

HG

中华人民共和国化工行业标准

HG/T XXXXX—XXXX

水处理用生物药剂 脱硫菌剂

Biological agents for water treatment—Desulfurizing microbial agents

(报批稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

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。

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专利的责任。

本文件由中国石油和化学工业联合会提出。

本文件由全国化学标准化技术委员会水处理剂分技术委员会（SAC/TC 63/SC 5）归口。

本文件起草单位：山东海景天环保科技股份有限公司、深圳市长隆科技有限公司、中海油天津化工研究院有限公司、南京御水科技有限公司、普罗生物技术（上海）有限公司、武汉水之国环保科技有限公司、碧沃丰生物科技（广东）股份有限公司、中创新海（天津）认证服务有限公司、江西爱地生生物高分子材料有限公司。

本文件主要起草人：燕锡尧、董红红、白莹、陈伟、袁磊、吴定心、范德朋、王学钧。

水处理用生物药剂 脱硫菌剂

1 范围

本文件规定了水处理用生物药剂脱硫菌剂产品的要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输和贮存及安全要求。

本文件适用于工业废污水的生化处理用及生态修复用的脱硫菌剂。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 191—2008 包装储运图示标志

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB 20287—2006 农用微生物菌剂

HJ/T 415 环保用微生物菌剂环境安全评价导则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脱硫菌剂 desulfurizing microbial agents

由有效菌经过工业化生产扩繁后加工制成的，具有氧化硫离子为硫单质或更高价态硫的化合物功能，且不存在安全风险（依据HJ/T415评价）的活菌制剂。

3.2

硫化物氧化性能 sulfide oxidation performance

单位质量或单位体积的脱硫菌剂在单位时间内氧化硫化物（以S计）的质量。

4 要求

4.1 外观：液体产品为无色、淡黄色至红褐色液体；固体产品为类白色至棕褐色或红棕色粉末。

4.2 脱硫菌剂的技术指标应满足表1要求。

表1

项目	指标				
		液体		固体（异养菌）	
		异养菌	自养菌		
理化指标	总菌量/（CFU/g 或 CFU/mL）	≥	5.0×10 ⁸	2.0×10 ⁷	1.0×10 ⁹
	水分/%	≤	—		15.0

	pH 值		6.5~8.5 (原液)	6.5~8.5 (500g/L)
	杂菌率 (以霉菌计) /%	≤	10.0	10.0
性能指标	硫化物氧化性能/[mg/(g·d) 或 mg/(mL·d)]	≥	100.0	200.0

5 试验方法

5.1 通则

本文件所用的试剂和水, 除非另有规定, 均指分析纯及以上试剂和GB/T 6682—2008中规定的三级水。

试验中所需标准滴定溶液、制剂及制品, 除非另有规定, 均按GB/T 601、GB/T 603的规定制备。

5.2 外观检验

在自然光下, 于白色衬底的表面皿或白瓷板上用目视法判定。

5.3 总菌量的测定

5.3.1 方法提要

每个活菌在适宜的培养基和良好的生长条件下可以通过生长形成菌落, 培养基内部及表面生长的每一个菌落来源于样品稀释液中的一个活菌。将脱硫菌剂在一定条件下培养后, 测定每克或每毫升样品中的微生物菌落总数即为总菌量。

5.3.2 仪器设备

5.3.2.1 高压蒸汽灭菌锅: 温度可控制在 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.2.2 恒温培养箱: 温度可控制在 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.2.3 旋转式摇床。

5.3.3 分析步骤

5.3.3.1 无菌水的制备

将水装入三角瓶中, 用组培封口膜封口, 于 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 高压蒸汽灭菌30 min, 冷却后备用。

5.3.3.2 培养基的制备

根据脱硫菌剂的性质, 选择适宜的培养基, 常用培养基的制备见附录A。

5.3.3.3 样品稀释

5.3.3.3.1 称取 10 g 固体样品, 精确到 0.01 g, 加入 100.0mL 无菌水, 或移取 10.00 mL 液体样品, 加入 90.00mL 无菌水, 投入数粒玻璃珠。在旋转式摇床上 200 r/min 充分振荡 30min, 即成母液菌悬液。

注: 若固体产品溶解后, 粘度大不易后续母液菌悬液的移取, 可减少样品称取质量。

5.3.3.3.2 移取 1.00 mL 母液菌悬液加入装有 9.00mL 无菌水的试管中, 充分混匀即成 10^{-1} 菌悬液; 按此操作, 逐级稀释, 分别制得 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 等一系列稀释度菌悬液, 供平板涂布使用。(每个稀释度应更换无菌枪头)

5.3.3.4 涂布及培养

将20mL~30 mL灭菌后冷却至 50°C 左右的培养基倾注于平皿中。待培养基凝固后, 每个样品选取三个适宜的稀释度, 每个稀释度移取0.10 mL菌悬液加至预先制备好的固体平板培养基上, 用涂布棒将菌悬液涂布均匀, 每个稀释度平行涂布三个。同时以无菌水作为空白对照。

将平板倒置于 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养, 异养菌培养时间为48 h, 自养菌的培养时间为7d (自养菌培养时, 需将平板用封口膜封口)。

5.3.3.5 菌落计数

以出现30CFU~300 CFU菌落数的稀释度的平板为计数标准。当只有一个稀释度，其平均菌落数在30CFU~300 CFU之间时，以该平均菌落数计算。若有两个稀释度，其平均菌落数均在30CFU~300 CFU之间时，应按两者菌落总数之比值决定。若比值小于等于2，应计算两者的平均数；若大于2，则以稀释度小的菌落平均数计算。

若空白培养皿出现菌落，表明测定过程中有污染，本次测定无效，应重新进行测定。

5.3.4 结果计算

5.3.4.1 固体产品的总菌量以 X_1 表示，数值以 CFU/g 表示，按式（1）计算：

$$X_1 = \frac{NfV_1}{mV_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

N ——菌落平均数的数值，单位为CFU；

f ——稀释倍数；

V_1 ——母液菌悬液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_1=100$ ）；

m ——称取固体脱硫菌剂产品的质量的数值，单位为克（g）；

V_2 ——涂布的稀释菌液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_2=0.1$ ）。

计算结果以科学计数法表示，修约到小数点后两位。

5.3.4.2 液体产品的总菌量以 X_2 表示，数值以 CFU/mL 表示，按式（2）计算：

$$X_2 = \frac{NfV_1}{VV_2} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

N ——菌落平均数的数值，单位为CFU；

f ——稀释倍数；

V_1 ——母液菌悬液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_1=100$ ）；

V ——移取液体脱硫菌剂产品的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V=10$ ）；

V_2 ——涂布的稀释菌液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_2=0.1$ ）。

计算结果以科学计数法表示，修约到小数点后两位。

5.4 水分的测定

5.4.1 方法提要

在一定温度下，将试样置于电热干燥箱内烘干至恒量，根据干燥前后的试样质量差值测得水分含量。

5.4.2 仪器设备

5.4.2.1 电热干燥箱：温度可控制在 $105^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

5.4.2.2 称量瓶： d 60mm×30mm。

5.4.3 分析步骤

使用预先于 $105^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒量的称量瓶称取约 1g 试样，精确至 0.2mg，置于电热干燥箱中。在 $105^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒量。

5.4.4 结果计算

水分含量以质量分数 w_1 计，数值以 % 表示，按式（3）计算：

$$w_1 = \frac{m - (m_1 - m_0)}{m} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

式中：

m_1 ——干燥后试样与称量瓶质量的数值，单位为克（g）；

m_0 ——称量瓶质量的数值，单位为克（g）；

m ——试料的质量的数值，单位为克（g）。

计算结果修约到小数点后两位。

5.4.5 允许差

取平行测定结果的算术平均值为测定结果。两次平行测定结果的绝对差值不大于 0.05%。

5.5 pH 值的测定

5.5.1 方法提要

将已定位的酸度计浸入待测溶液中，读出溶液的 pH 值。

5.5.2 仪器设备

5.5.2.1 酸度计：精度为 0.02pH 单位，配有玻璃测量电极和饱和甘汞参比电极或复合电极。

5.5.2.2 磁力搅拌器。

5.5.3 分析步骤

称取 25g 固体样品置于 50mL 烧杯中，精确至 0.01g。加无二氧化碳的水至体积为 50mL，置于磁力搅拌器上搅拌 30min。在已定位的酸度计上，待溶液读数稳定后，读出 pH 值。

液体产品量取原液直接测定。

5.6 杂菌率的测定

5.6.1 分析步骤

样品中的杂菌以霉菌计，按照 GB 20287-2006 的 6.3.3 的规定测定霉菌杂菌数。

5.6.2 结果计算

脱硫菌剂的杂菌率以 w_2 计，数值以 % 表示，按式（4）计算：

$$w_2 = \frac{n}{n_0} \times 100 \quad (4)$$

式中：

n ——测得的霉菌杂菌数的数值，单位为 CFU/g 或 CFU/mL；

n_0 ——按式（1）或式（2）计算出的总菌量的数值，单位为 CFU/g 或 CFU/mL。

计算结果修约到小数点后两位。

5.7 硫化物氧化性能的测定

警告：本试验方法所使用的强酸、强碱具有腐蚀性，使用时避免吸入或接触皮肤。溅到身上应立即用大量水冲洗，严重时应立即就医。试验操作时应佩戴防毒面具，避免吸入操作中逸出少量硫化氢气体，且应保持实验室通风良好。

5.7.1 方法提要

脱硫菌剂在一定浓度硫化钠的溶液中,在合适条件下经过一定时间将水中的硫离子氧化为硫单质或更高价态硫的化合物。通过测得与参比组对照的硫化物的质量的变化,计算出脱硫菌剂的硫化物氧化性能。

5.7.2 试剂或材料

5.7.2.1 硫化钠溶液: 500mg/L。称取 3.76g 硫化钠 ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 置于烧杯中,加水搅拌溶解后,转移至 1000mL 容量瓶,用水稀释至刻度。

5.7.2.2 盐酸溶液: 1+1。

5.7.2.3 乙酸溶液: 1+1。

5.7.2.4 氢氧化钠溶液: 40g/L。

5.7.2.5 乙酸锌溶液: 1 mol/L。称取 220 g 乙酸锌 [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$] 溶于水并稀释至 1000mL,若浑浊需过滤后使用。

5.7.2.6 硫代硫酸钠标准滴定溶液: $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ 约为 0.1mol/L。

5.7.2.7 碘标准溶液: $c(1/2\text{I}_2)$ 约为 0.1 mol/L。棕色瓶保存。

5.7.2.8 淀粉指示液: 10g/L。

5.7.3 仪器、设备

5.7.3.1 恒温摇床。

5.7.4 分析步骤

5.7.4.1 生化反应

5.7.4.1.1 移取 200 mL 的硫化钠溶液,置于 500 mL 锥形瓶中,迅速加入一定体积的乙酸溶液(乙酸溶液的加入量应预先确定,使加入此体积乙酸溶液后溶液 pH 值约为 8.0~8.5。),立即加塞,缓慢混匀。迅速加入 0.2 g 固体样品(精确至 0.2mg)或 0.20mL 液体样品,立即封口(封口宜采用多层不透气组培封口膜和多层保鲜膜覆盖,橡皮筋固定。也可采用其他封口方式。),以防杂菌进入及硫化物的挥发。同时以不加菌剂组做参比。

注:如有硫化氢异味持续溢出,则表明封口不合格。

5.7.4.1.2 将锥形瓶放入 28°C 恒温摇床,在 150 r/min 条件下培养 24 h。

注:上述操作的硫化钠溶液加入量、pH 范围、菌剂加入量和培养时间仅供参考,在符合附录 B 的规定的试验有效性的前提下,可根据菌剂的生存适宜条件,选择适宜的硫化钠溶液加入量、pH 范围、菌剂加入量和培养时间进行生化反应。

5.7.4.2 测定

5.7.4.2.1 移取 10.00mL 生化反应后的试液置于预先加有 2mL 乙酸锌溶液的 250mL 碘量瓶中,加入 4mL 氢氧化钠溶液,加塞摇匀至沉淀完全。

5.7.4.2.2 使用定量滤纸过滤沉淀,将沉淀连同滤纸一块转移回 250mL 碘量瓶中,捣散滤纸,加入 50mL 水和 10mL 碘标准溶液,加入 5mL 盐酸溶液后立即盖上瓶塞,水封,缓缓摇匀后,暗处放置 10min。

5.7.4.2.3 用硫代硫酸钠标准滴定溶液滴定至溶液呈淡黄色时,加入 1mL 淀粉指示液,继续滴定至溶液蓝色刚好消失且滤纸无颜色附着即为终点。同时做空白试验。

5.7.5 结果计算

5.7.5.1 硫化物(以 S 计)的质量以 m 计,数值以 mg 表示,按式(5)计算:

$$m = \frac{(V_0 - V)c \frac{M}{2}}{\frac{V_B}{V_S}} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

V_0 ——空白试验消耗的硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V ——试液消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

c ——硫代硫酸钠标准滴定溶液实际浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

M ——硫的摩尔质量的数值，单位为克每摩尔（g/mol）（ $M=32.06$ ）；

V_S ——移取硫化钠溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_S=200$ ）；

V_B ——移取生化反应后试液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_B=10$ ）。

计算结果修约到小数点后两位。

5.7.5.2 固体脱硫菌剂的硫化物氧化性能以 P 计，单位为 $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ ，按式（6）计算：

$$P_1 = \frac{m_0 - m_1}{mt} \dots\dots\dots (6)$$

式中：

m_0 ——按式（1）计算的24h生化反应后参比组中硫化物的质量的数值，单位为毫克（mg）；

m_1 ——按式（1）计算的24h生化反应后样品组中硫化物的质量的数值，单位为毫克（mg）；

m ——称取固体脱硫菌剂的质量的数值，单位为克（g）；

t ——菌剂生化反应时间，单位为天（d）（ $t=1$ ）。

计算结果修约到小数点后两位。

5.7.5.3 液体脱硫菌剂的硫化物氧化性能以 P 计，单位为 $\text{mg}/(\text{mL}\cdot\text{d})$ ，按式（7）计算：

$$P_2 = \frac{m_0 - m_1}{Vt} \dots\dots\dots (7)$$

式中：

m_0 ——按式（1）计算24h生化反应后参比组中硫化物的质量的数值，单位为毫克（mg）；

m_1 ——按式（1）计算24h生化反应后样品组中硫化物的质量的数值，单位为毫克（mg）；

V ——移取液体脱硫菌剂的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V=0.2$ ）；

t ——菌剂生化反应时间，单位为天（d）（ $t=1$ ）。

计算结果修约到小数点后两位。

5.7.6 允许差

取平行测定结果的算术平均值为测定结果。两次平行测定结果的相对偏差不大于10%。

5.7.7 试验有效性的判定

按照附录B进行测定，硫损失率数值应小于10%，否则应重新进行测定。

6 检验规则

6.1 本文件规定的全部指标项目应逐批检验。

6.2 按每一发酵罐菌液(或每批固体发酵)加工成的产品为一批。

6.3 按 GB 20287—2006 中 7.1 的规定进行采样，总量不少于 1000g（或 1000 mL）。将样品混匀，分装于两个无菌、干燥的聚乙烯瓶或采样袋中，密封。瓶（袋）上贴标签，注明：生产厂名称、产品名称、批号、采样日期和采样者姓名。一瓶供检验用，另一瓶保存三个月备查。

6.4 采用 GB/T 8170—2008 规定的修约值比较法进行判定。

6.5 检验结果如有指标不符合本文件要求时，应重新自两倍量的包装中采样进行核验。核验结果即使只有一项指标不符合本文件要求时，则整批产品为不合格。

7 标志、包装、运输和贮存

- 7.1 脱硫菌剂产品包装上应有牢固清晰的标志，内容包括：生产厂名称、产品名称、商标、净质量、批号或生产日期、本文件编号以及 GB/T 191 规定的“怕雨”、“怕晒”和“向上”标志。
- 7.2 每批出厂的脱硫菌剂产品都应附有质量合格证和使用说明书，说明书中应标明使用范围、方法、用量及注意事项等内容。
- 7.3 液体脱硫菌剂采用聚乙烯或聚丙烯塑料桶包装，采用双层桶盖，内盖扣严，外盖旋紧，每桶净质量 5kg 或 25kg。也可采用贮罐装运或根据客户要求确定。
- 7.4 固体脱硫菌剂采用铝箔袋或聚乙烯、聚丙烯袋密封包装。每袋净质量 5kg 或 25kg，或根据客户要求确定。
- 7.5 脱硫菌剂在运输过程中，应有防日晒及防雨淋措施，并保持包装完整、标志清晰。装卸时应轻搬轻放，防止交叉污染，防止包装破损。严禁与对菌剂有毒、有害的物质混装、混运。
- 7.6 脱硫菌剂产品应贮存在通风、阴凉、干燥的库房中，不得与有毒、有害物质共同存放，防止交叉污染。
- 7.7 在符合本文件规定的运输和贮存条件下，且包装完整、未开启封口，液体产品保质期为六个月，固体产品保质期为十二个月。

8 安全要求

按照 HJ/T 415 的技术要求对脱硫菌剂进行环境安全评价，应不存在安全风险。

附录 A

(资料性)

常用培养基的制备

A.1 平板计数琼脂培养基 (PCA 培养基)

A.1.1 成分

A.1.1.1 胰蛋白胨	5.0g
A.1.1.2 酵母浸膏	2.5g
A.1.1.3 葡萄糖	1.0g
A.1.1.4 琼脂	15.0g

A.1.2 配制方法

将上述成分溶解于约900mL水中,用盐酸溶液(1+12)或氢氧化钠溶液(40g/L)调节pH值至7.0±0.2后定容至1000mL,121°C±1°C高压蒸汽灭菌20min。

A.2 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (YPD 培养基)

A.2.1 成分

A.2.1.1 酵母提取物	10g
A.2.1.2 蛋白胨	20g
A.2.1.3 葡萄糖	20g
A.2.1.4 琼脂	20g

A.2.2 配制方法

将上述成分溶解于1000mL水中,121°C±1°C高压蒸汽灭菌15min或115°C±1°C灭菌20分钟。

A.3 无糖平板计数琼脂培养基 (无糖 PCA 培养基)

A.3.1 成分

A.3.1.1 胰蛋白胨	5.0g
A.3.1.2 酵母浸膏	2.5g
A.3.1.3 琼脂	15.0g

A.3.2 配制方法

将上述成分溶解于约900mL水中,用盐酸溶液(1+12)或氢氧化钠溶液(40g/L)调节pH值至7.0±0.2后定容至1000mL,121°C±1°C高压蒸汽灭菌20min。

A.4 无机培养基

A.4.1.1 成分

A.4.1.1.1 氯化铵 (NH ₄ Cl)	0.5g
A.4.1.1.2 硫酸镁 (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.4g
A.4.1.1.3 磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	2g
A.4.1.1.4 硫代硫酸钠 (Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	5g
A.4.1.1.5 硝酸钾 (KNO ₃)	2g
A.4.1.1.6 碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	1g
A.4.1.1.7 硫酸亚铁 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0.01g

A. 4. 1. 1. 8 琼脂

15g~20g

A. 4. 1. 2 配制方法

将上述成分溶解于约900mL水中，用盐酸溶液（1+12）或氢氧化钠溶液（40g/L）调节pH值至 7.0 ± 0.2 后定容至1000mL， $121^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌30min。

附录 B (规范性)

硫化物氧化性能测定试验有效性的判定

B.1 方法提要

通过对不加菌剂的硫化物溶液（即参比组）在24h培养前后的硫化物含量的测定，检验试验是否存在影响硫化物氧化性能测定硫逃逸、硫沉淀等硫化物损失现象，从而判定试验的有效性。

B.2 硫化钠溶液的标定

B.2.1 试验步骤

移取 10mL 硫化钠溶液（5.7.2.1）置于预先加有 2mL 乙酸锌溶液的 250mL 碘量瓶中，加入 4mL 氢氧化钠溶液，加塞摇匀至沉淀完全。后按 5.7.4.2.2~5.7.4.2.3 进行。

B.2.2 结果计算

硫化钠溶液质量浓度以 ρ 计，数值以 mg/L 表示，按式（B.1）计算：

$$\rho = \frac{(V_0 - V)c \frac{M}{2}}{V_s} \times 10^3 \quad \text{..... (B.1)}$$

式中：

V_0 ——空白试验消耗的硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V ——试样溶液消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

c ——硫代硫酸钠标准滴定溶液实际浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

M ——硫的摩尔质量的数值，单位为克每摩尔（g/mol）（ $M=32.06$ ）；

V_s ——移取硫化钠溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_s=10$ ）。

B.2.3 硫化物损失率的计算

硫化物损失率以 R 计，数值以%表示，按式（B.2）计算。

$$R = \frac{\rho V_s \times 10^{-3} - m_0}{\rho V_s \times 10^{-3}} \times 100 \quad \text{..... (B.2)}$$

式中：

m_0 ——按式（5）计算的24h生化反应后参比组中硫化物质量的数值，单位为毫克（mg）；

ρ ——硫化钠溶液实际浓度的准确数值，单位为毫克每升（mg/L）；

V_s ——生化反应参比组中加入的硫化钠溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）（ $V_s=200$ ）。