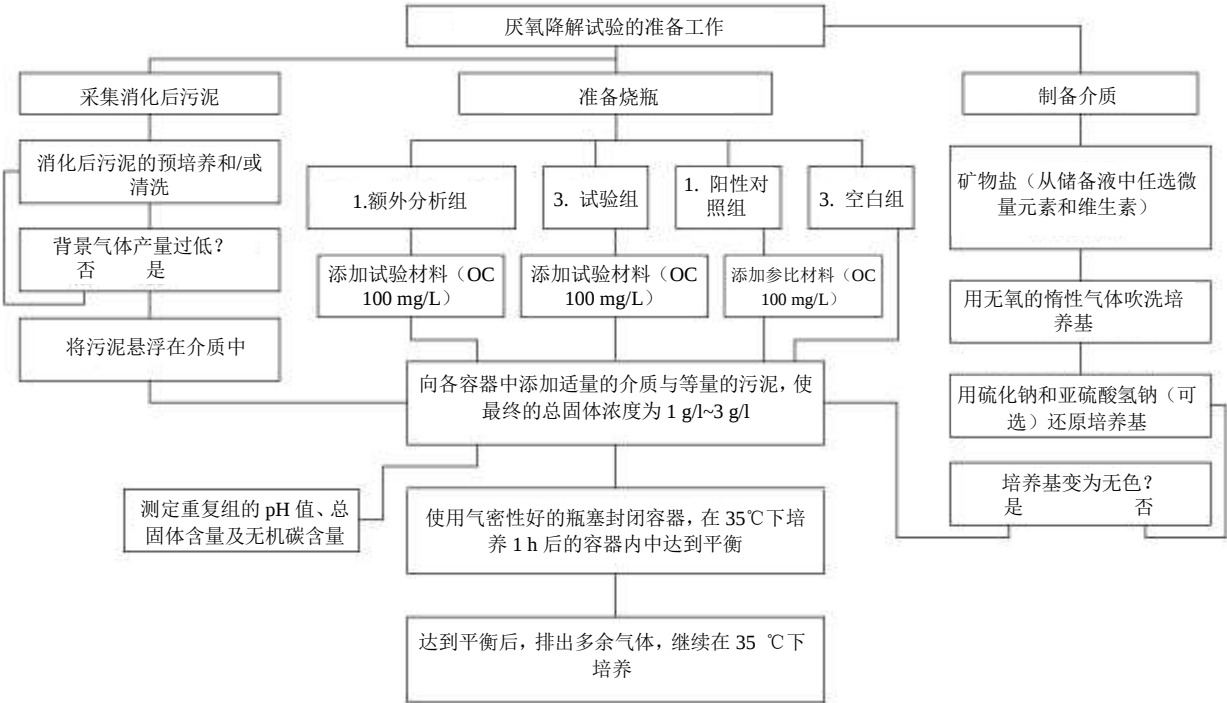
$C_{DOC (start)}$ 为试验开始时试验容器中溶解性有机碳的含量, 单位为毫克 (mg)。

在试验结束时测定各烧瓶中残留的高分子材料的有机碳含量 C_{POL} , 单位为毫克 (mg)。

根据公式 (G.6), 通过 T_1 - T_3 容器中测得的不同形式碳的总和 (C_{CO_2} , C_{IC} , C_{CH_4} , C_{BIO} , C_{DOC} 及 C_{POL}), 计算回收率 C_{REC} , 即不同形式碳的总和与加入的总碳量 (C_{MAT}) 的比值。

$$C_{REC} = \frac{C_{CO_2} + C_{IC} + C_{CH_4} + C_{BIO} + C_{DOC} + C_{POL}}{C_{MAT}} \cdot 100 \dots\dots\dots (G.6)$$

附录 H
(资料性附录)
流程图



参 考 文 献

ISO 7872

ISO 8245

ISO 11734

ISO 11923

ISO 13641

[1] BIRCH, R.R., BIVER, C., CAMPAGNA, R., GLEDHILL, W.E., PAGGA, U., STEBER, J., REUST, H., and BONTINCK, W.J. (1989): Screening of chemicals for anaerobic biodegradation, *Chemosphere*, **19**, pp. 1527-1550 (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988)

[2] BUSWELL, A.M., and MUELLER, H.F. (1952): Mechanism of methane fermentation, *Ind. Eng. Chem.*, **44**, pp. 550-552

[3] PAGGA, U., and BEIMBORN, D.B. (1993): Anaerobic biodegradation test for organic compounds, *Chemosphere*, **27**, pp. 1499-1509

[4] JOERG, R., MUELLER, W.R., and PANTKE, M. (1998): Draft report of a round-robin test for aqueous biodegradability of plastics under strict anaerobic conditions, ISO/TC 61

[5] BRYANT, M.P. (1972): Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria, *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, pp. 1324-1328

[6] LIDE, D.R., and FREDERIKSE, H.P.R. (eds) (1994-95): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 75th ed., CRC Press

[7] ISO 7827, Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the «ultimate» aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC)

[8] ISO 11734, Water quality — Evaluation of the «ultimate» anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production

[9] ISO 11923, Water quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters
