

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
ИСО  
16221—  
2016

---

**КАЧЕСТВО ВОДЫ**  
**Оценка способности к биоразложению**  
**в морской среде**  
(ISO 16221:2001, IDT)

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2016

## Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Некоммерческим партнерством «Координационно-информационный центр содействия предприятиям по вопросам безопасности химической продукции» (НП «КИЦ») на основе собственного аутентичного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 июля 2016 г. № 743-ст.

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 16221:2001 «Качество воды. Оценка способности к биоразложению в морской среде» (ИСО 16221:2001 «Water quality – Guidance for determination of biodegradability in the marine environment»).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0–2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет ([www.gost.ru](http://www.gost.ru))*

© Стандартиформ, 2016

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения . . . . .	1
2 Нормативные ссылки . . . . .	1
3 Термины и определения . . . . .	2
4 Сущность метода . . . . .	3
5 Условия проведения испытаний . . . . .	4
6 Реактивы . . . . .	4
7 Оборудование . . . . .	7
8 Проведение испытания . . . . .	7
9 Вычисление и обработка результатов . . . . .	8
10 Правильность результатов . . . . .	9
11 Результаты круговых испытаний . . . . .	9
12 Протокол испытания . . . . .	9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации . . . . .	11
Библиография . . . . .	12

## Введение

Техническим комитетом ТК 147 Международной организации по стандартизации (ИСО) разработан стандарт для испытания биоразлагаемости веществ и сточных вод в водной среде. Все эти методы, которые представлены в ИСО 15462, могут использоваться только при определении и предварительной оценке биоразлагаемости в свежей воде. Однако существует много случаев, когда, например, вещества используются на расстоянии от берега, где существует экстренная необходимость для испытания биоразлагаемости в морской среде. В настоящем стандарте приведено испытание биоразлагаемости в морских тест-системах, которое основано на методе Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) и опыте, накопленном рабочей группой из Объединенной осло-парижской комиссии (OSPARCOM), которая выбрала подходящие стандартизованные методы ИСО, применимые в морских условиях и проверенные круговыми испытаниями.

## КАЧЕСТВО ВОДЫ

## Оценка способности к биоразложению в морской среде

Water quality – Guidance for determination of biodegradability in the marine environment

Дата введения — 2017—02—01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает пять методов для определения полной аэробной биоразлагаемости органических соединений в морской среде аэробными микроорганизмами в постоянных водных тест-системах. Стандартные методы разложения — это испытание выделившегося DOC (ИСО 7827), испытание в закрытой бутылке (ИСО 10707), двухфазное испытание в закрытой бутылке (ИСО 10708), измерение количества выделившегося  $\text{CO}_2$  (ИСО 9439) и метод измерения  $\text{CO}_2$  в свободном пространстве над жидкостью (ИСО 14593).

Методы применяют к органическим соединениям, которые

- a) растворимы в воде в условиях испытания;
- b) плохо растворимы в воде в условиях испытания, в таком случае особые измерения могут быть необходимы для достижения хорошей дисперсии соединения (например, ИСО 10634);
- c) летучи, при условии, что используют соответствующее испытание с подходящими условиями;
- d) не являются ингибиторами к испытуемым микроорганизмам при концентрации, выбранной для испытаний. Присутствие воздействия ингибитора может быть определено способом, приведенным в настоящем стандарте.

**Примечание** — Условия, описанные в настоящем стандарте, не всегда являются оптимальными условиями, позволяющими достичь максимальной степени биоразложения. В качестве методов биоразложения в свежей воде необходимо применять ИСО 14593 и ИСО 15462, для биоразложения при низких концентрациях — ИСО 14592.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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)

Качество воды. Оценка способности органических соединений к быстрому и полному аэробному биоразложению в водной среде. Метод с применением анализа растворенного органического углерода (DOC)

ISO 9439 Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution test

Качество воды. Оценка биоразлагаемости органических соединений в водной среде. Метод оценки полной аэробной биоразлагаемости путем измерения количества выделенного диоксида углерода

ISO 10707 Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the «ultimate» aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test)

Качество воды. Оценка способности органических соединений к «конечному» аэробному биологическому разложению в водной среде. Метод анализа биохимической потребности в кислороде (испытание в закрытой склянке)

ISO 10708 Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the «ultimate» aerobic biodegradability of organic compounds — Determination of biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test

Качество воды. Оценка способности органических соединений к конечному биологическому разложению в водной среде. Определение биохимической потребности в кислороде при двухфазном испытании в закрытой склянке

ISO 14592-1 Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake-flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions

Качество воды. Оценка способности к биологическому разложению органических соединений при низких концентрациях в аэробных условиях. Часть 1. Испытание партии колб с поверхностной водой или суспензиями поверхностной воды и осадка методом взбалтывания

ISO 14592-2 Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 2: Continuous flow river model with attached biomass

Качество воды. Оценка способности к биологическому разложению органических соединений при низких концентрациях в аэробных условиях. Часть 2. Модель реки с непрерывным течением с характерной биомассой

ISO 14593 Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO<sub>2</sub> headspace test)

Качество воды. Оценка способности органических соединений к полному аэробному биологическому разложению в водной среде. Метод с применением анализа неорганического углерода в герметичных сосудах. (Измерение CO<sub>2</sub> в свободном пространстве над жидкостью)

### 3 Термины и определения

**3.1 полное аэробное биологическое разложение** (ultimate aerobic biodegradation): Разложение микроорганизмами химического соединения или органического вещества в присутствии кислорода до диоксида углерода, воды и минеральных солей любого из присутствующих элементов (минерализация) и продуцирование новой биомассы.

**3.2 первичное биологическое разложение** (primary biodegradation): Структурное изменение (трансформация) химического соединения микроорганизмами, ведущее к потере характерного свойства.

**3.3 общий органический углерод** (total organic carbon, TOC), **ТОС**: Весь углерод, который присутствует в органическом веществе, который растворен и находится во взвешенном состоянии в воде.

**3.4 растворенный органический углерод** (dissolved organic carbon, DOC): Часть органического углерода в пробе воды, которую нельзя удалить установленным фазовым разделением.

Примечание — Примеры установленного фазового разделения — это центрифугирование при 40 000 м/с<sup>2</sup> в течение 15 мин или мембранная фильтрация с диаметром пор от 0,2 мкм до 0,45 мкм.

**3.5 общий неорганический углерод** (total inorganic carbon), **ТИС**: Весь углерод в образце воды, обусловленный наличием диоксида углерода и карбоната

**3.6 растворенный неорганический углерод** (dissolved inorganic carbon), **ДИС**: Часть неорганического углерода в воде, которую нельзя удалить при помощи специального разделения фаз.

Примечание — Примеры специального фазового разделения — центрифугированием образца воды при скорости 40 000 м/с<sup>2</sup> в течение 15 минут или мембранной фильтрацией с мембранной с порами 0,45 мкм в диаметре.

**3.7 химическая потребность кислорода** (chemical oxygen demand, COD): Массовая концентрация кислорода, эквивалентная количеству установленного окислителя, поглощенного химическим соединением или органическим веществом, когда проба воды обработана окислителем при определенных условиях.

Примечание — В данном случае она выражается в мг поглощения кислорода на мг (или г) испытуемого соединения.

**3.8 биохимическая потребность кислорода** (biochemical oxygen demand, BOD): Массовая концентрация растворенного кислорода, поглощенная при установленных условиях аэробного биологического окисления химическим соединением или органическим веществом в воде.

Примечание — В данном случае она выражается в мг поглощения кислорода на мг (или г) испытуемого соединения.

**3.9 теоретическая потребность кислорода** (theoretical oxygen demand, ThOD): Теоретическое максимальное количество кислорода, необходимое для полного окисления химического соединения, рассчитанное по молекулярной формуле.

Примечание — В данном случае оно выражается в миллиграммах требуемого кислорода на мг (или г) испытуемого соединения.

**3.10 теоретическое количество образовавшегося диоксида углерода**, (theoretical amount of formed carbon dioxide),  $\text{ThCO}_2$ : Максимальное количество диоксида углерода, образовавшегося после полного окисления химического соединения, вычисленное на основе молекулярной формулы.

Примечание — Теоретическое количество образовавшегося диоксида углерода выражают в мг диоксида углерода на мг или г испытуемого соединения.

**3.11 теоретическое количество неорганического углерода**,  $\text{ThIC}$  (theoretical amount of inorganic carbon)  $\text{ThIC}$ : Максимальное количество неорганического углерода, образовавшегося после полного окисления химического соединения, вычисленное на основе молекулярной формулы.

Примечание — теоретическое количество неорганического углерода выражают в мг углерода на мг или г испытуемого соединения.

**3.12 лаг-фаза** (lag phase): Время от начала испытания до достижения адаптации и/или отбора разлагающих микроорганизмов, когда степень биоразложимости химического соединения или органического вещества увеличилась примерно до 10 % от максимального уровня биоразложения.

Примечание — Латентный период измеряют в днях.

**3.13 максимальный уровень биоразложения**: Максимальная степень биоразложения химического соединения или органического вещества при испытании, после которой на протяжении испытаний биоразложение не протекает.

Примечание — Максимальный уровень биоразложения выражают в процентах.

**3.14 фаза биоразложения** (biodegradation phase): Время от конца лаг-фазы испытания до достижения уровня биоразложения, соответствующего примерно 90 % от максимума.

Примечание — Фазу биоразложения выражают в днях.

**3.15 фаза плато** (plateau phase): Время от конца фазы биоразложения до конца испытания.

Примечание — Фазу плато выражают в днях.

**3.16 предварительное воздействие** (pre-exposure): Предварительная выдержка инокулята в присутствии химического соединения и/или органического вещества, проводимая с целью увеличения способности инокулята к биоразложению испытуемого материала при помощи адаптации и отбора микроорганизмов.

**3.17 предварительное кондиционирование** (pre-conditioning): Предварительная выдержка инокулята при условиях испытания при отсутствии химического соединения или органического вещества, проводимая с целью увеличения результативности испытания при помощи акклиматизации микроорганизмов к условиям испытания.

## 4 Сущность метода

Настоящий стандарт устанавливает пять методов для определения биоразлагаемости органических соединений в морской среде аэробными микроорганизмами с использованием статических водных тест-систем. Стандартные методы разложения, разработанные для испытаний в свежей воде, модифицированы, адаптированы и используются для этой цели.

Испытуемые смеси готовят содержащими естественную или искусственную морскую воду, морские бактерии и органическое соединение в подходящей концентрации как единственный источник углерода

и энергии. Испытуемые смеси и контрольные образцы выдерживают при желаемой температуре. Полное биоразложение регистрируют в определенный период путем измерения общих параметров, как описано в основных методах испытаний. Биоразложение, основанное на удалении DOC (растворенный органический углерод), определяют путем сравнения измеренных концентраций в начале и в конце испытания, как приведено в испытании на удаление DOC (ИСО 7827). BOD (биохимическое потребление кислорода) измеряют и сравнивают с теоретическим потреблением кислорода (ThOD) или измеряют химическое потребление кислорода (COD), как приведено в испытании в закрытой бутылке (ИСО 10707) и двухфазном испытании в закрытой бутылке (ИСО 10708). Выделение углекислого газа,  $\text{CO}_2$ , определяют и сравнивают с теоретическим количеством образовавшегося диоксида углерода,  $\text{ThCO}_2$ , применяя метод измерения количества выделенного диоксида углерода (ИСО 9439), а TIC (общий неорганический углерод) определяют и сравнивают с теоретическим неорганическим углеродом (ThIC) в соответствии с методом измерения  $\text{CO}_2$  в свободном пространстве над жидкостью (ИСО 14593).

При необходимости и если доступен аналитический метод для конкретного вещества, информация о первичной разлагаемости может быть получена путем измерения потерь испытуемого соединения во время испытания, или биоразложение может быть установлено при низкой концентрации при использовании испытуемых соединений, меченых радиоактивным изотопом (обычно  $^{14}\text{C}$ ) (ИСО 14592).

## 5 Условия проведения испытаний

Инокуляцию следует проводить в темном месте или месте с рассеянным светом при температуре от  $15\text{ }^\circ\text{C}$  до  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , варьируя не более чем на  $\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  во время проведения испытания. В тех случаях, когда целью исследования является воспроизведение состояния окружающей среды, испытания могут проводиться за пределами обычного температурного диапазона.

## 6 Реактивы

Используют как естественную среду испытания (6.2), так и искусственную морскую воду (6.3). Используют только реактивы известной аналитической чистоты.

6.1 Вода, дистиллированная или деионизированная, содержащая менее чем  $1\text{ мг/л DOC}$ .

6.2 Естественная морская вода

6.2.1 Отбор проб и подготовка

Используют любую морскую воду естественного происхождения. Набирают пробу в тщательно очищенную емкость и транспортируют в лабораторию, желательно в течение не более двух дней. При транспортировке температура образца не должна значительно превышать диапазон от  $10\text{ }^\circ\text{C}$  до  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

Необходимо указать следующую информацию:

- место и глубина набора пробы;
- состояние загрязнения и питательные свойства точки пробоотбора (например, концентрация нитратов, аммония и фосфатов) и внешний вид образца;
- дата забора пробы, время начала и время окончания испытания;
- температура при отборе;
- соленость и DOC (использовать, например, ИСО 8245).

Когда используют естественную морскую воду, как правило, доступно достаточное количество микроорганизмов и их дополнительное внедрение не требуется.

Рекомендуется определить число колониеобразующих гетеротрофных бактерий в естественной морской воде, например посевом на агар в чашках Петри. Подходящая концентрация бактерий составляет около  $10^5$  клеток на мл в каждой испытательной колбе. Если плотность бактерий в естественной морской воде слишком низкая, следует сделать посев, как описано для искусственной морской воды (6.3).

Проверяют активность естественной морской воды с помощью вещества сравнения.

**Примечание** — Как правило, естественная морская вода и инокулят не должны предварительно подвергаться воздействию испытуемого соединения, чтобы обеспечить общее прогнозирование процесса разложения в окружающей среде. При определенных обстоятельствах, в зависимости от цели испытания, может быть использовано предварительно подверженный воздействию испытуемого соединения инокулят, при условии что это четко зафиксировано в протоколе испытания (например, процент биоразлагаемости равен  $x\%$  при использовании инокулята, который подвергнулся предварительному воздействию) и метод предварительного воздействия также детально приводят в протоколе испытания. Инокулят, который подвергается предварительному воздействию, может



быть взят из лабораторных испытаний биоразложения морской воды, проведенных при различных условиях, или из образцов, отобранных в местах, где существуют соответствующие условия окружающей среды (например, на загрязненных территориях).

**Примечание** — Количество бактерий для испытания может быть увеличено, например, путем центрифугирования и ресуспендирования в более маленький объем морской воды.

Для уменьшения концентрации DOC или BOD в холостой пробе предварительное кондиционирование возможно. Образец выдерживают в темноте или при рассеянном свете при температуре испытания в аэробных условиях до одной недели. Когда добавленный инокулят содержит слишком много DOC (более 10 % органического углерода добавлено с испытуемым соединением), избыток удаляют путем промывания искусственной морской водой (6.3) и центрифугируют. Содержание общего неорганического углерода (ТНС) в естественной морской воде обычно высоко; в этом случае оно должно быть уменьшено в соответствии с ИСО 14593. Измеряют pH образца морской воды. Барботируют свободным от CO<sub>2</sub> воздухом в течение 1 ч, поддерживая pH на уровне 6,5 с помощью концентрированного хлорида водорода (HCl). В конце восстанавливают pH до его исходного значения гидроксидом натрия (NaOH).

Перед использованием удаляют крупные частицы из морской воды путем фильтрации, используя, например, фильтровальную бумагу или осаждение. Для получения достаточной буферной емкости и снабжения питательными веществами испытуемого раствора, добавляют в качестве минерального питательного вещества (6.2.2) обычную неорганическую среду стандартных испытаний на биоразложение, за исключением растворов с сульфатом магния и хлорида кальция, так как эти минералы присутствуют в любой естественной морской воде в достаточной концентрации.

#### 6.2.2 Минеральные питательные вещества

Для приготовления 1000 мл среды испытания добавляют около 800 мл естественной морской воды (6.2), 10 мл раствора а) и 1 мл раствора б), указанных ниже, затем доводят до 1000 мл морской водой (6.2).

##### 6.2.2.1 Раствор а)

Растворяют

ангидрида дигидрогенфосфата калия (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 8,5 г

ангидрида гидроортофосфата калия (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 21,75 г

дигидрата дигидрогенфосфата динатрия (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) 33,4 г

хлорида аммония (NH<sub>4</sub>Cl) 0,5 г

в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

##### 6.2.2.2 Раствор б)

Растворяют 0,25 г гексагидрата хлорида железа (III) (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл. Готовят этот раствор свежим перед использованием или добавляют каплю концентрированной хлороводородной кислоты (HCl) во избежание образования осадка.

### 6.3 Искусственная морская вода

Используют доступную искусственную морскую воду или готовят в водном растворе следующего состава. Для получения 1000 мл среды испытания добавляют около 800 мл раствора г), 1 мл каждого из растворов от h) до j) и доводят раствором г) до 1000 мл.

При использовании искусственной морской воды в качестве среды испытания для получения достаточной деятельности по биоразложению в качестве среды испытания для получения инокулята используют любой материал морского происхождения, например: фильтрованную морскую воду, суспензию морского осадка, бактерии из фильтров морского аквариума. Берут подходящий образец инокулята и добавляют его к искусственной морской воде для получения достаточной концентрации бактерий для испытания (6.2.1). Проверяют активность инокулированной искусственной морской воды с помощью вещества сравнения. Для любого требуемого снижения DOC в инокуляте и преадаптации см. 6.2.1.

#### 6.3.1 Раствор а)

Растворяют

хлорид натрия (NaCl) 47,8 г

сульфат натрия (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 8,0 г

хлорид калия (KCl) 1,4 г

гидрокарбонат натрия (NaHCO<sub>3</sub>) 0,04 г

бромид калия (KBr) 0,2 г

борная кислота ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 0,06 г  
фторид натрия ( $\text{NaF}$ ) 0,006 г  
в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

#### 6.3.2 Раствор b)

Растворяют 203,3 г гептагидрата сульфата магния ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

#### 6.3.3 Раствор c)

Растворяют 147 г дигидрата хлорида кальция ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

#### 6.3.4 Раствор d)

Растворяют 26,61 г гексагидрата хлорида стронция ( $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

#### 6.3.5 Раствор e)

Растворяют 136,1 г ангидрида дикалия гидрофосфата ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

#### 6.3.6 Раствор f)

Растворяют 26,74 г хлорида аммония ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

#### 6.3.7 Раствор g)

Для получения раствора g), смешивают 500 мл раствора a), 53,3 мл раствора b), 10,3 мл раствора c), 0,9 мл раствора d), 1,25 мл раствора e) и 1 мл раствора f), доводят необходимым количеством воды (6.1) до 1000 мл. Содержание солей раствора g) составляет около 35 %.

#### 6.3.8 Раствор h)

Растворяют 15 мг дрожжевого экстракта в 100 мл воды (6.1) непосредственно перед использованием.

#### 6.3.9 Раствор i)

Растворяют  
моногидрата сульфата марганца ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 60,46 г  
гептагидрата сульфата цинка ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 85,6 г  
тетрагидрата молибдата аммония ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 73,7 г  
в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл.

#### 6.3.10 Раствор j)

Растворяют 89 мг гексагидрата хлорида железа (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) в воде (6.1), доводят необходимым количеством воды до 1000 мл. Готовят этот раствор свежим перед использованием или добавляют каплю концентрированной хлороводородной кислоты ( $\text{HCl}$ ) во избежание образования осадка.

### 6.4 Испытуемые растворы

#### 6.4.1 Испытуемое соединение

Готовят основной раствор из растворимого в воде в достаточной степени испытуемого вещества в воде (6.1) и добавляют подходящее количество этого раствора в испытательные колбы для получения конечной концентрации испытуемого соединения, как указано в стандартных методах. Добавляют летучие соединения или такие соединения с низкой прямой растворимостью в воде в испытательные колбы методами, подходящими для этих целей (таблица 2). Добавляемое количество определяют точно.

Примечание — За более подробной информацией по обращению с соединениями, плохо растворимыми в воде, необходимо обращаться к ИСО 10634.

#### 6.4.2 Вещество сравнения

В качестве вещества сравнения используют органическое соединение с известной биоразлагаемостью, такое как анилин или бензоат натрия, которые имеют степень разлагаемости более 60 % для  $\text{BOD}$  и  $\text{CO}_2$ , более 70 % для  $\text{DOC}$  и 80 % при анализе особых веществ, которые, как ожидается, должны показать типичную кривую биоразложения. Готовят основной раствор вещества сравнения в воде (6.1) таким же образом, как и растворимое в воде испытуемое соединение (6.4.1), для того, чтобы получить конечную концентрацию вещества сравнения, как приводится в основных методах.

#### 6.4.3 Раствор для проверки ингибирующего действия

Если требуется (например, при отсутствии информации о токсичности испытуемого соединения), готовят раствор, содержащий в воде (6.1) и испытуемое соединение (6.4.1), и вещество сравнения

(6.4.2) в подходящих количествах, чтобы можно было обнаружить такие же концентрации, как ожидается в испытании.

## 7 Оборудование

Используют оборудование, как указано в основных стандартных методах.

Необходимо принять к сведению, что содержание солей и температура будут влиять на измерение кислорода в морской воде. Используют только такое оборудование, которое может при измерениях кислорода скорректировать результаты для содержания солей.

## 8 Проведение испытания

Установить достаточное число испытательных колб, как описано в основных стандартных методах для того, чтобы получить:

- по меньшей мере две испытательные колбы (символ  $F_T$ ) для испытуемого соединения (6.4.1) в среде испытания с инокулятом (6.2 или 6.3);
- по меньшей мере две свободные испытательные колбы (символ  $F_B$ ) для испытуемого соединения (6.4.1) в среде испытания с инокулятом (6.2 или 6.3);
- по меньшей мере одну колбу для проверки процедуры (символ  $F_C$ ), содержащей вещество сравнения (6.4.2) и среду испытания с инокулятом (6.2 или 6.3);
- при необходимости по меньшей мере одну колбу для проверки возможного эффекта ингибирования испытуемого вещества (символ  $F_I$ ), содержащую раствор (6.4.3) и среду испытания с инокулятом (6.2 или 6.3);
- при необходимости по меньшей мере одну колбу для проверки возможного удаления абиоты (символ  $F_S$ ), содержащейся в испытуемом соединении (6.4.1) и среде испытания с инокулятом (6.2 или 6.3). Инокулят не добавляют и стерилизуют путем добавления подходящего органического соединения для предотвращения микробной деятельности. Используют, например, 1 мл на 1 л раствора, содержащего 10 г/л хлорида ртути (II) ( $HgCl_2$ ). Добавляют такое же количество токсичного вещества снова, спустя две недели после начала теста.

**Примечание** — Хлорид ртути единственное неорганическое токсичное соединение, которое показало свою пригодность в подобных испытаниях биоразложения. Поскольку оно используется в очень малых количествах, оно не наносит вреда окружающей среде.

**Примечание** — Для получения кривой биоразложения необходимо приготовить достаточное количество колб для этих методов, в которых может быть сделано единственное определение, и эти колбы должны быть пожертвованы для измерений (ISO 10707 и ISO 14593). Число испытательных колб напрямую зависит от числа предполагаемых измерений.

Добавляют соответствующее количество среды испытания (6.2 или 6.3), испытуемые соединения (6.4.1) и вещества сравнения (6.4.2) в соответствующие колбы согласно таблице 1 для получения желаемых концентраций для испытания и конечных объемов испытания, как указано в основных стандартных методах (таблица 2).

Таблица 1 — Распределение испытуемых соединений и веществ сравнения

Колба	Среда испытания	Испытуемое соединение	Вещество сравнения	Инокулят
$F_T$ Испытуемое соединение	+	+	—	+
$F_T$ Испытуемое соединение	+	+	—	+
$F_B$ Свободная	+	—	—	+
$F_B$ Свободная	+	—	—	+
$F_C$ Проверка инокулята	+	—	+	+
$F_I$ Контроль ингибирования (при необходимости)	+	+	+	+
$F_S$ Проверка удаления абиоты (при необходимости)	+	+	—	—

Таблица 2 — Параметры испытаний

Основной метод стандарта	Концентрация испытуемого соединения, мг/л	Аналитические параметры	Продолжительность испытания, дней	Пригодность для соединений с низкой растворимостью в воде	Пригодность для летучих соединений
ISO 7827	от 5 до 40 (DOC)	DOC	60	нет	нет
ISO 10707	от 2 до 10 (вещество)	BOD	60	да	да
ISO 10708	100 (ThOD)	BOD	60	да	нет
ISO 9439	20 (TOC)	CO <sub>2</sub>	60	да	нет
ISO 14593	от 20 до 40 (TOC)	TIC	60	да	да

Примечание — Удаление DOC может быть обусловлено не только биоразложением, но и абиотическими процессами, такими как адсорбция на инокуляте или стенках колбы или, в случае летучих испытуемых соединений, выталкивание и адсорбция на трубке, и вследствие этого не всегда является неоспоримым доказательством биоразложения.

Измеряют pH и регулируют при необходимости его значение между 7 и 8. Используют такой pH в случае естественной морской воды. Помещают все испытательные колбы на водяную баню или в комнату с постоянной температурой, дают им достигнуть желаемой температуры (см. раздел 5), плотно закупоривают колбы, проводят любые необходимые соединения и начинают выдерживание. Берут образцы или берут показания измеряемых параметров, которые указаны в основных стандартах (таблица 2). Измеряют аналитические параметры в начале (время 0), в конце (время  $t$ ) периода испытания и подходящие промежутки для получения кривых биоразложения. Когда наблюдается первичное биоразложение, определяют концентрацию испытуемого соединения, используя специальный анализ в колбе  $F_T$  и  $F_S$  в конце испытания (время  $t$ ). В случае использования веществ, помеченных радиоизотопом, требуются отдельные испытания и способы оценки (например, ИСО 14592).

Если достигнут почти постоянный уровень биоразлагаемости (фаза плато) и далее биоразложение не ожидается, испытание считают законченным. Условия испытания в морских средах, как правило, менее благоприятны, чем условия испытания озерных тест-систем. По этой причине продолжительность испытания должна быть увеличена по сравнению с обычным временем в 28 дней в водных опытных партиях. Максимальная продолжительность испытания 60 дней. В последний день испытания проводят все необходимые работы, как требуется в соответствии с основными стандартами. Если испытуемое соединение содержит азот, определяют в случае измерений BOD конечные концентрации нитратов и нитритов и рассматривают любые нитрификации, как приведено в основных методах.

## 9 Вычисление и обработка результатов

Обрабатывают измеренные значения и вычисляют полное и (при необходимости) первичное биоразложение испытуемого соединения, как указано в соответствующих основных стандартах.

Составляют таблицу измеренных значений и указывают биоразложение в процентах для каждого измеренного интервала и каждой испытательной колбы. Строят кривую биоразложения в процентах как функцию от времени. Если получены сравнимые результаты для дублируемых испытательных колб FT (разница менее 20 %), строят основную кривую, в остальных случаях строят кривые для каждой колбы. Некоторые параметры могут быть установлены по данной кривой и отмечены на ней, в частности (если доступно достаточно данных) лаг-фаза, время разложения и максимальный уровень разложения.

Устанавливают основное значение процента биоразложения в фазе плато или используют самое большое значение, например когда кривая начинает снижаться от фазы плато, и указывают этот максимальный уровень биоразложения как «степень биоразложения испытуемого соединения» в протоколе испытания.

Если удаляемый DOC использовался для определения биоразложения, необходимо иметь в виду, что выделение из воды измерено в первую очередь. Если испытуемое вещество незначительно выделяет абиотически (например, путем адсорбции или выделения в воздух) и кривая выделения имеет типичную форму с лаг-фазой, разложением и фазой плато или если доступно больше информации о биоразлагаемости, например из результатов испытаний в озерной среде, определяют измеренное выделение DOC к биоразложению.

Вычисляют тем же путем степень биоразложения вещества сравнения,  $F_C$ , и, если они включены, проверку удаления абиоты,  $F_S$ , и контроль ингибирования,  $F_I$ , и строят кривые.

Информация о токсичности испытуемого соединения может быть полезна при интерпретации результатов испытания, показывая низкое биоразложение. Если в колбе  $F_I$  процент разложения менее 25 % и разложение испытуемого соединения, наблюдаемое в колбах  $F_T$ , несущественно, можно сделать вывод, что испытуемое соединение является ингибитором. В этом случае испытание следует повторить с использованием более низкой концентрации или с другим инокулятом. Если в колбе  $F_S$  (при включении проверки удаления абиоты) наблюдается значительное количество (более 10 %) DOC,  $CO_2$  или BOD, могут протекать процессы удаления абиоты.

## 10 Правильность результатов

Испытание рассматривают как действительное, если процент разложения в колбе  $F_C$  (проверка инокулята) более 60 % (в случае измерения DOC более 70%) на 14-й день.

## 11 Результаты круговых испытаний

Методы, используемые в настоящем стандарте, кроме испытания удаления DOC, проверены круговыми испытаниями, которые были организованы OSPARCOM. Результаты представлены в [1].

Т а б л и ц а 3 — Результаты круговых испытаний OSPARCOM

Испытуемое соединение	Биоразложение более 60 % после 28 дней, % результата	Биоразложение более 60 % после 60 дней, % результата	Средняя лаг-фаза, дней	Среднее время достижения 50 % от максимального биоразложения, дней
Бензоат натрия	A:100 B:100 C:91 D:100	A:100 B:100 C:100 D:100	A:1,6 B:0,9 C:2,1 D:2,4	A:2,1 B:2,9 C:4,6 D:2,6
Anco Green B	A:60 B:92 C:75 D:71	A:80 B:100 C:83 D:85	A:2,4 B:1,3 C:3,0 D:2,1	A:3,9 B:2,5 C:5,9 D:6,1
Aquamul BII	A:0 B:0 C:0 D:0	A:0 B:0 C:0 D:0	A-D up to 60	—
Пентаэритрит	A:0 B:0 C:0 D:0	A:0 B:36 C:18 D:14	A: > 60 B:21–60 C:28–60 D:14–60	—
Примечание — A: ИСО 9439 B: ИСО 10707 C: ИСО 10708 D: ИСО 14593; Aquamul BII b Anco Green B буровые растворы.				

Заключения в отчете OSPARCOM такие: все четыре метода подходят для испытаний биоразлагаемости в морской воде, результаты получаются сравнимые, но каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Выбор следует делать в зависимости от оснащённости лаборатории и специфических параметров соединения.

Испытание на удаление DOC (ИСО 7827) и испытание в закрытой бутылке (ИСО 10707) приняты как Руководство OECD 306. Эти методы были проверены в круговых испытаниях, которые были организованы Европейской комиссией и известны как обычно принятые методы испытаний.

## 12 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать по меньшей мере следующую информацию:

а) ссылку на настоящий стандарт и используемые основные стандарты;

- b) всю необходимую информацию для идентификации испытуемого соединения;
- c) все полученные результаты измерений и вычисленные данные (например, в табличной форме), кривая разложения;
- d) концентрация испытуемого образца и вещества сравнения;
- e) наименование используемого образца сравнения и разложение, полученное с этим соединением;
- f) источник и характеристики морской воды, а также информация о какой-либо предварительной обработке;
- g) температура выдерживания в инкубаторе;
- h) если включено, информация об удалении абиоты и ингибировании, а также заявление о токсичности испытуемого соединения;
- i) причины в случае отказа от испытания;
- j) любое отклонение от стандартной процедуры или любые другие обстоятельства, которые могут повлиять на результаты.

**Приложение ДА  
(справочное)**

**Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов  
национальным стандартам Российской Федерации**

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 7827:2010	IDT	ГОСТ Р ИСО 7827—2016 «Качество воды. Оценка способности органических соединений к быстрому и полному аэробному биоразложению в водной среде. Метод с применением анализа растворенного органического углерода (DOC)»
ИСО 9439:1999	IDT	ГОСТ Р ИСО 9439—2016 «Качество воды. Оценка биоразлагаемости органических соединений в водной среде. Метод оценки полной аэробной биоразлагаемости путем измерения количества выделенного диоксида углерода»
ИСО 10707:1994	IDT	ГОСТ Р ИСО 10707—2016 «Качество воды. Оценка способности органических соединений к «конечному» аэробному биологическому разложению в водной среде. Метод анализа биохимической потребности в кислороде (испытание в закрытой склянке)»
ИСО 10708:2013	IDT	ГОСТ Р ИСО 10708—2016 «Качество воды. Оценка способности органических соединений к конечному биологическому разложению в водной среде. Определение биохимической потребности в кислороде при двухфазном испытании в закрытой склянке»
<p>Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов: IDT — идентичные стандарты.</p>		

## Библиография

- [1] Biodegradability of chemical substances in seawater — Results of the four OSPARCOM ring tests — Final report November 1996. Available from ELF Akvamiiljo Mekjarvik 12, N-4070 Randaberg.
- [2] ИСО 6060, Water quality — Determination of the chemical oxygen demand.
- [3] ИСО 8245, Water quality — Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).
- [4] ИСО 10634, Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- [5] ИСО/TR 15462, Water quality — Selection of tests for biodegradability.
- [6] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (1993) — 306, Biodegradability in Seawater. Available from the Organization for Economic Cooperation and Development, 2, rue André Pascal, F-75775 Paris Cedex 16.

---

УДК 551.464.3:006.354

ОКС 13.060.70

Ключевые слова: качество воды, биоразложение, морская среда

---

Редактор *И.А. Косорукова*  
Корректор *Г.В. Яковлева*  
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 30.06.2016. Подписано в печать 22.08.2016. Формат 60 × 84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 1,86.

---

Набрано в ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.  
[www.jurisizdat.ru](http://www.jurisizdat.ru) [y-book@mail.ru](mailto:y-book@mail.ru)

Издано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995, Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)