

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(МГС)  
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

ГОСТ  
33644—  
2015

---

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ  
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ,  
ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ  
ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Определение биоразлагаемости в морской воде

OECD, Test No. 306:1992  
(MOD)

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2016

## Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

### Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт стандартизации материалов и технологий» (ФГУП «ВНИИ СМТ») на основе аутентичного перевода на русский язык документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 октября 2015 г. № 81-П)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному документу OECD Test № 306:1992 Biodegradability in Seawater (ОЭСР, Тест № 306:1992 Определение биоразлагаемости в морской воде) путем изменения структуры. Сравнение структуры международного документа со структурой настоящего стандарта приведено в приложении ДА.

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия — модифицированная (MOD)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 ноября 2015 г. № 1865-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33644—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 сентября 2016 г.

### 6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «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))*

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения	1
2 Выбор метода	1
3 Метод со встряхиваемыми колбами	2
3.1 Принцип метода	2
3.2 Информация об испытуемом веществе	2
3.3 Стандартные вещества	2
3.4 Воспроизводимость и чувствительность метода	3
3.5 Описание метода	3
3.6 Данные и отчет о проведении испытания	6
4 Метод с закрытыми сосудами	7
4.1 Принцип метода	7
4.2 Информация об испытуемом веществе	8
4.3 Стандартные вещества	8
4.4 Воспроизводимость	8
4.5 Описание метода	8
4.6 Проведение испытания	11
4.7 Данные и отчет о проведении испытания	11
Приложение А (рекомендуемое) Определение органического углерода в морской воде. Метод со встряхиваемыми колбами	14
Приложение Б (рекомендуемое) Биоразложение в морской воде. Метод со встряхиваемыми колбами. Протокол испытания	15
Приложение В (рекомендуемое) Определение теоретической биохимической потребности в кислороде. Метод с закрытыми сосудами	17
Приложение Г (рекомендуемое) Номограмма зависимости насыщенной концентрации растворенного кислорода от солености и температуры	18
Приложение Д (рекомендуемое) Биоразложение в морской воде. Метод с закрытыми сосудами. Протокол испытания	19
Приложение ДА (справочное) Сравнение структуры международного документа со структурой настоящего стандарта	21
Библиография	25

## Введение

На время разработки первоначальных стандартов ОЭСР не было известно, в какой степени результаты предварительных испытаний полной биоразлагаемости с использованием пресной воды и сточных вод или активного ила в качестве инокулята могут быть использованы для морской среды. По данному вопросу имелись различающиеся между собой результаты [1].

Многие промышленные сточные воды, содержащие различные химические вещества, достигают моря в результате непосредственного сброса или через лиманы и реки, в которых время нахождения многих химических веществ меньше периода, необходимого для полного биоразложения. Методы испытания биоразлагаемости в морской воде были разработаны с учетом возрастающего понимания необходимости защиты морской среды от высокого содержания химических веществ, а также необходимости определения возможной концентрации химических веществ в море.

В методах, описанных в настоящем стандарте, используется природная морская вода в качестве водной фазы и в качестве источника микроорганизмов. Для того чтобы методы соответствовали определению полной биоразлагаемости в пресной воде, использовали ультрафильтрованную и отцентрифугированную морскую воду, а также использовали морские отложения в качестве инокулята. Эти исследования не привели к желаемому результату. Следовательно, испытываемой средой является природная морская вода, предварительно обработанная для удаления крупных частиц.

Для оценки полной биоразлагаемости методом со встряхиваемыми колбами используют относительно высокие концентрации испытуемого вещества с учетом низкой чувствительности метода анализа растворенного органического углерода (DOC). В свою очередь, для этого требуется добавление к морской воде минеральных питательных веществ (N и P), поскольку иначе их низкие концентрации ограничат снижение DOC. Также питательные вещества добавляют при постановке метода с закрытыми сосудами ввиду концентрирования добавленного испытуемого вещества.

Таким образом, методы не являются методами установления полной биоразлагаемости, поскольку инокулят не вносится в дополнение к микроорганизмам, уже находящимся в морской воде. В испытаниях не имитируется морская среда, поскольку добавляются питательные вещества и концентрация испытуемого вещества значительно выше, чем обычно находится в море. В связи с этим методы предлагаются под новым названием «Биоразлагаемость в морской воде».

Метод со встряхиваемыми колбами представляет вариант модифицированного скринингового метода ОЭСР [2]. Он был доработан Датским институтом качества воды на основе кольцевого метода, разработанного для ЭЭС [3].

В совокупности с данными метода с закрытыми сосудами для морской воды результаты данного испытания не должны рассматриваться в качестве показателей полной биоразлагаемости, но их следует использовать специфически для получения информации о биоразлагаемости химических веществ в морской среде.

Метод с закрытыми сосудами является вариантом для морской воды метода с закрытыми сосудами [4] и был доработан Датским институтом качества воды на основе кольцевого метода, разработанного для ЭЭС [3].

В совокупности с данными метода со встряхиваемыми колбами результаты данного испытания не должны рассматриваться в качестве показателей полной биоразлагаемости, но их следует использовать специфически для получения информации о биоразлагаемости химических веществ в морской среде.

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ,  
ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**
**Определение биоразлагаемости в морской воде**

 Testing of chemicals of environmental hazard  
 Biodegradability in Seawater

Дата введения — 2016—09—01

**1 Область применения**

1.1 Настоящий стандарт устанавливает методы определения биоразлагаемости химических веществ в морской воде.

1.2 Результаты испытаний будут применяться, поскольку характер использования и утилизации конкретного химического вещества определяет путь поступления в море и дает первое представление о биоразлагаемости в морской воде. Если результат является положительным (снижение DOC — менее 70 %; теоретическая потребность в кислороде — менее 60 % ThOD), то можно сделать вывод, что существует возможность биоразложения химического вещества в морской среде. Однако отрицательный результат не исключает такой возможности, а указывает на необходимость проведения дальнейших исследований, например, с использованием как можно более низких концентраций испытуемого вещества.

1.3 В любом случае, если требуются более точные значения скорости или степени биоразложения в морской воде в конкретном месте, то используются другие более сложные и тонкие и, следовательно, более дорогостоящие методы. Например, проводятся имитационные испытания с использованием концентрации испытуемого вещества, близкой к вероятной концентрации в окружающей среде. Кроме того, используют не обогащенную, не обработанную предварительно морскую воду, отобранную из интересующего места, и первичное биоразложение определяют специфическим химическим анализом. Для определения конечного биоразложения необходимы  $^{14}\text{C}$ -меченные химические вещества, позволяющие оценить скорость снижения растворимого органического  $^{14}\text{C}$  и образования  $^{14}\text{CO}_2$  в экологически реальных концентрациях.

**2 Выбор метода**

Выбор используемого метода зависит от ряда факторов; последующая таблица приводится для того, чтобы помочь в выборе метода. Кроме того, химические вещества с растворимостью в воде ниже эквивалентной концентрации, равной примерно 5 мг С/л, не могут быть испытаны методом со встряхиваемыми колбами, хотя для плохо растворимых химических веществ можно использовать метод с закрытыми сосудами.

Таблица 1 — Преимущества и недостатки метода со встряхиваемыми колбами и метода с закрытыми сосудами

Метод	Преимущества	Недостатки
Метод со встряхиваемыми колбами	Простое оборудование, за исключением С-анализатора. Продолжительность 60 сут. не является проблемой. Отсутствие помех за счет реакции нитрификации. Возможность адаптации для летучих химических веществ	Необходим С-анализатор. Использование 5—40 мг DOC/л может привести к ингибированию. Определение DOC затруднительно при низких концентрациях в морской воде (влияние хлорида). DOC иногда высокое в морской воде

Окончание таблицы 1

Метод	Преимущества	Недостатки
Метод с закрытыми сосудами	Простое оборудование. Простое конечное определение. Использование низкой концентрации испытуемого вещества (2 мг/л) приводит к меньшей вероятности ингибирования. Легкая адаптация для летучих химических веществ	Может быть затруднительным поддерживать герметичность сосудов. Рост бактерий на стенках сосудов может привести к ошибочным результатам. Значения поглощения $O_2$ в холостом опыте могут быть высокими особенно после 28 сут.; эту проблему можно преодолеть путем «старения» морской воды. Возможны помехи за счет поглощения $O_2$ в реакции нитрификации

### 3 Метод со встряхиваемыми колбами

#### 3.1 Принцип метода

Заранее определенное количество испытуемого вещества растворяют в испытуемой среде с получением концентрации растворенного органического углерода 5—40 мг DOC/л. Если чувствительность определения органического углерода является высокой, то может быть целесообразным использование более низких концентраций испытуемого вещества, в частности, это касается ингибирующих веществ. Раствор испытуемого вещества в испытуемой среде инкубируют при встряхивании в темноте или при рассеянном свете в аэробных условиях при постоянной температуре (контролируемой до  $\pm 2$  °C), как правило, в диапазоне 15—20 °C. Если цель исследования заключается в имитации ситуаций в окружающей среде, то испытания проводят за пределами этого диапазона стандартных температур. Рекомендуемая максимальная продолжительность испытания составляет около 60 сут. Разложение определяют по измерению DOC (полное разложение) и в некоторых случаях специфическим анализом (первичное разложение).

#### 3.2 Информация об испытуемом веществе

3.2.1 Для того чтобы понять, возможно ли проведение испытания для определенного вещества, необходимо знать некоторые его свойства. Должно быть установлено содержание органического углерода вещества; летучесть вещества должна быть такой, чтобы во время испытания не происходили значительные потери, и его растворимость в воде должна быть выше, чем эквивалентная концентрация 25–40 мг С/л. Кроме того, испытуемое вещество не должно значительно адсорбироваться на стеклянных поверхностях. Информация о чистоте или относительном количестве основных компонентов испытуемого вещества требуется для интерпретации полученных результатов, особенно если результат находится близко к уровню «допуска».

3.2.2 Может быть полезной информация о токсичности испытуемого вещества для бактерий, например по данным краткосрочных испытаний на уровень дыхания [5] для выбора соответствующей испытуемой концентрации, и она может быть важной для правильной интерпретации низких уровней биоразложения. Однако такая информация не всегда достаточна для интерпретации результатов, полученных при испытании биоразложения, и более подходящей является процедура, описанная в 3.5.6.3.

#### 3.3 Стандартные вещества

3.3.1 Подходящие стандартные вещества используют для проверки активности микроорганизмов в пробе морской воды. Бензоат натрия, ацетат натрия и анилин — примеры химических веществ, которые можно использовать для этой цели. Стандартные вещества должны разлагаться в течение разумно короткого периода времени, в противном случае испытание повторяют с использованием другой пробы морской воды.

3.3.2 В кольцевом методе ЕЭС, в котором пробы морской воды были отобраны из различных мест и в разное время года [3], лаг-фаза ( $t_L$ ) и время достижения 50 % разложения ( $t_{50}$ ), исключая лаг-фазу, составляли соответственно 1—4 сут. и 1—7 сут. для бензоата натрия. Для анилина значение  $t_L$  находилось в диапазоне от 0 до 10 сут., в то время как  $t_{50}$  было равно от 1 до 10 сут.

### 3.4 Воспроизводимость и чувствительность метода

Воспроизводимость метода была установлена для кольцевого метода [3]. Наименьшая концентрация испытуемого вещества, для которого этот метод может быть использован с анализом DOC, в значительной степени определяется нижним пределом определения органического углерода (в данном случае обычно примерно 0,5 мг С/л) и используемой концентрацией растворенного органического углерода в морской воде (обычно порядка 3—5 мг/л для вода из открытого моря). Фоновое содержание DOC не должно превышать примерно 20 % общей концентрации DOC после добавления испытуемого вещества. Если это невозможно, то фоновую концентрацию DOC снижают «старением» морской воды перед проведением испытания. Если испытание проводится только со специфическим химическим анализом (в котором измеряется первичное разложение), то исследователь должен представить информацию, основываясь на дополнительных данных, о возможном прогнозируемом полном разложении. Такая дополнительная информация может состоять из результатов других испытаний по полной или естественной биоразлагаемости.

### 3.5 Описание метода

#### 3.5.1 Оборудование

Обычное лабораторное оборудование, и оно включает:

- а) устройство для встряхивания, приспособленное для колб Эрленмейера вместимостью 0,5—2 л, с автоматическим контролем температуры или которое используется при постоянной комнатной температуре 15—20 °С с контролем точности  $\pm 2$  °С;
- б) узкогорлые колбы Эрленмейера 0,5—2 л;
- в) устройство для мембранной фильтрации или центрифуга;
- г) мембранные фильтры 0,2—0,45 мкм;
- д) анализатор углерода;
- е) оборудование для специфического анализа (необязательно).

#### 3.5.2 Морская вода

3.5.2.1 Пробу морской воды отбирают в тщательно очищенный контейнер и транспортируют в лабораторию предпочтительно в течение 1 или 2 сут. после отбора. Во время транспортировки температуру пробы поддерживают на уровне, значительно не превышающем температуру, используемую в испытании. Точно указывают место отбора проб и описывают его с точки зрения загрязнения и уровня питательных веществ. Для прибрежных и загрязненных вод в эту характеристику включают количество колоний гетеротрофных микроорганизмов и определяют концентрацию растворенных нитратов, аммония и фосфатов.

3.5.2.2 Для самой пробы морской воды предоставляют следующую информацию:

- дата отбора;
- глубина отбора;
- внешний вид пробы — мутная проба и т. д.;
- температура в момент отбора;
- соленость;
- DOC;
- время между отбором и использованием в испытании.

3.5.2.3 Если содержание DOC в пробе морской воды находится на высоком уровне (см. 3.4.1), то перед использованием рекомендуется подвергнуть морскую воду «старению» в течение примерно недели. «Старение» проводится в аэробных условиях при температуре испытания и в темноте или в рассеянном свете. При необходимости аэробные условия поддерживают путем легкой аэрации. Во время «старения» содержание легкоразлагающегося органического вещества уменьшается. В кольцевом методе [3] не было выявлено никаких различий между способностью к разложению «состаренной» пробы и только отобранной пробы морской воды. Перед использованием морскую воду предварительно обрабатывают для удаления крупных частиц, например, фильтрованием через фильтр из нейлона или фильтр из грубой бумаги (не мембранные или GF-C фильтры) или осаждением и декантацией. Используемую процедуру описывают. Предварительную обработку проводят после «старения», если оно проводится.

**3.5.3 Стоковые растворы минеральных питательных веществ**

Готовят следующие растворы с использованием химически чистых реактивов:

- |  |         |
|--|---------|
| а) Дигидроортофосфат калия, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                 | 8,50 г  |
| Гидроортофосфат калия, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                      | 21,75 г |
| Гидроортофосфат натрия дигидрат, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 г |
| Хлорид аммония, $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 0,50 г  |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |
| б) Хлорид кальция, $\text{CaCl}_2$   | 27,50 г |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |
| в) Сульфат магния гептагидрат, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$             | 22,50 г |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |
| г) Хлорид железа (III) гексагидрат, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$        | 0,25 г  |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |

Осаждение в растворе (в граммах) можно предупредить добавлением одной капли концентрированной  $\text{HCl}$  или 0,4 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, динатриевой соли) на литр. Если осадок образуется в стоковом растворе, то его заменяют свежеприготовленным раствором.

**3.5.4 Приготовление испытуемой среды**

Добавляют 1 мл каждого из указанных выше стоковых растворов на литр предварительно обработанной морской воды.

**3.5.5 Инокулят**

Специфический инокулят не вносят в дополнение к микроорганизмам, уже находящимся в морской воде. Определяют (необязательно) количество колониеобразующих гетеротрофов в испытуемой морской среде (и также предпочтительно в исходных пробах морской воды), например, подсчетом количества микроорганизмов при посеве на морской агар. Это особенно целесообразно проводить для проб из прибрежных или загрязненных мест. Проверяют активность гетеротрофных микроорганизмов в морской воде, проводя испытание со стандартным веществом.

**3.5.6 Подготовка колб**

3.5.6.1 Перед использованием всю стеклянную посуду тщательно очищают, но не требуется, чтобы она была стерильной (например, с помощью спиртового раствора соляной кислоты), промывают и высушивают для предотвращения загрязнения остатками от предыдущих испытаний. Перед первым использованием колбы также очищают.

3.5.6.2 Испытуемые вещества анализируют в параллельных колбах одновременно с одной колбой со стандартным веществом. Проводят холостой опыт в двух повторностях без испытуемого и стандартного вещества для определения аналитического фона. Испытуемые вещества растворяют в испытуемой среде — их вносят в виде концентрированного стокового раствора — с получением требуемой исходной концентрации, обычно 5—40 мг DOC/л. Стандартное вещество обычно испытывают в исходной концентрации, соответствующей 20 мг DOC/л. Если используются стоковые растворы испытуемого и/или стандартного вещества, то соленость морской воды не должна существенно изменяться.

3.5.6.3 Если предполагается проявление токсических эффектов или их невозможно исключить, то может быть целесообразным включить в дизайн испытания опыт по оценке ингибирующего действия в двух повторностях. В один и тот же сосуд вносят испытуемое и стандартное вещества, и концентрация стандартного вещества обычно является такой же, как в контрольном испытании (т. е. 20 мг DOC/л), для возможного проведения сравнения.

3.5.6.4 Вносят достаточное количество испытуемых растворов в колбы Эрленмейера (подходящее количество — примерно до половины объема колбы) и затем закрывают каждую колбу съемной крышкой (например, из алюминиевой фольги), обеспечивающей газообмен между колбой и окружающим воздухом (ватные пробки непригодны при использовании анализа DOC). Колбы помещают на качалку и встряхивают непрерывно при низкой скорости (например, 100 оборотов в минуту) на протяжении всего испытания. Контролируют температуру (15—20 °C с точностью до  $\pm 2$  °C) и колбы защищают от света для предупреждения роста водорослей. Воздух не должен содержать токсичных веществ.

**3.5.7 Физико-химический контрольный анализ (необязательно)**

Если предполагается возможность абиотического разложения или потеря, например в результате гидролиза (проблема существует только для специфического анализа), испарения или адсорбции, то проводят физико-химический контрольный анализ. Его проводят добавлением хлорида ртути (II)



( $\text{HgCl}_2$ )<sup>1</sup> (50—100 мг/л) к колбам с испытуемым веществом для подавления микробной активности. Значительное снижение DOC или концентрации определенного вещества при физико-химическом контрольном анализе указывает на потери в результате абиотических процессов (если используется хлорид ртути, то следует обратить внимание на помехи или отравление катализатора при анализе).

### 3.5.8 Количество колб

В обычном анализе используются следующие колбы:

колбы 1 и 2 — содержащие испытуемое вещество (испытуемая суспензия);

колбы 3 и 4 — содержащие только морскую воду (холостой опыт);

колба 5 — содержащая стандартное вещество (контрольная процедура);

колба 6 — содержащая испытуемое и стандартное вещества (контроль на токсичность) — обязательно;

колба 7 — содержащая испытуемое вещество и стерилизующий агент (абиотический стерильный контроль) — необязательно.

### 3.5.9 Анализ DOC

В ходе испытания пробы отбираются через соответствующие интервалы времени для анализа DOC (приложение А). Всегда отбираются пробы в начале испытания (сутки 0) и на 60-е сутки. В общей сложности требуется минимум пять проб для определения временной динамики разложения. Фиксированный график времени отбора проб установить невозможно, поскольку скорость биоразложения является разной. Определение содержания DOC проводят в двух повторностях для каждой пробы.

### 3.5.10 Отбор проб

3.5.10.1 Требуемый объем проб зависит от метода анализа (специфического анализа), от используемого анализатора углерода и от процедуры, выбранной для обработки проб перед определением углерода (мембранная фильтрация или центрифугирование) (см. 3.5.10.3 и 3.5.10.4). Перед отбором проб испытуемую среду тщательно перемешивают и обеспечивают, чтобы любое вещество, прилипшее к стенке колбы, было растворено или суспендировано.

3.5.10.2 Сразу после отбора пробы фильтруют через мембранный фильтр или центрифугируют. При необходимости отфильтрованные или отцентрифугированные пробы выдерживают при температуре 2—4 °С в течение 48 ч или при температуре ниже минус 18 °С в течение более длительного периода (если известно, что данное вещество не будет подвергаться изменению, то перед хранением пробу подкисляют до pH 2).

3.5.10.3 Подходят мембранные фильтры (0,2—0,45 мкм), если подтверждается, что они не пропускают углерод и не адсорбируют вещество на стадии фильтрации, например, поликарбонатные мембранные фильтры. Некоторые мембранные фильтры, пропитанные поверхностно-активными веществами для гидрофилизации, могут выделять значительные количества растворенного углерода. Такие фильтры готовят кипячением в деионизованной воде в течение трех последовательных циклов, каждый по 1 ч. После кипячения фильтры хранят в деионизованной воде. Первые 20 мл фильтрата отбрасывают.

3.5.10.4 В качестве альтернативы мембранной фильтрации пробы центрифугируют. Центрифугируют при 40 000 м/с<sup>2</sup> (~ 4000 g) в течение 15 мин., предпочтительно в центрифуге с охлаждением.

**Примечание** — Разделение общего органического углерода [ТОС и DOC (ТОС/DOC)] центрифугированием при очень низких концентрациях не является эффективным за счет того, что либо не все бактерии удалены, либо углерод, входящий в состав бактерий, растворяется повторно. При более высоких испытуемых концентрациях (более 10 мг С на литр) погрешность центрифугирования является сравнительно небольшой.

### 3.5.11 Периодичность отбора проб

3.5.11.1 Если анализы проводятся сразу после отбора проб, то последующее время отбора проб устанавливается с учетом результатов аналитического определения.

3.5.11.2 Если пробы хранятся (см. 3.5.10.2) до анализа, который проводится позднее, то отбирают больше проб, чем требуется минимальное количество, составляющее пять. Последние пробы анализируют первыми и затем поэтапно «обратно» отбору соответствующих проб для анализа, при этом возможно получить обоснованно построенную кривую биоразложения с относительно небольшим количеством аналитических определений. Если к концу испытания разложение отсутствует, то не требуется

<sup>1</sup> Хлорид ртути (II) ( $\text{HgCl}_2$ ) является очень токсичным веществом, с которым следует обращаться с соответствующими мерами предосторожности. Водные отходы, содержащие данное химическое вещество, следует утилизировать соответствующим образом; их не следует сбрасывать в систему сточных вод.

проводить анализ дополнительных проб, и в этой ситуации «обратная» стратегия может сэкономить значительные затраты на анализ.

3.5.11.3 Если на кривой разложения наблюдается плато на 60-е сутки, то испытание заканчивают. Если разложение очевидно началось к 60 сут., но не достигло плато, то опыт продлевается на дополнительный период времени.

### 3.6 Данные и отчет о проведении испытания

#### 3.6.1 Обработка результатов

3.6.1.1 Результаты анализов регистрируются в прилагаемом протоколе испытаний (приложение Б), и рассчитывается значение биоразложения как для испытуемого, так и для стандартного вещества по формуле:

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{M(t)}}{C_0 - C_{M(0)}} \right] \cdot 100, \quad (1)$$

где  $D_t$  — разложение в процентах DOC или снижение концентрации определенного соединения на время  $t$ ;

$C_0$  — исходная концентрация DOC или определенного соединения в испытуемой среде;

$C_t$  — концентрация DOC или определенного соединения в испытуемой среде на время  $t$ ;

$C_{M(0)}$  — исходная концентрация DOC или определенного соединения в холостом опыте;

$C_{M(t)}$  — концентрация DOC или определенного соединения в холостом опыте на время  $t$ .

3.6.1.2 Разложение определяется по снижению DOC в процентах (полное разложение) или снижению концентрации определенного вещества (первичное разложение) на время  $t$ . Рассчитывается концентрация DOC с точностью до 0,1 мг/л, и среднее значение  $D_t$  округляется до ближайшего целого числа в процентах.

3.6.1.3 Процесс разложения изображается графически в виде диаграммы, как показано на рисунке в пункте «Достоверность и интерпретация результатов». Если имеется достаточное количество данных, то по кривой рассчитываются лаг-фаза ( $t_L$ ) и время достижения 50 % удаления в конце лаг-фазы ( $t_{50}$ ).

#### 3.6.2 Отчет о проведении испытания

Отчет о проведении испытания должен содержать следующую информацию:

##### 3.6.2.1 Испытуемое вещество:

- физическая природа и в соответствующих случаях физико-химические свойства;
- химическая идентификация.

##### 3.6.2.2 Условия испытания:

- расположение и описание места отбора проб; загрязнение и уровень питательных веществ (количество колоний, нитраты, аммоний, фосфаты при необходимости);
- характеристика проб (дата отбора проб, глубина, внешний вид, температура, соленость, DOC (необязательно), время между отбором и использованием проб в испытании);
- метод, используемый для «старения» морской воды (если проводится);
- метод, используемый для предварительной обработки (фильтрация/осаждение) морской воды;
- метод, используемый для определения DOC;
- метод, используемый для специфического анализа (необязательно);
- метод, используемый для определения количества гетеротрофов в морской воде (определение количества микроорганизмов посевом или альтернативной процедурой) (необязательно);
- другие методы (необязательно), используемые для характеристики морской воды (измерение АТФ и т. д.).

##### 3.6.2.3 Результаты:

- представление результатов анализа в протоколе испытания (приложение Б);
- графическое представление процесса разложения в испытании на диаграмме, показывающей лаг-фазу ( $t_L$ ), наклон и время (начиная с конца лаг-фазы) достижения 50 % снижения ( $t_{50}$ ). Лаг-фазу можно установить графически, как показано на рисунке в пункте «Достоверность и интерпретация результатов», или удобно принять как время, необходимое для 10 % разложения;
- процент разложения измеряется через 60 сут. или в конце испытания.

##### 3.6.2.4 Обсуждение результатов

#### 3.6.3 Достоверность и интерпретация результатов

3.6.3.1 Результаты, полученные со стандартными веществами, например бензоатом натрия, ацетатом натрия или анилином, должны быть сопоставимы с результатами, полученными кольцевым методом [3, пункт 3.3.2]. Если результаты, полученные со стандартными веществами, являются

нетипичными, то испытание повторяют с использованием другой пробы морской воды. Несмотря на то что результаты опыта по оценке ингибирования не всегда просто интерпретировать за счет влияния DOC испытуемого вещества, значительное замедление снижения общего DOC по сравнению с контролем является признаком, свидетельствующем о наличии токсических эффектов.

3.6.3.2 За счет относительно высоких используемых испытуемых концентраций по сравнению с большинством природных систем (и, следовательно, неудовлетворительного соотношения между концентрациями испытуемого вещества и другими источниками углерода) метод следует рассматривать в качестве предварительного испытания, используемого для установления того, является или нет вещество легкобиоразлагаемым. Следовательно, низкий результат не обязательно означает, что испытуемое вещество не подвергается биоразложению в морской среде, а лишь указывает на необходимость проведения дополнительного испытания для установления этого факта.

Пример опыта по определению теоретического разложения, иллюстрирующего возможный способ установления значений  $t_L$  (продолжительность лаг-фазы) и  $t_{50}$  (временной интервал, начиная с  $t_L$ ), необходимого для достижения 50 % снижения, приводится на рисунке 1.

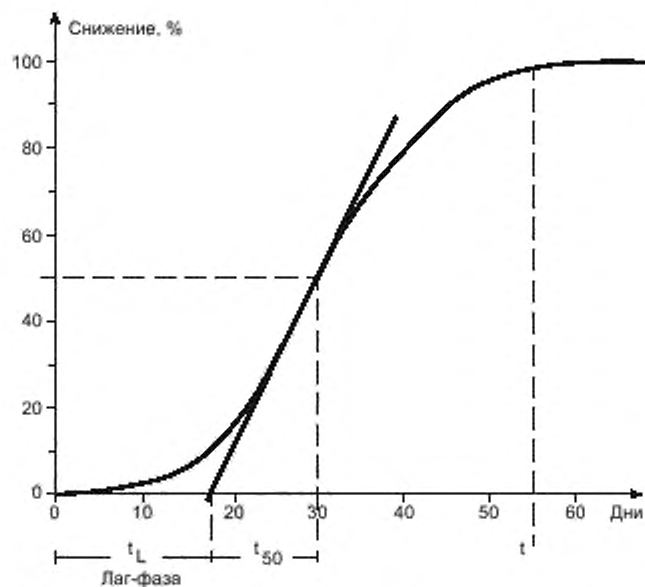


Рисунок 1 — Определение теоретического разложения, иллюстрирующего возможный способ установления значений  $t_L$  и  $t_{50}$ , необходимого для достижения 50 % снижения

## 4 Метод с закрытыми сосудами

### 4.1 Принцип метода

4.1.1 Заранее определенное количество испытуемого вещества растворяют в испытуемой среде обычно в концентрации 2—10 мг испытуемого вещества на литр (могут быть использованы одна или более концентраций). Раствор выдерживают в заполненном закрытом сосуде в темноте на бане при постоянной температуре или в кожухе с контролем температуры до  $\pm 1$  °C в диапазоне 15—20 °C. Если целью исследования является имитация ситуаций в окружающей среде, то испытания проводятся за пределами диапазона обычных температур с внесением соответствующих корректировок для контроля температуры. Разложение детектируется по определению кислорода в течение 28-суточного периода.

4.1.2 Результаты кольцевого метода показали, что если испытание проводится в течение более 28 сут., то в большинстве случаев никакой полезной информации получить невозможно из-за серьезных помех. Значения биологической потребности в кислороде (BOD) в холостом опыте были очень

высокими, вероятно, из-за настенного роста микроорганизмов в отсутствие перемешивания и за счет нитрификации. Таким образом, рекомендуемая продолжительность составляет 28 сут., но если значение BOD в холостом опыте остается в пределах 30 % (см. 4.5.2.4 и 4.7.3.1), то продолжительность испытания может быть увеличена.

## 4.2 Информация об испытуемом веществе

4.2.1 Для того чтобы понять, возможно ли проведение испытания для определенного вещества, необходимо знать некоторые его свойства. Эмпирическая формула необходима для того, чтобы можно было рассчитать теоретическую потребность в кислороде (ThOD) (см. приложение В); в противном случае определяют химическую потребность в кислороде (COD) вещества в качестве стандартного значения. Использование COD является менее подходящим, поскольку некоторые химические вещества не полностью подвергаются окислению во время измерения COD.

4.2.2 Растворимость вещества должна составлять не менее 2 мг/л, хотя, в принципе, можно испытывать вещества с меньшей растворимостью (например, с использованием в таком случае обработки ультразвуком), а также летучие вещества. Информация о чистоте или относительном количестве основных компонентов испытуемого вещества требуется для интерпретации полученных результатов, особенно если результат находится близко к уровню «допуска».

4.2.3 Может быть полезной информация о токсичности испытуемого вещества для бактерий, например по данным краткосрочных испытаний на уровень дыхания [5], для выбора соответствующей испытуемой концентрации, и она также может быть важной для правильной интерпретации низких уровней биоразложения. Однако такая информация не всегда достаточна для интерпретации результатов, полученных при испытании биоразложения, и больше подходит процедура, описанная в 4.5.6.7.

## 4.3 Стандартные вещества

4.3.1 Подходящие стандартные вещества используют для установления активности микроорганизмов в пробе морской воды. Для этой цели могут использоваться, например, анилин, ацетат натрия или бензоат натрия. Разложение этих соединений не менее чем на 60 % ThOD должно иметь место в пределах разумно короткого промежутка времени, в противном случае испытание повторяют с использованием другой пробы морской воды.

4.3.2 В кольцевом методе ЭЭС, в котором пробы морской воды были отобраны в различных местах и в разное время года, лаг-фаза ( $t_L$ ) и время достижения 50 % разложения ( $t_{50}$ ), исключая лаг-фазу, для бензоата натрия составляли соответственно от 0 до 2 и от 1 до 4 сут. Для анилина значения  $t_L$  и  $t_{50}$  равнялись соответственно от 0 до 7 и от 2 до 12 сут.

## 4.4 Воспроизводимость

Воспроизводимость методов была установлена в кольцевом методе ЭЭС [3].

## 4.5 Описание метода

### 4.5.1 Оборудование

Обычное лабораторное оборудование, включающее в себя:

- а) сосуды вместимостью 250—300 мл со стеклянными пробками или узкогорлые сосуды вместимостью 250 мл со стеклянными пробками для определения BOD;
- б) несколько сосудов вместимостью 2, 3 и 4 л, с метками литража для подготовки опыта и для заполнения сосудов для определения BOD;
- в) водяная баня или комната с постоянной температурой для хранения сосудов при постоянной температуре ( $\pm 1$  °C) без света;
- г) оборудование для анализа растворенного кислорода;
- д) мембранные фильтры 0,2—0,45 мкм (необязательно);
- е) оборудование для специфического анализа (необязательно).

### 4.5.2 Морская вода

4.5.2.1 Пробу морской воды отбирают в тщательно очищенный контейнер и транспортируют в лабораторию предпочтительно в течение 1 или 2 сут. после отбора. Во время транспортировки температура пробы не должна значительно превышать температуру, используемую в испытании.

4.5.2.2 Точно указывают место отбора проб и описывают его с точки зрения загрязнения и уровня питательных веществ. Для прибрежных или загрязненных вод в эту характеристику включают

количество колоний гетеротрофных микроорганизмов и определяют концентрацию растворенных нитратов, аммония и фосфатов.

4.5.2.3 Для самой пробы морской воды предоставляют следующую информацию:

- дата отбора;
- глубина отбора;
- внешний вид пробы — мутная и т. д.;
- температура в момент отбора;
- соленость;
- растворенный органический углерод DOC;
- время между отбором и использованием в испытании.

4.5.2.4 Если содержание DOC в пробе находится на высоком уровне или если предполагается, что BOD в холостом опыте через 28 сут. составит более 30 % показателя для стандартного вещества, то рекомендуется подвергнуть морскую воду «старению» в течение приблизительно недели перед использованием.

4.5.2.5 «Старение» пробы проводится в аэробных условиях при температуре испытания в темноте или при рассеянном свете. При необходимости аэробные условия поддерживают путем легкой аэрации. Во время «старения» содержание легкоразлагающегося органического вещества уменьшается. В кольцевом методе [3] не было выявлено никаких различий между способностью к разложению «состаренной» пробы и только отобранной пробы морской воды.

4.5.2.6 Перед использованием морскую воду предварительно обрабатывают для удаления крупных частиц, например, фильтрованием через фильтр из нейлона или фильтр из грубой бумаги (не мембранные или GF-C фильтры) или осаждением и декантацией. Используемую процедуру описывают. Предварительную обработку проводят после «старения», если оно проводится.

#### 4.5.3 Стоковые растворы минеральных питательных веществ

Готовят следующие растворы с использованием химически чистых реактивов:

- |  |         |
|--|---------|
| а) Дигидроортофосфат калия, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                 | 8,50 г  |
| Гидроортофосфат калия, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                      | 21,75 г |
| Гидроортофосфат натрия дигидрат, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 г |
| Хлорид аммония, $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 0,50 г  |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |
| б) Хлорид кальция, $\text{CaCl}_2$   | 27,50 г |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |
| в) Сульфат магния гептагидрат, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$             | 22,50 г |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |
| г) Хлорид железа (III) гексагидрат, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$        | 0,25 г  |
| Растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.                                  |         |

Осаждение в растворе (г) можно предупредить добавлением одной капли концентрированной HCl или 0,4 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, динатриевой соли) на литр. Если осадок образуется в стоковом растворе, то его заменяют свежеприготовленным раствором.

#### 4.5.4 Приготовление испытываемой среды

Добавляют 1 мл каждого из указанных выше стоковых растворов на литр предварительно обработанной морской воды. Испытуемую среду насыщают воздухом при температуре испытания посредством аэрации чистым сжатым воздухом в течение примерно 20 мин. Определяют концентрацию растворенного кислорода для контроля. Насыщенную концентрацию растворенного кислорода в зависимости от солености и температуры определяют по номограмме (см. приложение Г).

#### 4.5.5 Инокулят

Специфический инокулят не вносят в дополнение к микроорганизмам, уже находящимся в морской воде. Определяют (необязательно) количество колониеобразующих гетеротрофов в испытываемой морской среде (и также предпочтительно в исходных пробах морской воды), например, по количеству микроорганизмов при посеве на морской агар. Это особенно целесообразно проводить для проб из прибрежных или загрязненных мест. Проверяют активность гетеротрофных микроорганизмов в морской воде, проводя испытание со стандартным веществом.

#### 4.5.6 Подготовка испытываемых сосудов

4.5.6.1 Выполняют все необходимые операции, включая «старение» и предварительную обработку морской воды при выбранной температуре испытания от 15 до 20 °С, обеспечивая чистоту, но не стерильность всей стеклянной посуды.

4.5.6.2 Готовят ряд сосудов для определения BOD испытуемого и стандартного вещества в одной серии экспериментов. Все анализы проводят в параллельных сосудах (холостой опыт, стандартное и испытуемое вещество), т. е. готовят два сосуда для каждого определения. Анализ проводят по меньшей мере на 0, 5, 15 и 28 сут. (четыре определения).

Для анализа кислорода требуется четыре определения в общей сложности  $3 \times 2 \times 4 = 24$  сосуда (холостой опыт, стандартное и испытуемое вещество) и, таким образом, около 8 л испытуемой среды (для одной концентрации испытуемого вещества).

4.5.6.3 Готовят отдельные растворы испытуемого и стандартного вещества в больших сосудах достаточной вместимости (см. 4.5.1.1), вначале добавляют непосредственно испытуемое и стандартное вещество или внесением их концентрированного стокового раствора в не полностью заполненные большие сосуды. Затем вносят испытуемую среду для получения конечной требуемой концентрации. Если используются стоковые растворы испытуемого и/или стандартного вещества, то соленость морской воды не должна существенно изменяться.

4.5.6.4 Выбирают концентрации испытуемого и стандартного вещества с учетом:

а) содержания растворенного кислорода в морской воде при преобладающих значениях температуры и солености (см. приложение Г);

б) результатов определения BOD морской водой в холостом опыте;

в) предполагаемой биоразлагаемости испытуемого вещества.

4.5.6.5 При температуре 15 и 20 °С и солености 32 ‰ (соленость океанской воды) содержание растворенного кислорода составляет соответственно около 8,1 и 7,4 мг/л. Потребление кислорода самой морской водой (дыхание в холостом опыте) может равняться 2 мг O<sub>2</sub>/л или более, если морская вода не подвергалась «старению». Для того чтобы обеспечить высокую концентрацию кислорода, оставшегося после окисления испытуемого вещества, используют начальную концентрацию испытуемого вещества примерно 2—3 мг/л (в зависимости от ThOD) для соединений, которые, как предполагается, полностью разлагаются в условиях испытания (например, как стандартные вещества). Испытуемые вещества с низкой биоразлагаемостью тестируют в более высоких концентрациях, примерно до 10 мг/л, при условии отсутствия токсических эффектов. Это может быть целесообразным для проведения параллельных испытаний с низкой (примерно 2 мг/л) и высокой (примерно 10 мг/л) концентрациями испытуемого вещества.

4.5.6.6 Параллельно определяют кислород в холостом опыте в сосудах, не содержащих испытуемое и стандартное вещество.

4.5.6.7 Если оценивают ингибирующие эффекты, то готовят следующую серию растворов в отдельных больших сосудах (см. 4.5.2.2):

а) 2 мг/л для легкоразлагающегося вещества, например, любого из указанных стандартных веществ;

б)  $x$  мг/л испытуемого вещества ( $x$  обычно равен 2);

в) 2 мг/л легкоразлагающегося вещества плюс  $x$  мг/л испытуемого вещества.

#### 4.5.7 Физико-химический контрольный анализ (необязательно)

Если предполагается использовать специфический анализ, то проводят физико-химический контрольный анализ для проверки наличия абиотического разложения испытуемого вещества, например, в результате гидролиза или адсорбции. Его проводят добавлением хлорида ртути (II) (HgCl<sub>2</sub>)<sup>1</sup> (50—100 мг/л) в параллельные колбы с испытуемым веществом для подавления микробной активности. Значительное снижение концентрации определенного вещества при физико-химическом контрольном анализе указывает на потери в результате абиотических процессов.

#### 4.5.8 Количество сосудов для определения BOD в обычном анализе

В обычном анализе используются следующие сосуды:

- не менее 8 сосудов, содержащих испытуемое вещество;
- не менее 8 сосудов, содержащих только обогащенную питательными веществами морскую воду;
- не менее 8 сосудов, содержащих стандартное вещество, при необходимости;
- 6 сосудов, содержащих испытуемое и стандартное вещество (контроль на токсичность).

<sup>1</sup> Хлорид ртути (II) (HgCl<sub>2</sub>) является очень токсичным веществом, с которым следует обращаться с соответствующими мерами предосторожности. Водные отходы, содержащие данное химическое вещество, следует утилизировать надлежащим образом; их не следует сбрасывать в систему сточных вод.

## 4.6 Проведение испытания

4.6.1 Сразу после приготовления каждый раствор откачивают из нижней четверти (но не со дна) соответствующего большого сосуда для заполнения соответствующего ряда сосудов для определения BOD. Сразу определяют нулевой уровень (на нулевое время) растворенного кислорода (см. 4.6.4) или сохраняют для дальнейшего химического анализа осаждением  $MnCl_2$  [хлоридом марганца (II)] и NaOH (гидроксидом натрия).

4.6.2 Остальные параллельные сосуды BOD инкубируют при температуре испытания (15—20 °С), выдерживают в темноте, извлекают из места инкубации через соответствующие интервалы времени (например, минимум через 5, 15 и 28 сут.) и определяют содержание растворенного кислорода (см. 4.6.4).

4.6.3 Пробы, предназначенные для специфического анализа (необязательно), подвергают мембранной фильтрации (0,2—0,45 мкм) или центрифугированию в течение 15 мин. Пробы хранят до 48 ч при 2—4 °С или в течение более длительного периода при температуре минус 18 °С, если анализ не проводится сразу же (если известно, что испытуемое вещество будет оставаться без изменений, то перед хранением пробы подкисляют до pH 2).

### 4.6.4 Определение растворенного кислорода

Концентрацию растворенного кислорода определяют с использованием химического или электрохимического методов, признанных на национальном или международном уровнях.

## 4.7 Данные и отчет о проведении испытания

### 4.7.1 Обработка результатов

4.7.1.1 Результаты анализов регистрируются в прилагаемом протоколе испытания (см. приложение Д).

4.7.1.2 BOD рассчитывается как разность снижения уровня кислорода в холостом опыте и растворе испытуемого вещества в условиях испытания. Снижение уровня кислорода делят на концентрацию (мас./об.) вещества, чтобы выразить BOD в виде мг BOD/мг испытуемого вещества. Разложение определяется как отношение биохимической потребности в кислороде, либо, предпочтительно, к теоретической потребности в кислороде (ThOD), либо к химической потребности кислорода (COD) и выражается в процентах (см. 4.7.1.3).

4.7.1.3 Рассчитывают значение биоразложения испытуемого и стандартного вещества на каждое время отбора проб с помощью одной из формул:

$$\text{Процент биоразложения} = \frac{\text{Испытуемое вещество, мг } O_2 / \text{мг}}{\text{Испытуемое вещество, мг ThOD} / \text{мг}} \cdot 100, \quad (2)$$

$$\text{Процент биоразложения} = \frac{\text{Испытуемое вещество, мг } O_2 / \text{мг}}{\text{Испытуемое вещество, мг COD} / \text{мг}} \cdot 100, \quad (3)$$

где ThOD — теоретическая потребность в кислороде (расчет см. приложение В);

COD — химическая потребность в кислороде (определяется экспериментально).

Примечание — Иногда два способа расчета (процент ThOD или COD) не дают одинаковых результатов; в таких случаях предпочтительно использовать ThOD, поскольку некоторые химические вещества не полностью окисляются при определении COD.

4.7.1.4 Процесс разложения изображается графически в виде диаграммы (см. 4.7.3). Если имеется достаточное количество данных, то по кривой рассчитываются лаг-фаза ( $t_L$ ) и время достижения 50 % снижения в конце лаг-фазы ( $t_{50}$ ) по кривой биоразложения.

4.7.1.5 При использовании специфического анализа (необязательно) указывается процент первичного разложения в виде процента снижения концентрации определенного вещества в течение периода испытания (с поправкой на данные анализа в холостом опыте).

### 4.7.2 Отчет о проведении испытания

Отчет о проведении испытания должен содержать следующую информацию:

#### 4.7.2.1 Испытуемое вещество:

- физическая природа и в соответствующих случаях физико-химические свойства;
- химическая идентификация.

#### 4.7.2.2 Условия испытания:

- расположение и описание места отбора проб; загрязнение и уровень питательных веществ (количество колоний, уровень нитратов, аммония, фосфатов, при необходимости);

- характеристика проб (дата отбора проб, глубина, внешний вид, температура, соленость, DOC (необязательно), время между отбором и использованием проб в испытании);
- метод, использованный для «старения» морской воды (если проводится);
- метод, использованный для предварительной обработки (фильтрация/осаждение) морской воды;
- метод, использованный для определения COD (если проводится);
- метод, использованный для измерения уровня кислорода;
- метод диспергирования для слаборастворимых веществ в условиях проведения испытаний;
- метод, использованный для определения количества гетеротрофов в морской воде (определение количества микроорганизмов посевом или альтернативной процедурой);
- метод, использованный для определения DOC в морской воде (необязательно);
- метод, использованный для специфического анализа (необязательно);
- другие дополнительные методы, использованные для характеристики морской воды (измерение АТФ и т. д.).

#### 4.7.2.3 Результаты:

- представление аналитических данных в протоколе испытания (см. приложение Д);
- графическое представление процесса разложения в испытании на диаграмме, показывающей лаг-фазу ( $t_L$ ), наклон и время (начиная с конца лаг-фазы) достижения 50 % конечного захвата кислорода в результате окисления испытуемого вещества ( $t_{50}$ ). Лаг-фазу можно установить графически, как показано на рисунке в пункте «Достоверность и интерпретация результатов», или удобно принять как время, необходимое для 10 % разложения;
- процент разложения, измеренный через 28 сут.

#### 4.7.2.4 Обсуждение результатов

#### 4.7.3 Достоверность и интерпретация результатов

4.7.3.1 Уровень дыхания в холостом опыте не должен превышать 30 % кислорода в испытуемом сосуде. Если невозможно достичь соответствия данному критерию при использовании только отобранной морской водой, то морскую воду перед применением подвергают «старению» (стабилизации).

4.7.3.2 Следует учитывать возможность влияния на результаты азотсодержащих соединений.

4.7.3.3 Результаты, полученные со стандартными веществами, бензоатом натрия и анилином, должны быть сопоставимы с результатами, полученными в кольцевом методе [3] (см. 4.3.2). Если результаты, полученные со стандартными веществами, являются нетипичными, то испытание повторяют с использованием другой пробы морской воды.

4.7.3.4 Испытуемое вещество может ингибировать бактерии (в используемой концентрации), если BOD смеси стандартного и испытуемого вещества меньше суммы BOD отдельных растворов двух веществ.

4.7.3.5 За счет относительно высоких используемых испытуемых концентраций по сравнению с большинством природных систем и, следовательно, неудовлетворительного отношения между концентрациями испытуемого вещества и другими источниками углерода метод следует рассматривать в качестве предварительного испытания, используемого для установления того, является ли вещество легкобиоразлагаемым. Следовательно, низкий результат не обязательно означает, что испытуемое вещество не подвергается биоразложению в морской среде, а лишь указывает на необходимость проведения дополнительного испытания для установления этого факта.

Пример опыта по определению теоретического разложения, иллюстрирующего возможный способ установления значения  $t_L$  (продолжительность лаг-фазы) и  $t_{50}$  (временной интервал, начиная с  $t_L$ ), необходимого для достижения 50 % конечного потребления кислорода за счет окисления испытуемого вещества, приведен на рисунке 2.



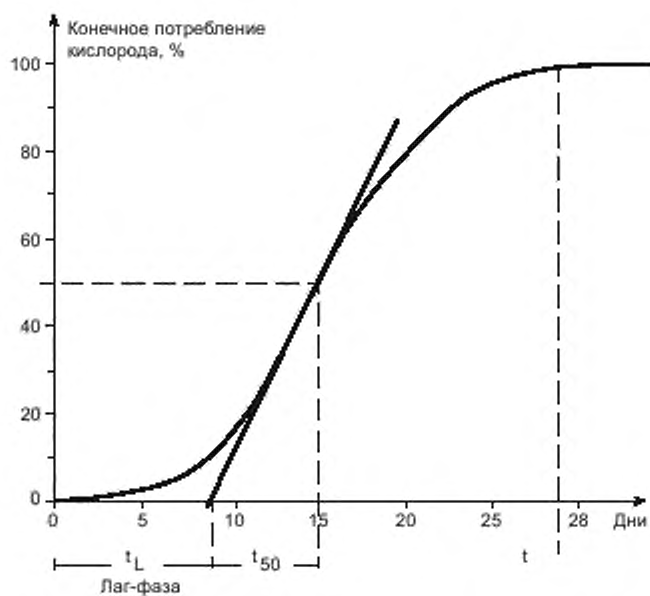


Рисунок 2 — Определение теоретического разложения, иллюстрирующего возможный способ установления значений  $t_L$  и  $t_{50}$ , необходимого для достижения 50 % конечного потребления кислорода за счет окисления испытуемого вещества

**Приложение А**  
**(рекомендуемое)**

**Определение органического углерода в морской воде.**  
**Метод со встряхиваемыми колбами**

Для определения органического углерода в пробе воды органические вещества в пробе окисляют до диоксида углерода с использованием, как правило, одного из следующих трех методов:

- влажное окисление под действием персульфата/УФ-облучения;
- влажное окисление под действием персульфата/повышенной температуры (116—130 °С);
- сжигание.

Выделенный  $\text{CO}_2$  определяют количественно, используя инфракрасную спектрометрию или титриметрию. Альтернативно  $\text{CO}_2$  восстанавливают до метана, который количественно определяют с использованием пламенно-ионизационного детектора (FID).

Метод с персульфатом/УФ обычно используется для анализа «чистой» воды с низким содержанием твердых частиц. Последние два метода могут применяться для большинства видов проб воды, метод окисления с персульфатом/повышенной температурой является наиболее подходящим для проб с низким уровнем, а методика сжигания применяется для проб с нелетучим органическим углеродом (NVOC) на уровне значительно выше 1 мг С/л.

**Помехи**

Все три метода зависят от элиминации или компенсации неорганического углерода (IC), присутствующего в пробе. Продувка  $\text{CO}_2$  из подкисленной пробы является наиболее часто используемым методом для элиминации IC, хотя это также приводит к потере летучих органических соединений [6]. Полную элиминацию или компенсацию IC обеспечивают для каждой пробы, а летучий органический углерод (VOC) определяют в дополнение к NVOC в зависимости от типа пробы.

Высокие концентрации хлоридов приводят к снижению эффективности окисления при использовании метода с персульфатом/УФ [7]. Однако применение окисляющего реактива, модифицированного добавлением нитрата ртути (II), может устранить помехи. Рекомендуется использовать максимально допустимый объем пробы для оценки каждого типа пробы, содержащей хлориды. Высокие концентрации солей в пробе, анализируемые с помощью метода сжигания, могут вызвать покрытие катализатора солями и высокую коррозию трубки сжигания. Должны быть приняты меры предосторожности в соответствии с инструкцией предприятия-изготовителя.

Пробы с высокой мутностью, а также пробы, содержащие твердые частицы, могут не полностью окисляться при использовании метода с персульфатом/УФ.

**Пример подходящего метода**

Нелетучий органический углерод определяется окислением персульфатом/УФ-облучением с последующим количественным анализом выделившегося  $\text{CO}_2$  с использованием недисперсионной инфракрасной спектрометрии.

Окисляющий реактив модифицируют в соответствии с указаниями, приведенными в [7], как описано в инструкции предприятия-изготовителя:

- а) 8,2 г  $\text{HgCl}_2$  и 9,6 г  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  растворяют в объеме нескольких сотен миллилитров лабораторной воды с низкой концентрацией углерода (воды ЧДА);
- б) 20 г  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  растворяют в растворе соли ртути;
- в) к смеси добавляют 5 мл  $\text{HNO}_3$  (концентрированная);
- г) реактив разводят до 1000 мл.

Помехи за счет присутствия хлоридов устраняют с использованием объема пробы, составляющего 40 мкл, при 10 % уровне хлоридов и объема пробы, равного 200 мкл, при 1,9 % уровне хлоридов. Пробы с высокой концентрацией хлоридов и/или пробы больших объемов анализируют данным методом при условии, что в сосуде, в котором проводится окисление, предупреждается накопление хлоридов. Затем проводят определение содержания летучего органического углерода, при необходимости, для конкретного типа проб.

**Приложение Б  
(рекомендуемое)**

**Биоразложение в морской воде.  
Метод со встряхиваемыми колбами. Протокол испытания**

1 Лаборатория:

2 Дата начала испытания:

3 Испытуемое вещество:

Наименование:

Концентрация стокового раствора:

мг химического вещества /л

Исходная концентрация в среде,  $t_0$ :

мг химического вещества /л

мг растворенного органического углерода в л (мг DOC/л)

4 Морская вода:

Источник:

Дата отбора проб:

Глубина отбора проб:

Внешний вид во время отбора проб (например, мутная и т. д.):

Соленость при отборе проб: %

Температура при отборе проб: °С

DOC «х» часов после отбора проб: мг/л

Предварительная обработка перед испытанием (например, фильтрация, осаждение, «старение» и т. д.):

Число колоний микроорганизмов:

– исходная проба: колонии/мл;

– в начале испытания: колонии/мл

Другие характеристики

5 Анализатор углерода

Испытание	Колба		DOC через л суток, мг/л				
			0	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_x$
Испытание: обогащенная питательными веществами морская вода с испытуемым веществом	1	$a_1$					
		$a_2$					
		Среднее значение, $C_{a(t)}$					
	2	$b_1$					
		$b_2$					
		Среднее значение, $C_{b(t)}$					
Холостой опыт: обогащенная питательными веществами морская вода без испытуемого вещества	1	$c_1$					
		$c_2$					
		Среднее значение, $C_{c(t)}$					
	2	$d_1$					
		$d_2$					
		Среднее значение, $C_{d(t)}$					
	Среднее значение,						
	$C_{хол.т} = \frac{C_{c(t)} - C_{d(t)}}{2}$						

## 6 Оценка первичных данных

Колба	Расчет результатов	Разложение через <i>n</i> суток, %				
		0	<i>n</i> <sub>1</sub>	<i>n</i> <sub>2</sub>	<i>n</i> <sub>3</sub>	<i>n</i> <sub>х</sub>
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{B(t)} - C_{\text{авт}(t)}}{C_0 - C_{\text{авт}(0)}} \cdot 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{B(t)} - C_{\text{авт}(t)}}{C_0 - C_{\text{авт}(0)}} \cdot 100$	0				
Среднее значение*	$D_s = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

\*  $D_1$  и  $D_2$  не следует усреднять, если имеется значительная разница.

Примечание — Могут быть использованы аналогичные форматы, если разложение определяется специфическим анализом, а также для контролей, включающих стандартное вещество и контроль на токсичность.

## 7 Абиотическое разложение (необязательно)

РОУ	Время, сут.	
	0	<i>t</i>
Концентрация растворенного органического углерода (DOC конц.) в стерильном контроле, мг/л	$C_{S(0)}$	$C_{S(t)}$

$$\text{Процент абиотического разложения} = \frac{C_{S(0)} - C_{S(t)}}{C_{S(0)}} \cdot 100.$$

**Приложение В**  
**(рекомендуемое)**

**Определение теоретической биохимической потребности в кислороде.**  
**Метод с закрытыми сосудами**

ThOD вещества  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$  с молекулярной массой MW рассчитывается по формуле:

$$ThOD_{\text{мг}_2} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h-cl-3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW} \quad (\text{B.1})$$

При использовании такого расчета предполагается, что С минерализуется до  $CO_2$ , Н до  $H_2O$ , Р до  $P_2O_5$  и Na до  $Na_2O$ . Галоген удаляется в виде гидрогалогенида, а азот — в виде аммиака.

**Примеры**

**1 Глюкоза  $C_6H_{12}O_6$ , MW (MB) = 180**

$$ThOD = \frac{16 \left( 2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ мг } O_2 / \text{ мг глюкозы.} \quad (\text{B.2})$$

*Молекулярные массы солей, иных чем соли щелочных металлов, вычисляются с допущением того, что эти соли подверглись гидролизу.*

*Полагается, что сера окисляется до валентного состояния +6.*

**2 Натрий n-додецилбензолсульфонат  $C_{18}H_{29}SO_3Na$ , MW (MB) = 348**

$$ThOD = \frac{16 \left( 36 - \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} \cdot 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ мг } O_2 / \text{ мг вещества.} \quad (\text{B.3})$$

В случае азотсодержащих веществ азот может элиминироваться в виде аммиака, нитрита или нитрата, соответствующих различным теоретическим биохимическим потребностям в кислороде:

$$ThOD_{\text{н}_2\text{O}_2} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h-cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW}; \quad (\text{B.4})$$

$$ThOD_{\text{н}_2\text{O}_3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h-cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW} \quad (\text{B.5})$$

Предполагается, что полное образование нитрата наблюдали при постановке анализа в случае вторичного амина  $(C_{12}H_{25})_2NH$ , MW (MB) = 353:

$$ThOD_{\text{н}_2\text{O}_3} = \frac{16 \left( 48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ мг } O_2 / \text{ мг субстанции.} \quad (\text{B.6})$$

Приложение Г  
(рекомендуемое)

**Номограмма зависимости насыщенной концентрации растворенного кислорода  
от солёности и температуры**

На рисунке Г.1 приведена номограмма, показывающая концентрацию насыщения кислородом при различных температурах и солёности.

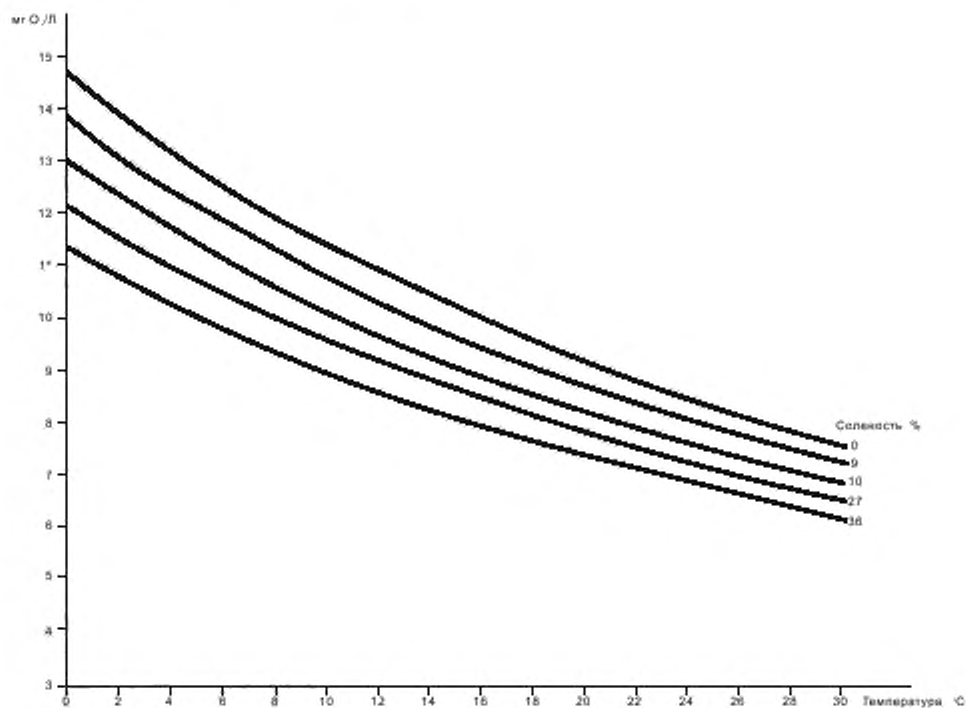


Рисунок Г.1 — Номограмма зависимости насыщенной концентрации растворенного кислорода от солёности и температуры

**Приложение Д  
(рекомендуемое)**

**Биоразложение в морской воде. Метод с закрытыми сосудами.  
Протокол испытания**

- 1 Лаборатория:  
 2 Дата начала испытания:  
 3 Испытуемое вещество:  
 Наименование:  
 Концентрация стокового раствора: мг/л  
 Исходная конц. в среде морской воды: мг/л  
 ThOD или COD: мг O<sub>2</sub>/мг испытуемого вещества  
 4 Морская вода:  
 Источник:  
 Дата отбора проб:  
 Глубина отбора проб:  
 Внешний вид во время отбора проб (например, мутная и т. д.):  
 Соленость при отборе проб: %  
 Температура при отборе проб: °C  
 DOC «х» часов после отбора проб: мг/л  
 Предварительная обработка перед испытанием (например, фильтрация, осаждение, «старение и т. д.):  
 Число колоний микроорганизмов:  
 - исходная проба: колонии/мл  
 - в начале испытания: колонии/мл  
 Другие характеристики:  
 5 Испытуемая среда:  
 Температура после азрации: °C  
 Концентрация O<sub>2</sub> после азрации  
 и отстаивания перед началом испытания: мг O<sub>2</sub>/л  
 6 Определение DO  
 Метод: Винклер/электродный

Вариант испытания	Колба	Показатель	мг O <sub>2</sub> /л через л сут.			
			0	5	15	28
Испытание: обогащенная питательными веществами морская вода с испытуемым веществом	1	a <sub>1</sub>				
	2	a <sub>2</sub>				
	Среднее значение в холостом опыте	$m_1 = \frac{a_1 + a_2}{2}$				
Холостой опыт: обогащенная питательными веществами морская вода, но без испытуемого вещества	1	c <sub>1</sub>				
	2	c <sub>2</sub>				
	Среднее значение в испытании	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Примечание — Может быть использован аналогичный формат для контроля, включающего стандартное вещество и испытание на токсичность.

## 7 Снижение DO: Процент деградации (процент D)

Показатель	Снижение DO через n сут		
	5	15	28
$(m_b - m_t)^1$			
Процент D = $\frac{(m_n - m_t)^1}{\text{Испытуемое вещество (мг / л) - ThOD}} \cdot 100$			

<sup>1</sup> Это предполагает, что  $m_{b(0)} = m_{t(0)}$ .

где  $m_{b(0)}$  — значение в холостом опыте на 0 сут.,

$m_{t(0)}$  — значение для испытуемого вещества на 0 сут.

Если  $m_{b(0)}$  не равно  $m_{t(0)}$ , то используется  $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{хол(0)} - m_{хол(x)})$ .

где  $m_{хол(x)}$  — значение в холостом опыте на x сут.,

$m_{t(0)}$  — значение для испытуемого вещества на x сут.



**Приложение ДА  
(справочное)**

**Сравнение структуры международного документа со структурой настоящего стандарта**

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
	Введение		1, 2, 3, 4, 5	—
1	1.1	—	—	—
	1.2	—	6	—
	1.3	—	7	—
2	—	—	8	—
3	3.1	—	3	—
	3.2	—	—	—
	3.2.1	—	4	—
	3.2.2	—	5	—
	3.3	—	—	—
	3.3.1	—	6	—
	3.3.2	—	7	—
	3.4	—	8	—
	3.5	—	—	—
	3.5.1	—	9	—
	3.5.2	—	—	—
	3.5.2.1	—	10	—
	3.5.2.2	—	11	—
	3.5.2.3	—	12	—
	3.5.3	—	13	—
	3.5.4	—	14	—
	3.5.5	—	15	—
	3.5.6	—	—	—
	3.5.6.1	—	16	—
	3.5.6.2	—	17	—
	3.5.6.3	—	18	—
	3.5.6.4	—	19	—
	3.5.7	—	20	—
	3.5.8	—	21	—
	3.5.9	—	22	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
3	3.5.10	—	—	—
	3.5.10.1	—	23	—
	3.5.10.2	—	24	—
	3.5.10.3	—	25	—
	3.5.10.4	—	26	—
	3.5.11	—	—	—
	3.5.11.1	—	27	—
	3.5.11.2	—	28	—
	3.5.11.3	—	29	—
	3.6	—	—	—
	3.6.1	—	—	—
	3.6.1.1	—	30	—
	3.6.1.2	—	31	—
	3.6.1.3	—	32	—
	3.6.2	—	33	—
	3.6.2.1	—	33	—
	3.6.2.2	—	33	—
	3.6.2.3	—	33	—
	3.6.2.4	—	33	—
	3.6.3	—	—	—
	3.6.3.1	—	34	—
3.6.3.2	—	35	—	
4	4.1	—	—	—
	4.1.1	—	3	—
	4.1.2	—	4	—
	4.2	—	—	—
	4.2.1	—	5	—
	4.2.2	—	6	—
	4.2.3	—	7	—
	4.3	—	—	—
	4.3.1	—	8	—
	4.3.2	—	9	—
	4.4	—	10	—
	4.5	—	—	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа		
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления	
4	4.5.1	—	11	—	
	4.5.2	—	—	—	
	4.5.2.1	—	12	—	
	4.5.2.2	—	13	—	
	4.5.2.3	—	14	—	
	4.5.2.4	—	15	—	
	4.5.2.5	—	16	—	
	4.5.2.6	—	17	—	
	4.5.3		а	18	а
			б		б
			в		с
			г		д
	4.5.4	—	19	—	
	4.5.5	—	20	—	
	4.5.6	—	—	—	
	4.5.6.1	—	21	—	
	4.5.6.2	—	22	—	
	4.5.6.3	—	23	—	
	4.5.6.4		а	24	а
			б		б
			в		с
	4.5.6.5	—	25	—	
	4.5.6.6	—	26	—	
	4.5.6.7		а	27	а
			б		б
			в		с
	4.5.7	—	28	—	
	4.5.8	—	29	—	
	4.6	—	—	—	
	4.6.1	—	30	—	
	4.6.2	—	31	—	
	4.6.3	—	32	—	
	4.6.4	—	33	—	
4.7	—	—	—		

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
4	4.7.1	—	—	—
	4.7.1.1	—	34	—
	4.7.1.2	—	35	—
	4.7.1.3	—	36	—
	4.7.1.4	—	37	—
	4.7.1.5	—	38	—
	4.7.2	—	39	—
	4.7.2.1	—	39	—
	4.7.2.2	—	39	—
	4.7.2.3	—	39	—
	4.7.2.4	—	39	—
	4.7.3	—	—	—
	4.7.3.1	—	40	—
	4.7.3.2	—	41	—
	4.7.3.3	—	42	—
	4.7.3.4	—	43	—
	4.7.3.5	—	44	—
Приложение А			Приложение 1	
Приложение Б			Приложение 2	
Приложение В			Приложение 3	
Приложение Г			Приложение 4	
Приложение Д			Приложение 5	
Библиография			Литература	

## Библиография

- [1] de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6): 561—573
- [2] OECD, Paris (1992). Test Guideline 301 E
- [3] Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984—1985, March 1987, Commission of the European Communities
- [4] OECD, Paris (1992). Test Guideline 301 D
- [5] OECD, Paris (1984). Test Guideline 209
- [6] ISO. Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard. ISO/DIS 8245, January 16, 1986
- [7] American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985
- [8] Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. *Hydrobiological Bulletin* 12, 137—142



*Редактор Е.В. Силитрина*  
*Технический редактор В.Н. Прусакова*  
*Корректор Е.Р. Ароян*  
*Компьютерная верстка И.В. Белоусенко*

Сдано в набор 09.11.2015. Подписано в печать 25.02.2016. Формат 60 × 84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 2,90. Тираж 32 экз. Зак. 564

---

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