



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21818—2008

---

## 化 学 品 固有生物降解性 改进的 MITI 试验(Ⅱ)

Chemicals—  
Inherent biodegradability—Modified MITI test (Ⅱ)

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 302C(1981年)《改进的 MITI 试验(II)》。

本标准做了下列编辑性修改：

- 增加了范围、术语与定义、质量控制；
- 将计量单位改为我国法定计量单位。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位：环境保护部南京环境科学研究所。

本标准参加起草单位：环境保护部化学品登记中心、沈阳化工研究院安全评价中心、上海市检测中心。

本标准主要起草人：石利利、刘济宁、单正军、杨力、赵浩然、韩雪、杨婧。

# 化 学 品

## 固有生物降解性 改进的 MITI 试验(Ⅱ)

### 1 范围

本标准规定了化学品固有生物降解性改进的 MITI 试验(Ⅱ)的方法概述、试验准备、试验程序、质量控制、数据与报告。

本标准适用于测试试验浓度下非挥发的、对微生物无抑制作用的、不与 CO<sub>2</sub> 吸附剂反应的化学品的固有生物降解性。

### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

#### 2.1

**固有生物降解性 inherent biodegradability**

最佳试验条件下,受试物长时间与接种物接触表现出的生物降解潜力。

#### 2.2

**生化需氧量 biochemical oxygen demand, BOD**

微生物分解有机物所消耗氧的量,可表示为每毫克受试物消耗的氧气毫克数(mg/mg)。

#### 2.3

**理论需氧量 theoretical oxygen demand, ThOD**

根据分子式计算得到的受试物完全被氧化需要的氧的总量,可表示为每毫克受试物消耗的氧气毫克数(mg/mg)。

### 3 受试物信息

- a) 分子式;
- b) 水溶液中定量分析方法;
- c) 主要成分组成比例;
- d) 微生物毒性。

### 4 方法概述

#### 4.1 原理

本标准是通过测定生化需氧量(BOD)和受试物残留分析,评价由改进的 MITI 试验(I)筛选得到的低生物降解物质的固有生物降解性。

以受试物作为唯一的有机碳源,在微生物对受试物无适应性的前提下,使用自动、密闭的耗氧测定仪(BOD 仪),将微生物接种到装有受试物的试验容器中。试验期间,以一定时间间隔测定试验溶液的 BOD 值。通过 BOD 测定值与化学分析结果(如测定溶解性有机碳浓度或化学物质的残留浓度等),计算生物降解率。

#### 4.2 参比物

为了检测活性污泥的活性,应设置参比物试验,目前仍未有专一性的参比物。本标准推荐苯胺(新蒸馏)、醋酸钠或苯甲酸钠作为参比物。若使用其他参比物,试验报告中应加以说明。

5 试验准备

5.1 设备

- a) BOD 测定仪(配 6 个 BOD 瓶和 CO<sub>2</sub> 吸收杯),对于挥发性物质,需用改进的 BOD 仪;
- b) 膜过滤器(可选);
- c) 碳分析仪(可选)。

5.2 接种物

污泥采样点原则上全国不少于 10 个使用和排放各种化学物质的场所,这些场所包括城市污水处理厂、工业污水处理厂、河流、湖泊和沿海。原则上,污泥样品每年在 3 月、6 月、9 月和 12 月采样 4 次,例如,日本化学物质测试中心采用的标准活性污泥来自 10 个场所的混合污泥:城市污水处理厂(3 个分布于日本北部、中部和南部)、工业污水处理厂(1 个化学工业废水处理厂)、河流(3 条分别位于日本北部、中部和南部)、湖泊(1 个位于日本中部)和海洋(2 个位于日本内陆海)。

5.3 污泥采样方法

从城市污水处理厂采集回流污泥 1 L,在与空气接触的河流、湖泊和沼泽或海洋的地表水和表面土壤各采集 1 L。将各采样点的污泥样品放入同一容器,搅拌混匀后静置。去除漂浮物,用 2 号滤纸过滤后以氢氧化钠或磷酸将滤液 pH 值调为 7.0±1.0,转移至曝气池内曝气培养。

曝气结束后静置 30 min,弃去上清液总体积的 1/3,然后加等体积的 0.1% 的合成污水(1 g 葡萄糖,1 g 蛋白胨和 1 g 磷酸钾溶解于 1 L 水中,以 NaOH 调节 pH 值为 7.0±1.0)再次曝气。每日重复进行,培养温度为(25±2)℃。

当活性污泥培养时,应根据下列项目检查和采取必要的控制措施:

- a) 上清液外观:活性污泥上清液应是澄清的;
- b) 活性污泥的沉降:絮凝成团的活性污泥应具有较强的沉降性;
- c) 活性污泥形成状态:当污泥无絮状出现时,可增加 0.1% 的合成污水或增加合成污水添加的次数;
- d) pH:上清液 pH 值为 7.0±1.0;
- e) 温度:活性污泥培养温度为(25±2)℃;
- f) 曝气量:加入合成污水的上清液中,应充分曝气,溶解氧浓度不低于 5 mg/L;
- g) 活性污泥原生动物:在放大 100~400 倍的显微镜下,应可见大量不同种类的原始动物;
- h) 新鲜和驯化污泥的混合:为了保持新鲜和驯化污泥具有相同的活力,试验使用的活性污泥上清液滤液与等体积的新鲜活性污泥混合后培养;
- i) 活性污泥活性测定:标准物质定期检测活性污泥活性(至少每 3 个月 1 次),特别是在新鲜和驯化污泥样品混合后(图 1),必须进行测定,保证与老污泥样品活性一致。

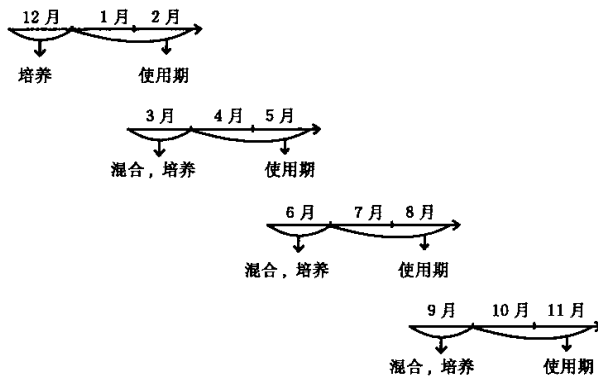


图 1 活性污泥样品制备和使用周期举例

## 5.4 培养基

### 5.4.1 试验培养基贮备液

用分析纯试剂制备下列贮备液：

- a) 磷酸缓冲液：称取 8.50 g 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、21.75 g 磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、44.6 g 十二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )和 1.70 g 氯化铵( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )，用水溶解，定容至 1 L，pH 值为 7.2。
- b) 氯化钙溶液：称取 27.50 g 无水氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )用水溶解，定容至 1 L。
- c) 硫酸镁溶液：称取 22.50 g 七水合硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )，用水溶解，定容至 1 L。
- d) 氯化铁溶液：称取 0.25 g 六水合氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，用水溶解，定容至 1 L。

### 5.4.2 试验培养基的制备

取 5.4.1 中溶液 a), b), c) 和 d) 各 3 mL，用试验用水稀释并定容至 1 L。

## 6 试验程序

### 6.1 组别设计

通常，试验中需要设置下列组别：

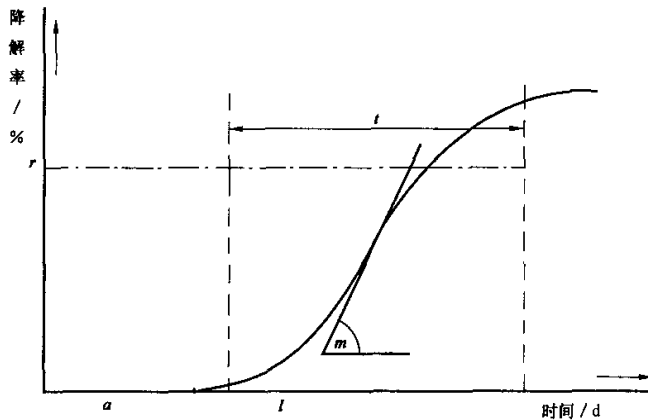
- a) 瓶 1：非生物降解对照(受试物 30 mg/L)；
- b) 瓶 2、瓶 3 和瓶 4：含受试物和接种物的试验组(活性污泥 100 mg/L(以干重计) + 受试物 30 mg/L)；
- c) 瓶 5：含参比物和接种物的程序对照(活性污泥 100 mg/L(以干重计) + 受试物 30 mg/L + 苯胺 100 mg/L)；
- d) 瓶 6：仅含接种物的接种物空白对照(活性污泥 100 mg/L(以干重计))。

### 6.2 受试物预处理

若受试物的水中溶解度小于最佳试验浓度时，应将受试物充分磨碎。若受试物具有挥发性，应冷藏减少挥发。必要时，应对受试物进行鉴定。

### 6.3 试验操作

难溶受试物试验中不能使用助溶剂和乳化剂，可采用研磨或超声分散等适当方式使溶液均质化。试验瓶 2、瓶 3 和瓶 4(试验悬浮液)，瓶 5(程序对照)和瓶 6(接种物的空白对照)加入接种物浓度为 100 mg/L，瓶 1 中只加受试物不加接种物作为非生物降解对照， $\text{CO}_2$  吸收杯中加入  $\text{CO}_2$  吸收剂，装好设备，检查气密性，开始搅拌，在黑暗条件下( $25 \pm 2$ ) $^\circ\text{C}$  开始试验，每天检查温度和搅拌器状态，定期测定溶解氧浓度，并观察试验瓶中颜色变化，连续获得 14 d~28 d 的 BOD 曲线(见图 2)。培养 14 d~28 d 后，测定各瓶试验溶液 pH，受试物残留量或中间体的浓度。为确定试验过程中受试物可能发生的变化，如通过蒸发或试验容器器壁吸附作用造成受试物损失等，不加活性污泥处理的受试物也要进行测定。



- a——适应期；
- l——对数生长期；
- m——最大降解率；
- r——降解通过水平；
- t——时间窗。

图 2 快速生物降解类化合物的生物降解曲线

6.4 分析方法

若受试物溶于水,总有机碳残留量也要测定。

总有机碳含量测定方法:培养容器中取出 10 mL 受试溶液,3 000 g 离心 5 min,总有机碳分析仪检测上清液总有机碳残留量。

其他分析方法:选择适合溶剂,提取培养液中的受试物,然后选择适当预处理方法,如浓缩等,受试物残留量通过分析仪器测定(如气相色谱、光谱、质谱、原子吸收等)。

对于挥发性物质,为了减少蒸发,BOD 仪温度应在 10 °C 至少控制 30 min,然后开始上述分析。

7 质量控制

- a) 本标准对于水中溶解度超过 100 mg/L 的受试物,重现性较好；
- b) 氧消耗检测限为 1 mg(微生物氧消耗)；
- c) 受试物测定灵敏度依靠所采用的分析方法；
- d) 受试物水中浓度/空气中浓度应不低于 1,对于挥发性受试物应采用改进的 BOD 测定法(附录 A)；
- e) 若使用苯胺作为参比物,试验进行到 7 d 和 14 d 时,参比物降解率应分别不低于 40% 和 65%。

8 数据与报告

8.1 数据处理

a) 根据氧消耗量计算降解百分率,见式(1):

$$D = \frac{BOD - B}{TOD} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

D——生物降解率,以%表示；

BOD——根据 BOD 曲线测定的受试物生化需氧量,单位为毫克(mg)；

B——根据接种物空白 BOD 曲线测定的氧消耗量,单位为毫克(mg)；

TOD——受试物完全氧化需要的理论需氧量,单位为毫克(mg)。

b) 由受试物分析测定结果计算降解百分率,见式(2):

$$D = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

$S_a$ ——生物降解试验结束后的受试物的残留量,单位为毫克(mg);

$S_b$ ——2个空白对照中受试物的平均残留量,单位为毫克(mg)。

8.2 结果评价

a) 理论需氧量的计算:

元素	氧化态
C	CO <sub>2</sub>
H	H <sub>2</sub> O
N	NO <sub>2</sub>
S	SO <sub>2</sub>
X (卤素)	X

b) 分析方法回收率;

c) 受试物生物降解能力与苯胺的相对降解程度进行分类;若用苯胺作为参比物,试验进行到第7天和第14天时,参比物降解率分别达到40%和65%,则试验有效;若 $S_b$ 回收率不超过10%,试验无效;由于受试物浓度较低,BOD绝对值可能比正常条件下BOD值要低,该试验条件下比标准试验条件下基本耗氧量要高很多,因此试验物质的BOD应小心测定。

8.3 结果报告

试验报告应包括以下内容:

a) 受试物:

- 基本信息,包括名称、分子式、分子量、纯度、杂质等;
- 理化性质;
- 光谱数据。

b) 试验条件:

- 接种物;状态和取样地点和浓度;
- 试验周期与温度;
- 程序改变的原因及解释说明。

c) 化学分析:

- 前处理;
- 仪器分析条件;
- 回收率;
- 中间产物分析。

d) 结果:

- BOD曲线和仪器名称;
- BOD(mg);
- B(mg);
- $S_a$ (mg);
- $S_b$ (mg);

- TOD(mg);
- 根据 BOD 的降解百分率;
- 根据化学分析的降解百分率;
- 受试物的色谱或光谱分析结果。

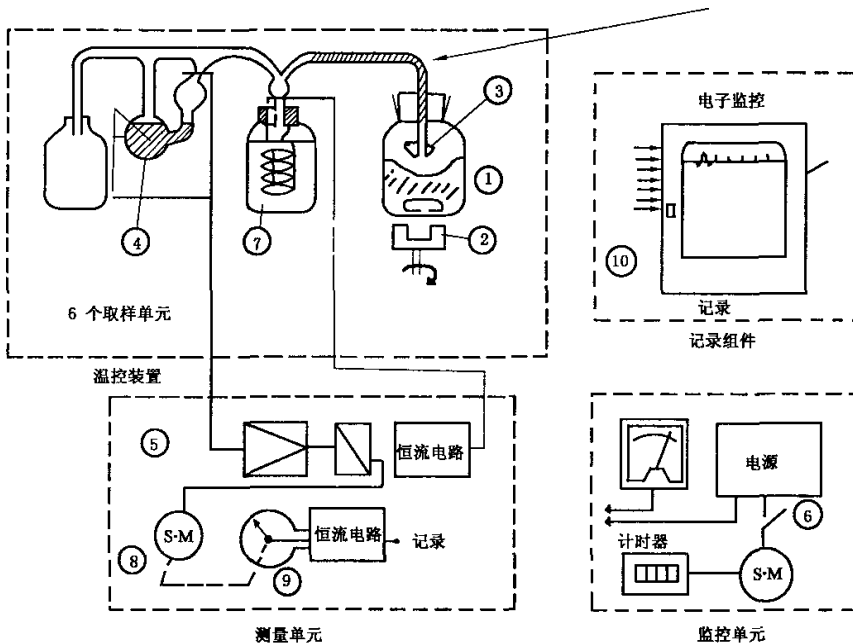
e) 结果讨论。

**附录 A**  
(资料性附录)  
**改进的 BOD 测定法**

**A.1 密闭系统氧消耗测定装置原理**

库伦计是通过电化学过程测定微生物氧消耗的装置。见图 A.1。

(改进的 BOD 计由日本 Ohkura Electric Co., Ltd. 生产, 阴影部分管路用毛细管代替。当测定挥发性物质时, 电解瓶和反应瓶之间用毛细管连接。)



**图 A.1 氧消耗测定仪**

培养瓶①, 在磁力搅拌器②作用下, 剧烈搅拌。反应过程中, 水相中的溶解氧逐渐消耗, 培养瓶中的  $O_2$  溶解进入水相, 产生的  $CO_2$  释放到瓶中。当  $CO_2$  被碱石灰吸收时, 培养瓶中氧气压力和总压力减少。压力的下降通过电子压力计④转换成电信号, 然后经过放大器⑤操作继电器⑥, 启动同步发动机⑧。同时, 在恒电流作用下, 电解瓶⑦中硫酸铜溶液电解产生氧气。产生的氧气补充到培养瓶中, 通过压力计检测压力变化, 控制继电器关闭电路, 停止电解和同步发动机。

培养瓶上层空间应保持稳压, 氧气消耗量与电解氧量成比例。当电解氧的量与电解时间相关时, 产生稳定的电解电流。因此, 通过连锁电位计同步发动机的转角⑨转换为电压 (mV) 信号, 然后记录仪⑩记录耗氧量。

**A.2 悬浮物**

参考日本工业标准 K0102-10.2。悬浮物是指通过过滤或离心进行分离的物质。悬浮物可通过下述方法进行检测。当水样难以过滤时, 应采用离心法; 而水样中含有大量悬浮物时, 应采用布氏漏斗过

滤法。如果水样来自废水要过 2 mm 筛,最低 5 mg 过滤物用于分析。

**A. 2. 1 滤纸过滤法**

**A. 2. 1. 1 玻璃纤维过滤法**

**A. 2. 1. 1. 1 设备**

玻璃纤维过滤器:坩埚型烧结玻璃过滤器 1G2 或布氏过滤烧结玻璃滤器 3G2。

**A. 2. 1. 1. 2 程序**

准备两只类型相同、质量相近的玻璃滤器,垫入 6 层滤纸,用水润湿,使其紧附于漏斗。然后将滤器放入烘箱,105℃~110℃干燥 2 h。取出后放入干燥器冷却,称重。注入适量的水样到较重的滤器中(水样量要保证干燥后悬浮物质量不超过 5 mg。通常,使用 200 mL 水样。若水样难以过滤,过滤时,用 10 mL 量筒添加水样),抽滤后,用滤液冲洗滤器壁几次,将过滤液分几次注入较轻滤器,抽滤。2 只滤器在 105℃~110℃烘箱干燥 2 h 后,放入干燥器中冷却。称重(当考虑化学平衡时,较轻滤器作为附加增重),得到过滤前后的质量差,根据式(A. 1)计算悬浮物质的含量(mg/L)。

$$S = (a - b) \times \frac{1\ 000}{V} \dots\dots\dots(A. 1)$$

式中:

S——悬浮物含量,单位为毫克每升(mg/L);

a——试验水样过滤前后的质量差,单位为毫克(mg);

b——过滤液过滤前后的质量差,单位为毫克(mg)(当使用化学平衡时,b=0);

V——试验水样体积,单位为毫升(mL)。

注 1:为了测定挥发性悬浮物的灼烧损失,应采用玻璃纤维滤纸法(注 3),或者将悬浮物用滤纸过滤到同一坩埚或蒸发皿,在马弗炉中干燥和灼烧。

注 2:当可溶性蒸发残留量低于 5 000 mg/L 时,滤液过滤前后质量的差异可以忽略。但是,当使用化学平衡时,较轻滤器要补充增重,因此过滤液要同时进行。直接平衡时,试验水样中物质的吸湿性或其他条件产生的质量变化,通过过滤器的空白试验值进行校正。含有脂肪、石油、油脂、蜡等的试验水样,这些物质在悬浮物中的比例应测定。除去油脂的悬浮物测定时,应在干燥和称重后的滤器中分几次加入 10 mL 正己烷,将脂肪和油类去除。然后,干燥滤器,称重。

注 3:玻璃纤维滤纸法(GFP法):冲洗后,经 105℃~110℃烘干 2 h 后已知质量的滤纸固定在适合的支持板上。加入一定量的试验水样,抽滤后,用部分过滤液冲洗原受试液容器。将吸附在器壁的悬浮物冲下,然后再利用 GFP 抽滤。重复该步骤几次。将 GFP 从滤器取下,放入水杯中。接下来的操作步骤与下述布氏过滤法一致,悬浮物含量以 mg/L 计。如果需要,根据石棉过滤法,悬浮物测定后,检测悬浮物的灼烧残留。

**A. 2. 1. 2 布氏抽滤法**

该方法适用于含有大量悬浮物的样品,如污泥。

**A. 2. 1. 2. 1 仪器**

- a) 过滤板:不锈钢(SUS27 或 28),厚度约 0.5 mm,直径 50 mm 或 90 mm。过滤板外形类似手表,但边缘略弯。按照适当的距离,在板上钻孔,孔径为 0.5 mm。
- b) 橡胶垫圈:垫圈厚度 2 mm~3 mm,直径 10 mm~90 mm,宽约 10 mm,放置在布氏漏斗上,或置于过滤板下面,抽滤。
- c) 布氏漏斗:50 mm 或 90 mm。

**A. 2. 1. 2. 2 程序**

准备两个多孔板:将橡胶垫圈放入到布氏漏斗中,将多孔板放置其上。放好滤纸(6 号),润湿滤纸。将多孔板和滤纸取出,在 105℃~110℃下干燥 2 h~3 h。在干燥器中冷却后,称至恒重(当考虑化学平衡时,较轻板作为附加增重)。较重的多孔板和滤纸一起放入漏斗,抽滤 200 mL~400 mL 试验水样。将滤液用较轻的铺有滤纸多孔板分几次过滤,得到过滤前后的质量差,根据式(A. 1)计算受试液悬浮物浓度(mg/L)。

注同 A. 2. 1. 1. 2。

## A. 2. 2 石棉过滤法

### A. 2. 2. 1 仪器

古氏坩埚(25 mL~35 mL)。

### A. 2. 2. 2 试剂

石棉悬浮液:在 15 g 石棉中加入水,倾倒入超细部分后,加水至 1 L。

### A. 2. 2. 3 程序

准备两个古氏坩埚(形状相同,质量相近)。干燥后,倒入大约 20 mL 充分搅拌的石棉悬浮液,形成约 3 mm 后的石棉层(约 0.3 g)(倒入一半石棉溶液后,放入多孔板,然后倒入另一半溶液),轻轻抽干。

然后将古氏坩埚放入烘箱,在 105℃~110℃ 下干燥 2 h,在干燥器中冷却后,称量每个坩埚的质量(当考虑化学平衡时,较轻滤器作为补充增重)。将较重的坩埚安装在抽滤瓶上,倒入足够量的试验水样,使得干燥后悬浮物量不少于 5 mg,小心抽滤。同时,初次过滤液再重复过滤。接着,较轻坩埚中分次倒入少量滤液抽滤,然后放入 105℃~110℃ 烘箱中干燥 2 h。在干燥器中冷却,称重坩埚,获得质量差(用坩埚作为增重),根据式(A. 1)计算悬浮物质的含量(mg/L)。

注同 A. 2. 1. 1. 2。

## A. 2. 3 离心法

该法适用于由于悬浮物浓度导致难以过滤的样品。

### A. 2. 3. 1 仪器

- a) 离心机(约 2 000 r/min);
- b) 离心管(50 mL~100 mL)。

### A. 2. 3. 2 步骤

在离心管中倒入适量试验水样,确保悬浮物不少于 5 mg。

每个离心管称重后,2 000 r/min 离心 20 min 分离水样中的悬浮物。倾倒弃去上清液(如果需要可对可溶性挥发残留物进行检测时,要保留上清液)。加 10 mL 水到沉淀中,再次离心后,倒出上清液。

将沉淀转移到蒸发皿中,在 105℃~110℃ 下干燥 2 h 后,放入干燥器中冷却,称重(当化学平衡时,相同形状的蒸发皿空白试验用作补充增重)。得到干燥前后的质量差,根据式(A. 2)计算悬浮物的浓度(mg/L):

$$S = a \times \frac{1\,000}{V} \quad \dots\dots\dots(A. 2)$$

式中:

- S——悬浮物含量,单位为毫克每升(mg/L);  
 a——试验水样过滤前后的质量差,单位为毫克(mg);  
 V——试验水样体积,单位为毫升(mL)。

蒸发残留量差悬浮物由总蒸发残留量和可溶性蒸发残留量的差进行计算。见式(A. 3):

$$A = B - C \quad \dots\dots\dots(A. 3)$$

式中:

- A——悬浮物浓度,单位为毫克每升(mg/L);  
 B——总蒸发残留量,单位为毫克每升(mg/L);  
 C——可溶性蒸发残留量,单位为毫克每升(mg/L)。

注:分散相和分散介质之间的密度差异是离心分离的条件。

### A.3 pH 值为 7 时悬浮物的形式

参考日本工业标准 K0102-10.3, 当试验水样为中性时(pH 值为  $7.0 \pm 0.5$ ), 形成悬浮物。

#### A.3.1 试剂

- a) NaOH 溶液(4%~24%, 质量体积比);
- b) 乙酸溶液(酸水比为 1:2~1:6)。

#### A.3.2 程序

在烧杯倒入悬浮物不少于 5 mg 的试验水样, 用碱或酸调节 pH 至中性, 中和时尽量减小溶液体积增加量。然后根据本标准程序进行, 获得 pH 值为 7 的悬浮物量, 根据式(A.3)计算 pH 值为 7 时形成的悬浮物浓度。

注 1: 受废水种类的影响, 水样中和后其中的悬浮物量可能减少。在这种情况下, 悬浮物量应注明是在 pH 值为 7 时形成的悬浮物量。

注 2: 去除悬浮物后, pH 值为 7 时形成的悬浮物可用上清液或过滤液测定。这种方法可应用到试验水样中含有相对较少的悬浮物, 但中和(中和对原悬浮物没有影响)后形成大量沉淀, 或适用于废水形成的沉淀相对较少的情况。这种方法不适用于中和后产生复合沉淀或发生溶出反应的废水。

参 考 文 献

- [1] Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances (C-5/98/JAP), 1978.
  - [2] *The chemical substances control law in Japan* (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.
  - [3] The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances 5, 8 (C-3/78/JAP) 1978.
-