

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6969:2001

PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỘ PHÂN HỦY SINH HỌC CỦA CHẤT TẨY RỬA TỔNG HỢP
Testing method for biodegradability of synthetic detergent

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp thử độ phân huỷ sinh học của chất hoạt động bề mặt anion và không ion trong chất tẩy rửa tổng hợp

Chất hoạt động bề mặt anion gồm: ankylbenzen sunfonat mạch thẳng (LAS), ankylbenzen sunfonat mạch nhánh (BAS), ankylsunfat, ankylethoxysunfat, ankyl sunfonat, (ankan sunfonat, parafin sunfonat), anken sunfonat (alpha-olefin sunfonat).

Chất hoạt động bề mặt không ion gồm: ete polyoxyetylen ankylphenol, ete polyoxyetylen ankyl, este glycol polyoxyetylen béo, este của axit béo polyoxyetylen sorbitan, ester của axit béo polyoxyetylen glycerin và amid của axit béo alkanol.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 4851 - 89 (ISO 3696-1987) Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

TCVN 5491 - 91 (ISO 8212-1986) Chất hoạt động bề mặt và chất tẩy rửa. Lấy mẫu trong sản xuất.

TCVN 5454 : 1999 (ISO 607-1980) Chất hoạt động bề mặt và chất tẩy rửa □ Phương pháp phân chia mẫu.

3. Phương pháp thử

3.1 Quy định chung

Hoá chất dùng để phân tích là loại TKPT hoặc TKHH

Nước cất sử dụng theo TCVN 4851 - 89 (ISO 3696-1987).

Cân phân tích có độ chính xác tối thiểu 0,001 g .

3.2 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo TCVN 5454 - 1999 và TCVN 5491 - 1991 với lượng mẫu trung bình tối thiểu là 500 g.

Mẫu thí nghiệm được cho vào bình sạch, khô, có nút kín, ngoài bình có nhãn ghi :

- tên chất tẩy rửa;
- tên nơi sản xuất;
- ngày sản xuất;
- ngày và nơi lấy mẫu;
- ký hiệu tiêu chuẩn.

3.3 Nguyên tắc phương pháp thử

Chất hoạt động bề mặt trong điều kiện môi trường nhất định được phân huỷ sau một khoảng thời gian nhờ cấy các vi sinh vật từ nguồn bùn hoạt hoá trong tự nhiên.

Hàm lượng chất hoạt động bề mặt anion trước và sau khi phân huỷ được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ cực đại phức của nó với methylen xanh sau khi chiết bằng clorofoc ở bước sóng □ = 650 nm bằng cuvet thủy tinh.

Hàm lượng chất hoạt động bề mặt không ion trước và sau khi phân huỷ được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ cực đại phức của nó với coban amonithiocyanat sau khi chiết bằng benzen ở bước sóng $\lambda = 322 \text{ nm}$ bằng cuvet thạch anh.

Hàm lượng chất bề mặt không ion như amid của axit rượu béo được xác định bằng phương pháp đo thể tích khí.

3.4 Hoá chất và thuốc thử:

- amoni clorua;
- dikali hidrophotphat;
- magie sunfat;
- kali clorua;
- sắt (II) sunfat;
- cao men;
- natri dodecylbenzen sunfonat mạch thẳng, khả năng phân huỷ sinh học 99%, khối lượng phân tử 348,5, độ sạch > 95 %;
- chất chuẩn cho chất hoạt động bề mặt không ion: Polyoxyethylen-n-dodecyl ether, khả năng phân huỷ sinh học 99 %, khối lượng phân tử 494,6, độ sạch > 98 %;
- chất chuẩn cho chất hoạt động bề mặt anion: Natri lauryl sunfat, khối lượng phân tử trung bình 288,6 $\times 2$, độ sạch > 98 %;
- bùn hoạt hoá: giống vi sinh vật để thử nghiệm lấy từ nguồn tự nhiên như nước sông hồ hoặc từ nước cống rãnh dân dụng. Bùn hoạt hoá có hàm lượng rắn lơ lửng 10 - 20 g/l và chỉ được dùng trong vòng năm giờ sau khi lấy (số lượng con vi khuẩn phải đạt 106 - 107).

3.5 Thiết bị và dụng cụ

- máy lắc ngang có biên độ 5 - 10 cm, tần số lắc 100 - 130 lần trong một phút hoặc máy lắc tròn 230 - 200 vòng/phút;
- bình nuôi cấy để lắc dung tích 1000 ml có nút đậy bằng bông đã được khử trùng trước trong vòng 1 - 2 giờ ở 170 °C.

3.6 Giai đoạn chuẩn bị

3.6.1 Môi trường cơ bản

Thành phần môi trường cơ bản như sau:

NH₄Cl 3,0 g
K₂HPO₄ 1,0 g
MgSO₄. 7H₂O 0,25 g
KCl 0,25 g
FeSO₄. 7H₂O 0,002 g
cao men 0,30 g
nước 1 lít

Cách pha môi trường cơ bản sử dụng ngay: Hoà tan lần lượt NH₄Cl, K₂HPO₄, KCl, FeSO₄. 7H₂O, trong khoảng 800 ml nước và điều chỉnh đến pH = 7,2 $\pm$ 0,2 bằng dung dịch HCl hay NaOH loãng. Cao men và MgSO₄ được hoà tan trong 200 ml nước, sau đó đổ vào dung dịch trên và khuấy. Cao men chỉ được thêm vào ở dạng khô ngay trước khi dùng. Điều quan trọng là phải sử dụng môi trường cơ bản ngay sau khi chuẩn bị để tránh nhiễm khuẩn.

Cách pha môi trường cơ bản sử dụng sau 8 giờ: Hoà tan lần lượt NH_4Cl , K_2HPO_4 , KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 trong khoảng 800 ml nước và điều chỉnh đến $\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl hay NaOH loãng. Khử trùng dung dịch ở nhiệt độ $122-125^\circ\text{C}$, áp suất 110-130 KPa khoảng 20 phút và để nguội. Cao men được hoà tan trong 200 ml nước cũng đã được khử trùng và để nguội, sau đó đổ vào dung dịch trên và khuấy.

3.6.2 Giai đoạn cấy truyền

3.6.2.1 Chuẩn bị ba bình cấy truyền, dung tích 1000 ml, có các thành phần như sau:

	Bình mẫu trắng	Bình mẫu đối chứng	Bình mẫu thử
Môi trường cơ bản, ml	500	500	500
Chất hoạt động bề mặt, dung dịch tiêu chuẩn, mg/l	0	30	0
Chất hoạt động bề mặt, dung dịch mẫu thử lấy từ mục 3.7, mg/l	0	0	30
Bùn hoạt hoá, ml	5	5	5

Điều chỉnh đến $\text{pH} = 6 - 8$ trong các bình, đặt cả ba bình đã được nút bằng bông lên một máy lắc có khả năng thông khí và khuấy trộn tạo điều kiện môi trường tốt cho nuôi cấy chuyển. Duy trì nhiệt độ ở $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Thời gian cấy chuyển trong 72 giờ.

3.6.2.2 Sau 72 giờ lắc trên, lặp lại như quá trình 3.6.2.1 trong ba bình dung tích 1000 ml khác, có các thành phần như sau:

	Bình mẫu trắng	Bình mẫu đối chứng	Bình mẫu thử
Môi trường cơ bản, ml	500	500	500
Chất hoạt động bề mặt, dung dịch tiêu chuẩn, mg/l	0	30	0
Chất hoạt động bề mặt, dung dịch mẫu thử lấy từ mục 3.7, mg/l	0	0	30
Dung dịch lấy từ mục 3.6.2.1, ml	5	5	5

Điều chỉnh đến $\text{pH} = 6 - 8$ trong các bình, đặt cả ba bình đã được nút bằng bông lên một máy lắc có khả năng thông khí và khuấy trộn tạo điều kiện môi trường tốt cho nuôi cấy chuyển. Duy trì nhiệt độ ở $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Thời gian cấy chuyển trong 72 giờ. Dung dịch 3.6.2.2 này dùng để phân huỷ mẫu thử.

3.7 Tách chất hoạt động bề mặt từ sản phẩm chất tẩy rửa tổng hợp

Cân khoảng 50 g mẫu (chính xác đến 0,1 g) vào cốc thuỷ tinh dung tích 500 ml, thêm vào đó 40 ml etanol. Cô mẫu trên bếp cách thuỷ đến khô sau hoà tan mẫu bằng 300 ml etanol, đây cốc bằng mặt kính đồng hồ, đun nóng trên bếp cách thuỷ và khuấy cho mẫu phân tán hoàn toàn. Lọc mẫu qua giấy lọc vào cốc dung tích 250 ml đã được sấy khô và cân trước đến khối lượng không đổi m_0 (chính xác đến 0,1 g). Cô nhẹ cốc trên bếp cách thuỷ đến còn khoảng 50 ml.

Tiếp tục quá trình hoà tan trên hai lần nữa, mỗi lần với 200 ml etanol. Thu gộp tất cả dung dịch lọc vào cốc đang cô trên và cô nhẹ tiếp cốc này trên bếp cách thuỷ cho đến khi chỉ còn lại cặn. Sấy cốc này ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi. Để nguội cốc trong bình hút ẩm, sau 30 phút đem cân là giá trị m_1 (chính xác đến 0,1 g).

Hoà tan 1,00 g chất hoạt động bề mặt ở phần cặn trong bình định mức dung tích 1000 ml. Dung dịch này dùng để xác định độ phân huỷ sinh học chất hoạt động bề mặt trong mẫu thử.

3.8 Quá trình phân huỷ sinh học của chất hoạt động bề mặt

Chuẩn bị ba bình nuôi cấy, dung tích 1000 ml, có các thành phần như sau:

	Bình mẫu trắng	Bình mẫu đối chứng	Bình mẫu thử
Môi trường cơ bản, ml	500	500	500
Chất hoạt động bề mặt, dung dịch tiêu chuẩn, mg/l	0	30	0
Chất hoạt động bề mặt, dung dịch mẫu thử lấy từ mục 3.7, mg/l	0	0	30
Dung dịch lấy từ mục 3.6.2.2, ml	5	5	5

Điều chỉnh đến pH = 6 - 8 trong các bình, đặt cả ba bình đã được nút bằng bông lên một máy lắc có khả năng thông khí và khuấy trộn tạo điều kiện môi trường tốt cho nuôi cấy chuyển. Duy trì nhiệt độ ở 25 ± 30C. Thời gian nuôi và phân huỷ chất hoạt động bề mặt trong vòng 8 ngày.

3.9 Phương pháp xác định

Để thu được kết quả phân huỷ sinh học, lấy một phần mẫu chất hoạt động bề mặt ở phần 3.8 từ ba bình trước khi phân huỷ sinh học và sau 8 ngày phân huỷ sinh học đem xác định. Thể tích mẫu xác định, mẫu đối chứng và mẫu trắng phải giống nhau.

3.9.1 Mẫu chứa chất hoạt động bề mặt anion

3.9.1.1 Nguyên tắc: Phương pháp dựa trên đo độ hấp thụ màu của phức chất hoạt động bề mặt anion với methylen xanh trong pha clorofoc ở bước sóng $\lambda = 650 \text{ nm}$.

3.9.1.2 Hoá chất và thuốc thử:

– dung dịch đệm borac pH = 10: trộn 0,05 M natri tetraborac với 0,1 M NaOH theo tỉ lệ (1 : 1);

– axit sunfuric, 0,5 M;

– methylen xanh, dung dịch 0,25 % pha trong nước;

– dung dịch tiêu chuẩn chất hoạt động bề mặt anion:

+ dung dịch A (1 mg/ml): Hoà tan 1,00 g natri lauryl sunphat vào bình định mức dung tích 1000 ml bằng nước, định mức tới vạch và lắc kỹ.

+ dung dịch B (0,01 mg/ml): Hút 10,0 ml dung dịch A vào bình định mức dung tích 1000 ml, định mức tới vạch bằng nước và lắc kỹ.

3.9.1.3 Thiết bị và dụng cụ:

– máy so màu, bước sóng $\lambda = 650 \text{ nm}$;

– cuvet 10 mm, 50 mm;

– phễu chiết, dung tích 250 ml, 2000 ml;

– bình định mức, dung tích 50 ml.

3.9.1.4 Làm sạch các dung dịch

Cho 500 ml nước, 100 ml đệm borax và 50 ml dung dịch methylen xanh vào phễu chiết A dung tích 2000 ml.

Cho 1000 ml nước, 100 ml đệm borax và 50 ml dung dịch methylen xanh vào phễu chiết B dung tích 2000 ml.

Đồng thời cả hai phễu đều được chiết với 100 ml clorofoc trong vòng một phút để rửa pha nước, sau đó loại bỏ pha clorofoc. Lặp lại quá trình rửa pha nước này bằng cách chiết tiếp hai lần nữa, mỗi lần với 30 ml clorofoc và loại bỏ pha clorofoc.

Cho vào phễu chiết B 30 ml axit sunfuric 0,5 M.

Các dung dịch ở phễu chiết A và B được chuyển dần vào các phễu chiết nhỏ a, b dung tích 250ml.

3.9.1.5 Dựng đường chuẩn

Cho lần lượt 0; 0,010; 0,020; 0,040; 0,060; 0,080; 0,10; 0,12; 0,15 mg chất hoạt động bề mặt natri lauryl sunfat vào phễu chiết a đã có sẵn 50 ml dung dịch lấy từ phễu A và thêm vào đó 15 ml clorofoc. Lắc phễu trong vòng một phút với tốc độ hai lần lắc trong một giây, để yên phễu cho đến khi phân lớp, chuyển pha clorofoc sang phễu b đã có sẵn 100 ml dung dịch lấy từ phễu B rồi lắc trong vòng một phút, sau khi phân lớp chuyển pha clorofoc qua phễu lọc có lớp bông đã tẩm trước bằng clorofoc vào bình định mức dung tích 50 ml.

Cho thêm vào phễu a 15 ml clorofoc và tiếp tục chiết như trên và chuyển pha clorofoc gộp vào bình định mức trên. Định mức tới vạch bằng clorofoc, lắc kỹ. Đo màu của dung dịch trong vòng ba giờ, ở bước sóng $\lambda = 650 \text{ nm}$, bằng cuvet 10 mm, dung dịch so sánh là clorofoc. Dựng đường chuẩn.

3.9.1.6 Đo màu

Lấy một phần mẫu thử trong từng bình ở điều 3.8 trước và sau 8 ngày phân huỷ sinh học, sao cho mẫu có khoảng từ 0,02 - 0,1 mg chất hoạt động bề mặt anion vào phễu chiết a đã có sẵn 50 ml dung dịch lấy từ phễu A và thêm vào đó 15 ml clorofoc. Lắc phễu trong vòng một phút với tốc độ hai lần lắc trong một giây, để yên phễu cho đến khi phân lớp, chuyển pha clorofoc sang phễu b đã có sẵn 100 ml dung dịch lấy từ phễu B rồi lắc trong vòng một phút, sau khi phân lớp chuyển pha clorofoc qua phễu lọc có lớp bông đã tẩm trước bằng clorofoc vào bình định mức dung tích 50 ml.

Cho thêm vào phễu a 15 ml clorofoc và tiếp tục chiết như trên và chuyển pha clorofoc gộp vào bình định mức trên. Định mức tới vạch bằng clorofoc, lắc kỹ. Đo màu của dung dịch trong vòng ba giờ, ở bước sóng $\lambda = 650 \text{ nm}$, bằng cuvet 10 mm, dung dịch so sánh là clorofoc.

3.9.1.5 So sánh mẫu với đường chuẩn

Từ đường chuẩn và số đo độ hấp thụ của mẫu tính được hàm lượng chất hoạt động bề mặt anion có trước và sau 8 ngày phân huỷ sinh học.

3.9.1.6 Trong trường hợp chất hoạt động bề mặt anion không đo ngay có thể thêm 1 ml formalin trong 100 ml dung dịch mẫu.

3.9.2 Mẫu chứa chất hoạt động bề mặt không ion

3.9.2.1 Nguyên tắc: Phương pháp dựa trên đo độ hấp thụ của phức chất hoạt động bề mặt không ion với coban amonithiocyanat trong pha benzen ở bước sóng $\lambda = 322 \text{ nm}$.

3.9.2.2 Hoá chất và thuốc thử:

- natri clorua, tinh thể;
- coban amonithiocyanat: Hoà tan 620 g amonithiocyanat và 280 g coban nitrat ngâm sáu phần tử nước trong 1000 ml nước;
- benzen;
- dung dịch tiêu chuẩn chất hoạt động bề mặt không ion:

+ dung dịch A 1 mg/ml: Hoà tan 1,00 g polyetylenoxit-n-dodecyl ete (tốt nhất mẫu sử dụng chất hoạt động bề mặt không ion loại nào thì pha dung dịch tiêu chuẩn theo không ion loại đó) trong bình định mức dung tích 1000 ml bằng nước, định mức tới vạch và lắc kỹ.

+ dung dịch B 0,01 mg/ml: Hút 10,0 ml dung dịch A vào bình định mức dung tích 1000 ml, định mức tới vạch bằng nước và lắc kỹ.

3.9.2.3 Thiết bị và dụng cụ:

- máy so màu;
- cuvet thạch anh 10 mm, 50 mm;
- phễu chiết, dung tích 300 ml;
- bình định mức, dung tích 25 ml.

3.9.2.4 Dụng cụ chuẩn

Lần lượt cho vào phễu chiết 0; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00 mg chất hoạt động bề mặt không ion, thêm nước đến thể tích 100 ml. Cho vào phễu 15 ml dung dịch coban amonithiocyanat, 35 g natri clorua và lắc trong một phút, để phễu đứng yên khoảng 15 phút rồi hút chính xác 25 ml benzen và tiếp tục lắc trong một phút nữa. Sau khi phân lớp, loại bỏ pha nước và chuyển pha benzen vào bình định mức qua lớp bông thủy tinh. Chú ý không thêm benzen tới vạch bình định mức. Đo độ hấp thụ của dung dịch này ở bước sóng hấp thụ cực đại $\lambda = 322$ nm trong cuvet thạch anh 10 mm, dung dịch so sánh là benzen. Dụng cụ chuẩn.

3.9.2.5 Đo màu:

Lấy một phần mẫu thử từ ba bình ở điều 3.8 trước và sau 8 ngày phân huỷ sinh học, sao cho mẫu có khoảng từ 0,5 - 3 mg chất hoạt động bề mặt không ion vào phễu chiết, thêm nước đến thể tích 100 ml. Cho vào phễu 15 ml dung dịch coban amonithiocyanat, 35 g natri clorua và lắc trong một phút, để phễu đứng yên khoảng 15 phút rồi hút chính xác 25 ml benzen và tiếp tục lắc trong một phút nữa. Sau khi phân lớp, loại bỏ pha nước và chuyển pha benzen vào bình định mức qua lớp bông thủy tinh. Chú ý không thêm benzen tới vạch bình định mức. Đo độ hấp thụ của dung dịch này ở bước sóng hấp thụ cực đại $\lambda = 322$ nm trong cuvet thạch anh 10 mm, dung dịch so sánh là benzen.

Khi đo độ hấp thụ của mẫu nếu nhỏ hơn 0,1 thì sử dụng cuvet thạch anh 50 mm.

3.9.2.6 So sánh mẫu với đường chuẩn

Từ đường chuẩn và số đo độ hấp thụ của mẫu tính được hàm lượng chất hoạt động bề mặt không ion có trước khi phân huỷ sinh học và sau 8 ngày phân huỷ sinh học.

3.9.3 Phương pháp đo thể tích bọt bóng khí

Dùng cho chất hoạt động bề mặt không ion là amid của axit rượu béo.

3.9.3.1 Nguyên tắc

Mẫu chất hoạt động bề mặt amid của axit rượu béo trong ống thử được lắc trong một điều kiện nhất định, và được xác định bằng cách đo thể tích bong bóng sinh ra.

3.9.3.2 Thiết bị và dụng cụ:

- ống thử hình trụ bằng thủy tinh, có nút đậy, đường kính trong 2,5 cm, được chia vạch từ 0 ml đến 100 ml,
- dung dịch ở bình mẫu trắng ở điều 3.6.2.2.

3.9.3.3 Dụng cụ chuẩn

Lần lượt cho vào ống thử 0; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 mg chất hoạt động bề mặt không ion, lần lượt thêm dung dịch ở bình mẫu trắng đến thể tích 50 ml, đậy nút và lắc đứng

khoảng 50 lần với tốc độ 2 lần trong một giây, để đứng yên trong 30 giây, đo thể tích bong bóng sinh ra (ml). Đo hai lần để tính kết quả trung bình. Dụng đường chuẩn.

3.9.3.4 Cách tiến hành

Lấy 50 ml dung dịch mẫu thử , mẫu đối chứng và mẫu trắng ở điều 3.8 trước và sau khi phân huỷ

8 ngày vào ống thử, đập nút và lắc đứng khoảng 50 lần với tốc độ 2 lần trong một giây, để đứng yên trong 30 giây, đo thể tích bong bóng sinh ra (ml). Đo hai lần để tính kết quả trung bình, so sánh với đường chuẩn.

3.10 Tính kết quả

Độ phân huỷ sinh học tính sau 8 ngày (D) được thể hiện bằng phần trăm khối lượng (%) và được tính theo công thức sau:

$$D = \frac{(S_0 - T_0) - (S_8 - T_8)}{(S_0 - T_0)} \cdot 100$$

trong đó,

S₀ là giá trị trung bình của các số liệu phân tích bình mẫu thử hoặc bình mẫu đối chứng bắt đầu thử phân huỷ sinh học, tính bằng mg/l chất hoạt động bề mặt;

T₀ là giá trị trung bình của các số liệu phân tích ở bình mẫu trắng bắt đầu phân huỷ sinh học, tính bằng mg/l chất hoạt động bề mặt.

S₈ là giá trị trung bình của các số liệu phân tích bình mẫu thử, bình mẫu đối chứng sau 8 ngày phân huỷ sinh học, tính bằng mg/l chất hoạt động bề mặt.

T₈ là giá trị trung bình của các số liệu phân tích ở bình mẫu trắng sau 8 ngày phân huỷ sinh học, tính bằng mg/l chất hoạt động bề mặt.

Các phép đo lấy từ dung dịch ở 3.8, theo các phép đo ở 3.9

3.11 Kháng định kết quả thử

Trong trường hợp độ phân huỷ sinh học của các chất hoạt động bề mặt trong bình mẫu đối chứng nhỏ hơn 95% , thì kết quả phân huỷ trên sẽ không có giá trị.