МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
32433—
2013**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Оценка биоразлагаемости органических соединений методом определения диоксида углерода в закрытом сосуде

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 ноября 2013 г. № 61-П)

За принятие 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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 809-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32433—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test № 310:2006 «Способность к биоразложению. Определение CO_2 в закрытых сосудах (в свободном пространстве)» [«Ready Biodegradability — CO_2 in sealed vessels (Headspace Test)», IDT].

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

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

Введение

Общепризнанный метод [1], основанный на оригинальном тесте Штурма [2] для оценки биологического разложения органических химических веществ путем измерения образования углекислого газа под воздействием микроорганизмов, обычно использовался в качестве основного метода для тестирования плохо растворимых и сильно адсорбирующихся химических веществ. Он также применялся для тестирования растворимых (но не летучих) химических веществ, так как выделение углекислого газа, по мнению многих специалистов, является единственным однозначным доказательством деятельности микроорганизмов. На удаление растворенного органического углерода могут влиять различные физико-химические процессы: адсорбция, испарение, осаждение, гидролиз, а также воздействие микроорганизмов и многие небиологические реакции, в которых происходит потребление кислорода; в редких случаях CO_2 образуется вследствие абиотического разложения органических химических веществ. В оригинальном и модифицированном тесте Штурма [1], [2] CO_2 удаляется из жидкой фазы в поглощающие сосуды за счет барботирования (т. е. восходящий воздух пропускают через жидкую среду для удаления CO_2), а в варианте Ларсона [3], [4] CO_2 переносится из реакционного сосуда в поглотители за счет пропускания воздуха, не содержащего CO_2, через свободное пространство сосуда, а также его непрерывного встряхивания.

При применении стандартного модифицированного теста Штурма для ряда химических веществ, неорганический углерод (НУ) накапливается в среде [9]. Концентрация НУ выше, чем 8 мг/л была обнаружена в ходе тестирования анилина в концентрации 20 мг С/л. Таким образом, сбор CO_2 в щелочные ловушки не давал истинного представления о количестве CO_2, образованного в результате деятельности микроорганизмов в промежуточные интервалы в течение процесса разложения. В результате, предел более 60 % от теоретического максимума образования CO_2 ($ThCO_2$), который должен быть получен в течение «десятидневного интервала» (10 дней с момента достижения 10 % биоразложения) для классификации исследуемого вещества, как легко биоразлагаемого, не может выполняться для некоторых веществ, классифицируемых таким образом при использовании метода удаления растворенного органического углерода (РОУ).

Если процент разложения меньше, чем ожидается, неорганический углерод, возможно, накапливается в исследуемом растворе.

Другие недостатки методологии Штурма (громоздкость, трудоемкость, большая предрасположенность к погрешности и неприменимость для летучих веществ) ранее привели к необходимости поиска техник с использованием закрытых сосудов, за исключением метода Гледхилла, в основном газовых проточных методов [10], [11]. Количество CO_2 измерялось с помощью газовой хроматографии/анализатора неорганического углерода в автоматически отбираемых пробах газовой фазы, но растворенный неорганический углерод (РНУ) в жидкой фазе не принимался во внимание. Кроме того, в тесте использовались очень маленькие сосуды (20 мл), содержащие только 10 мл среды, что вызывало проблемы, например, при необходимости добавления очень малых количеств нерастворимых веществ, и/или вследствие отсутствия или недостаточного количества микроорганизмов в инокуляте для приемлемого разложения исследуемого вещества.

В первом методе [13] CO_2 измеряется в свободном пространстве после подкисления и установления равновесия, а во втором [14] содержание РНУ было измерено в газовой и жидкой фазе, без обработки; более 90 % образовавшегося НУ присутствовало в жидкой фазе. Оба метода имели преимущества по сравнению с тестом Штурма за счет более компактной и управляемой тестовой системы, возможности исследовать летучие химические вещества и отсутствия задержки, при измерении образовавшегося CO_2.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Оценка биоразлагаемости органических соединений методом определения диоксида углерода в закрытом сосуде

Testing of chemicals of environmental hazard. Ready biodegradability — CO_2 in sealed vessels

Дата введения —2014—08—01

1 Область применения

В настоящем стандарте представлен метод для оценки способности химических веществ к биоразложению. Химические вещества, которые в данном испытании показывают положительные результаты, могут рассматриваться как поддающиеся биологическому разложению и, следовательно, быстрому разложению в окружающей среде.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

2.1 **НУ (IC):** Неорганический углерод.

2.2 **теоретическое выделение углекислого газа;** TCO_2 (theoretical carbon dioxide (mg)); ($ThCO_2$): Количество углекислого газа (мг), вычисленное, исходя из известного или измеренного содержания углерода в исследуемом веществе, образующееся при его полной минерализации; также выражается как количество углекислого газа в мг, образующегося на мг исследуемого вещества.

2.3 **растворенный органический углерод;** РОУ (dissolved organic carbon); (DOC): Количество органического углерода, присутствующего в растворе после фильтрования через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм или после центрифугирования с ускорением порядка 4000 g (40 000 м/с^2) в течение 15 минут.

2.4 **ННУ** (DIC): Нерастворенный неорганический углерод.

2.5 **ТНУ** (ThIC): Теоретический неорганический углерод.

2.6 **ОНУ** (TIC): Общий неорганический углерод.

2.7 **легко разлагаемое вещество** (readily biodegradable): Произвольная классификация химических веществ, прошедших определенные испытания на окончательное биоразложение; испытания проводятся в строгих условиях, что позволяет предположить, что данные химические вещества будут подвергаться быстрому и полному биоразложению в водной среде в аэробных условиях.

2.8 **десятидневный интервал** (10-d window): 10 дней с момента достижения 10 %-ного биоразложения.

2.9 **биоразлагаемое вещество** (inherent biodegradability): Классификация химических веществ, для которых существуют определенные доказательства способности к биоразложению (основному или окончательному) в любом испытании на способность к биологическому разложению.

2.10 **полная биоразлагаемость (аэробная)** (ultimate aerobic Biodegradation): Уровень разложения, достигаемый при полном использовании микроорганизмами химического вещества, приводящим к образованию углекислого газа, воды, минеральных солей и новых микробиологических клеточных элементов (прирост биомассы).

2.11 **минерализация** (mineralisation): Полное разложение органического соединения до углекислого газа (CO_2) и воды (H_2O) в аэробных условиях, метана (CH_4), углекислого газа (CO_2) и воды (H_2O) в анаэробных условиях.

Издание официальное

2.12 **лаг-фаза** (lag phase): Период от начала испытания до акклиматизации и/или адаптации микроорганизмов и возрастания степени биоразложения химического вещества или органического материала до определяемого уровня (например, 10 % от максимального теоретического биоразложения или меньше, в зависимости от точности методики измерения).

2.13 **фаза разложения** (degradation phase): Время от окончания периода лаг-фазы до времени, когда разложение достигает 90 % от максимально возможного уровня.

2.14 **плато-фаза** (plateau phase): Фаза, в которой достигается максимальное разложение и кривая биоразложения выравнивается.

3 Основные положения

3.1 Принцип метода

3.1.1 Исследуемое вещество, как правило, в концентрации 20 мг · С/л в качестве единственного источника углерода и энергии, инкубируют в буферной минеральной среде, которая была инокулирована смешанной популяцией микроорганизмов. Испытания проводят в закупоренных бутылках со свободным пространством для воздуха, которое обеспечивает запас кислорода для аэробного биоразложения. Количество CO_2, полученное в результате полного аэробного биоразложения исследуемого вещества, определяется путем измерения неорганического углерода, образованного в тестовом сосуде сверх того, что было получено в пустых контрольных сосудах, содержащих только инокулированную среду. Степень биоразложения выражается в виде процента от теоретического максимума образования неорганического углерода (ТНУ), исходя из количества исследуемого вещества (в расчете на органический углерод), добавленного первоначально.

3.1.2 Также могут быть измерены удаление РОУ и/или степень основного биоразложения исследуемого вещества [20].

3.2 Информация об исследуемом веществе

Для вычисления процента биоразложения должно быть известно содержание органического углерода (масс. процент) в исследуемом веществе, измеренное или рассчитанное из его химической структуры. В случае летучих исследуемых веществ, для определения подходящего соотношения свободного пространства и объема жидкости, необходимо измерить или рассчитать константу Генри. Информация о токсичности исследуемого вещества для микроорганизмов полезна при выборе соответствующей тестовой концентрации и для интерпретации результатов, свидетельствующих о незначительном биологическом разложении: рекомендуется также проводить контроль ингибирования, если не известно, что исследуемое вещество не подавляет деятельность микроорганизмов (см. 4.10).

3.3 Применимость метода

Метод применим для растворимых в воде и нерастворимых веществ, для которых в свою очередь должна обеспечиваться хорошая дисперсия вещества. Рекомендуется использовать соотношение свободного пространства к объему жидкости, равное 1:2, летучие вещества с константой Генри до 50 Па $м^3 \cdot моль^{-1}$ могут тестироваться, если содержание вещества в свободном пространстве сосуда не будет превышать 1 % [13]. Меньший объем свободного пространства может использоваться при тестировании веществ, которые являются более летучими, но их биодоступность может быть ограничена, особенно если они плохо растворимы в воде. Исполнители должны убедиться, что соотношение свободного пространства и объема жидкости, и концентрация исследуемого вещества таковы, что для полного аэробного биоразложения доступно достаточное количество кислорода (например, избегать использования высоких концентраций субстрата и малых объемов свободного пространства).

3.4 Референтное (стандартное) вещество

Для проверки тестовых процедур параллельно должно быть протестировано стандартное вещество с известной биоразлагаемостью. Для этой цели при тестировании растворимых в воде исследуемых веществ могут использоваться анилин, бензоат натрия или этиленгликоль и при тестировании плохо растворимых веществ —1-октанол [13]. Биоразложение данных веществ должно достигать более 60 % от ТНУ в течение 14 дней.

3.5 Воспроизводимость

3.5.1 При рекомендуемых условиях, в том числе при концентрации 20 мг · С/л, были получены следующие результаты:

Таблица 1 — Показатели воспроизводимости при концентрации 20 мг · С/л

Исследуемое вещество	Среднее биоразложение, %, 28 дней	Коэффициент вариации, %	Количество лабораторий
Анилин	90	16	17
1-октанол	85	12	14

3.5.2 Межлабораторная изменчивость (воспроизводимость) для анилина была низкой с коэффициентами вариации не более 5 % почти для всех выполнений теста. В двух случаях, в которых воспроизводимость была хуже, большая изменчивость наблюдалась, вероятно, из-за высокого образования НУ в контрольных пробах. Воспроизводимость была хуже для 1-октанола, но также менее 10 % для 79 % выполнений теста. Такая большая межлабораторная изменчивость может быть связана с ошибками при дозировании, поскольку в закупоренные сосуды необходимо было добавлять малые объемы (от 3 до 4 мкл) 1-октанола. Бóльшие коэффициенты вариации получают, когда используются низкие концентрации исследуемого вещества, особенно при концентрациях ниже 10 мг · С/л. Это может быть частично решено за счет снижения концентрации общего неорганического углерода (ОНУ) в инокуляте.

3.5.3 В межлабораторном тесте ЕС с пятью поверхностно-активными веществами в концентрации 10 мг · С/л были получены следующие результаты:

Таблица 2 — Показатели воспроизводимости при концентрации 10 мг · С/л

Исследуемое вещество	Среднее биоразложение, %, 28 дней	Коэффициент вариации, %	Количество лабораторий
Тетрапропиленбензол-сульфонат	17	45	10
Диизооктилсульфо-сукцинат (анионный)	72	22	9
Гексадецилтриметил-аммоний хлорида (катионный)	75	13	10
Изононилфенол $(этоксилат)_9$ (неионный)	41	32	10
Кокоамидпропилдиметил гидроксисульфобетаин (амфотерный)	60	23	11

Результаты показывают, что, как правило, изменчивость была выше для менее склонных к разложению ПАВ. Внутритестовая изменчивость была менее 15 % для более, чем 90 % случаев, самая высокая изменчивость достигала от 30 % до 40 %.

Примечание — Большинство поверхностно-активных веществ представляют собой смесь изомеров, гомологов и пр., которые разлагаются после различных лаг-фаз и с разными кинетическими скоростями, в результате получаются «размытые» сглаженные кривые так, что проходное значение 60 % может не достигаться в течение 10-дневного интервала, хотя для каждого отдельного вида молекул в индивидуальном испытании, биоразложение достигнет > 60 % в течение 10 дней. Подобное может также наблюдаться и для других сложных смесей.

4 Описание метода

4.1 Оборудование

В тесте используется стандартное лабораторное оборудование, а также:

- стеклянные бутылки, с пробками из бутилкаучука и алюминиевыми обжимными устройствами. Рекомендуемый полезный объем — 125 мл, общий объем — около 160 мл [в этом случае объем каждой бутылки должен быть (160 ± 1) мл]. Меньший размер бутылки может использоваться, когда результаты удовлетворяют условиям, описанным в 7.5, 7.6;

- анализатор углерода или другое оборудование (например, газовый хроматограф) для измерения неорганического углерода;

- шприцы высокой точности для подготовки газообразных и жидких проб;
- орбитальный шейкер с контролируемой температурой среды;
- оборудование для поставки воздушной смеси, очищенной от CO_2. Смесь может быть подготовлена путем пропускания воздуха через гранулы натронной извести или может использоваться газовая смесь 80 % N_2/20 % O_2 (по выбору) (см. 4.12);
- устройство для мембранной фильтрации, размер пор от 0,20 до 0,45 мкм (по выбору);
- анализатор органического углерода (по выбору).

4.2 Реагенты

Используются реагенты аналитической чистоты.

4.3 Вода

Используется дистиллированная или деионизированная вода с содержанием общего органического углерода менее или равной 1 мг/л, что должно составлять более или равной 5 % от первоначального содержания органического углерода, введенного в тесовый сосуд с рекомендованной дозой исследуемого вещества.

4.4 Основные растворы для приготовления минеральных сред

Основные растворы и минеральные среды аналогичны растворам и средам, используемым в [16] и [20].

Использование высокой концентрации хлорида аммония (2,0 г/л вместо 0,5 г/л) необходимо только в самых исключительных случаях, например, когда концентрация исследуемого вещества более 40 мг · С/л. Основные растворы следует хранить в холодильнике и утилизировать по истечении шести месяцев или ранее, если наблюдаются признаки образования осадка или микробного роста. Готовят следующие основные растворы:

1) Калия дигидрофосфат (KH_2PO_4) — 8,50 г;

Дикалия гидрофосфат (K_2HPO_4) — 21,75 г;

Динатрия гидрофосфат дигидрат ($Na_2HPO_4 \cdot 0{,}2H_2O$) — 33,40 г;

Хлорид аммония (NH_4Cl) — 0,5 г.

Растворяют в воде и доводят до 1 л. pH данного раствора должен составлять (7,4 ± 0,2). Если это не так, готовят новый раствор.

2) Кальция хлорид дигидрат ($CaCl_2 \cdot 0{,}2H_2O$) — 36,40 г.

Растворяют в воде и доводят до 1 литра.

3) Магния сульфат гептагидрат ($MgSO_4 \cdot 0{,}7H_2O$) — 22,50 г.

Растворяют в воде и доводят до 1 литра.

4) Железа (III) хлорид гексагидрат ($FeCl_3 \cdot 0{,}6H_2O$) — 0,25 г.

Растворяют в воде, доводят до 1 литра и добавляют одну каплю концентрированного раствора.

4.5 Подготовка минеральной среды

Смешивают 10 мл раствора [1] с приблизительно 800 мл воды (см. 3.3), затем добавляют 1 мл растворов [2], [3] и [4] и доводят водой до 1 литра (см. 3.3).

4.6 Прочие реагенты

Концентрированная ортофосфорная кислота (H_3PO_4) (более 85 % массы к объему).

4.7 7М раствор гидроксида натрия

Растворяют 280 г гидроксида натрия (NaOH) в 1 литре воды (см. 3.3). Определяют концентрацию растворенного неорганического углерода в данном растворе и используют данное значение при расчете результатов испытания (см. 5.7 и 6.3), особенно с учетом критериев достоверности (см. 6.5). Если концентрация растворенного неорганического углерода слишком высока, готовят свежий раствор.

4.8 Исследуемое вещество

Готовят основной раствор исследуемого вещества в воде (см. 3.3) или в тестовой среде (см. 3.5) в концентрации предпочтительно в 100 раз больше, чем окончательная концентрация, используемая в

испытании; может быть необходимо отрегулировать pH основного раствора. Основной раствор необходимо добавить к минеральной среде для получения окончательной концентрации органического углерода от 2 и 40 мг · С/л, предпочтительно 20 мг · С/л. Если получаются концентрации ниже указанных, то, возможно, была нарушена точность. Растворимые и нерастворимые жидкие вещества могут быть добавлены непосредственно в тестовые сосуды с помощью шприцев высокой точности. Для плохо растворимых и нерастворимых веществ может потребоваться специальная подготовка [25].

Примеры

1 Прямое добавление навесок известной массы.

2 Предварительное ультразвуковое диспергирование.

3 Диспергирование с помощью эмульгаторов, предварительно необходимо установить, могут ли эмульгаторы оказывать ингибирующее или стимулирующее воздействие на активность микроорганизмов.

4 Адсорбция жидких исследуемых веществ или растворение в подходящем летучем растворителе, на инертных средах или носителях (например, фильтре из стекловолокна), с последующим испарением растворителя, при использовании, и прямом добавлении известных количеств вещества.

5 Добавление известного объема раствора исследуемого вещества в легко летучем растворителе в пустой тестовый сосуд, с последующим испарением растворителя.

Материалы или растворители, используемые в примерах 3, 4 и 5, должны быть исследованы на любое ингибирующее или стимулирующее воздействие на активность микроорганизмов (см. 5.3).

4.9 Референтное (стандартное) вещество

Готовят основной раствор (растворимого) стандартного вещества в воде (см. 3.3) в концентрации предпочтительно в 100 раз больше, чем окончательная концентрация, которая будет использоваться (20 мг С/л) в испытании.

4.10 Проверка на ингибирование

Исследуемые вещества часто не демонстрируют значительного разложения в условиях испытания на биоразложение. Одной из возможных причин является то, что исследуемое вещество может быть ингибитором инокулята в концентрации, используемой в испытании. Проверка на ингибирование может быть включена в структуру испытания для облегчения идентификации (в ретроспективе) ингибирования, как возможной причины или способствующего фактора низкого биоразложения. В альтернативном случае проверка на ингибирование может исключить подобное влияние и продемонстрировать, что нулевое или незначительное ухудшение объясняется исключительно неподатливостью исследуемого вещества к микробиологическому воздействию в условиях испытания. Для получения информации о токсичности исследуемого вещества для (аэробных) микроорганизмов готовят раствор в тестовой среде, содержащей исследуемое вещество и стандартное вещество (см. 3.5), каждое в добавленной тестовой концентрации соответственно (см. 4.8 и 4.9).

4.11 Прививочный материал (инокулят)

4.11.1 Инокулят может быть получен из различных источников: активный ил; сточные воды (нехлорированные); поверхностные воды и почвы; или из смеси данных источников [20]. Биологическая активность источника должна быть проверена с помощью стандартного вещества. Независимо от источника, микроорганизмы, ранее подвергавшиеся воздействию исследуемого вещества, не должны использоваться, если процедура будет использоваться в качестве теста на биоразлагаемость.

Примечание — Активный ил и сточные воды, содержащие патогенные микроорганизмы, необходимо использовать с осторожностью.

4.11.2 Исходя из имеющегося опыта, оптимальный объем инокулята должен:

- быть достаточным для обеспечения необходимой деятельности микроорганизмов;
- обеспечивать разложение стандартного вещества до установленного уровня (см. 6.5);
- образовывать от 102 до 105 колониеобразующих единиц на миллилитр в конечной смеси;
- давать концентрацию 4 мг/л взвешенных веществ в конечной смеси при использовании активного ила; концентрации до 30 мг/л также могут использоваться, но это может значительно увеличить выделение CO_2 в контрольных пробах;
- составлять менее 10 % от исходной концентрации органического углерода, вносимого с исследуемым веществом;
- составлять от 1 до 10 мл инокулята на 1 л. исследуемого раствора.

4.12 Активный ил

4.12.1 Свежий активный ил отбирается из аэротенка станции очистки сточных вод или лабораторной установки, перерабатывающей преимущественно бытовые сточные воды. При необходимости, крупные частицы можно удалить путем просеивания (например, используя 1 мм^2 сито), до использования ил содержат в аэробных условиях.

4.12.2 Кроме того, после удаления крупных частиц ил отстаивают или центрифугируют (например, 1100 g (11000 м/с^2) в течение 10 минут). Удаляют поверхностную жидкость. Ил можно промыть в минеральном растворе. Концентрированный ил суспендируют в минеральной среде до концентрации от 3 до 5 г взвешенных твердых частиц/л. Затем проводят аэрацию в течение необходимого времени.

4.12.3 Образец ила необходимо отбирать на станции очистки сточных вод, работающей в стандартном режиме. Если ил отбирают на станции интенсивной очистки, или он может содержать ингибиторы, его необходимо промыть. После тщательного перемешивания ресуспендированный ил осаждают или центрифугируют, поверхностную жидкость удаляют и повторно суспендируют промытый ил в минеральной среде. Данную процедуру повторяют, пока ил не будет полностью очищен от избытка субстрата или ингибитора.

4.12.4 После того, как достигается полное ресуспендирование, или из необработанного ила, непосредственно перед использованием отбирают образец для определения сухого веса взвешенных веществ.

4.12.5 В дальнейшем активный ил гомогенизируют (от 3 до 5 г взвешенных твердых частиц/л). Ил обрабатывают в блендере в течение 2 минут на средней скорости. Ил, обработанный в блендере, осаждают в течение 30 минут или дольше, при необходимости, и сливают жидкость для использования в качестве посевного материала в количестве около 10 мг/л минеральной среды.

4.12.6 Дальнейшее снижение образования CO_2 в пустых контрольных пробах может быть достигнуто путем аэрации ила в течение ночи воздухом, не содержащим CO_2. В качестве концентрации посевного материала для данного испытания используют 4 мг/л твердых частиц активного ила [13].

4.13 Вторичные сточные воды

4.13.1 В альтернативном случае инокулят может быть получен из вторичных отстойников очистных сооружений или лабораторной установки, перерабатывающей преимущественно бытовые сточные воды. Образец содержат в аэробных условиях и используют непосредственно в день отбора или, при необходимости, проводят предварительную подготовку. Необходимо пропустить образец через фильтр грубой очистки для удаления взвешенных частиц и затем измерить pH.

4.13.2 Для снижения содержания неорганического углерода, фильтрат барботируют воздухом, не содержащим CO_2 (см. 4.1), в течение 1 ч с использованием ортофосфорной кислоты для поддержания pH на уровне 6,5 (см. 4.6). pH приводят к первоначальному значению гидроксидом натрия (см. 4.7), и после отстаивания в течение приблизительно 1 ч подходящий объем поверхностной жидкости отбирается для инокуляции. Данная процедура барботирования снижает содержание неорганического углерода в инокуляте. Например, когда максимальный рекомендуемый объем отфильтрованного обработанного образца (100 мл) на литр использовался в качестве посевного материала, количество НУ, присутствующего в контрольных сосудах, находилось в диапазоне от 0,4 до 1,3 мг/л [14], что соответствует от 2 % до 6,5 % С исследуемого вещества при 20 мг · С/л и от 4 % до 13 % — при 10 мг · С/л.

4.14 Поверхностные воды

Образец отбирают из соответствующих поверхностных вод. Образец следует содержать в аэробных условиях и использовать в день отбора. При необходимости, образец можно сконцентрировать путем фильтрации или центрифугирования. Объем инокулята, используемый для каждого тестового сосуда, должен соответствовать критериям, приведенным в 4.12.

4.15 Почва

Образец почвы отбирают из соответствующих почв, собранных на глубине до 20 см ниже уровня поверхности. Перед просеиванием через 2 мм сито необходимо удалить из образца камни, остатки растений и беспозвоночных (если образец слишком влажный для просеивания, его частично сушат на воздухе). Образец следует содержать в аэробных условиях и использовать в день отбора (если образец перевозится в неплотно закрытом черном полиэтиленовом пакете, его можно хранить при температуре от 2 °С до 4 °С в пакете в течение не более одного месяца).

4.16 Предварительная подготовка посевной культуры (инокулята)

Посевная культура может быть предварительно подготовлена к условиям испытания, но не адаптирована к исследуемому веществу. Предварительная подготовка позволяет снизить образование CO_2 в контрольных пробах. Предварительная подготовка состоит из аэрации активного ила после разведения в тестовой среде до 30 мг/л влажным не содержащим CO_2 воздухом в течение от пяти до семи дней при температуре испытания.

5 Порядок проведения испытания

5.1 Количество тестовых сосудов

5.1.1 Количество сосудов (см. 4.1), необходимое для испытания, будет зависеть от частоты анализа и продолжительности испытания.

5.1.2 Рекомендуется проводить анализ трех параллельных проб (трех сосудов) по прошествии достаточного количества временных интервалов так, чтобы мог быть определен десятидневный интервал. Кроме того, по крайней мере пять тестовых сосудов (см. 4.1) из групп a, b и c (см. 5.3.2) анализируют по окончании испытания для оценки 95 % доверительного интервала для расчета среднего значения биоразложения в процентах.

5.2 Инокулюм

Посевная культура используется в концентрации 4 мг/л сухого остатка активного ила. Достаточное количество привитой среды готовят непосредственно перед использованием, например, путем добавления 2 мл подготовленного активного ила (см. 4.12) с концентрацией 2000 мг/л к 1 л среды из минеральных солей (см. 4.5). При использовании вторичных сточных вод добавляют до 100 мл сточных вод (см. 4.13) к 900 мл среды из минеральных солей (см. 4.5) и доводят до 1 л средой.

5.3 Подготовка сосудов

5.3.1 Аликвоты привитой среды разливают в параллельные сосуды для достижения соотношения объема свободного пространства к объему жидкости 1:2 (например, добавляют 107 мл в 160 мл сосуды). Могут использоваться другие соотношения. При использовании любого типа посевной культуры, необходимо обеспечить надлежащее перемешивание привитой среды для ее равномерного распределения в тестовых сосудах.

5.3.2 Готовят следующий набор сосудов (см. 4.4):

a) тестовые сосуды (обозначают как FT), содержащие исследуемое вещество;

b) контрольные сосуды (обозначают как FB), содержащие только тестовую среду и инокулят; любые химические вещества, растворители, агенты или фильтры из стекловолокна, используемые для введения исследуемого вещества в испытательные сосуды, также необходимо добавлять;

c) сосуды (обозначают как FC), содержащие стандартное вещество, для проверки процедуры испытания;

d) при необходимости сосуды (обозначают как FI), содержащие исследуемое и стандартное вещества в тех же концентрациях, как в сосудах FT и FC соответственно;

e) сосуды (обозначают как FS) для проверки возможного абиотического разложения как 1 + 50 мг/л $HgCl_2$ или стерилизованных каким-либо другим способом (например, в автоклаве).

5.3.3 Растворимые в воде исследуемые вещества и стандартные вещества добавляют в виде основных водных растворов (см. 4.9, 4.10, 4.11) для получения концентрации от 10 до 20 мг С/л.

5.3.4 Нерастворимые исследуемые и нерастворимые стандартные вещества добавляют в сосуды различными способами (см. 4.8) в зависимости от природы вещества, до или после добавления привитой среды, в зависимости от метода обработки данного вещества. Если используется одна из процедур, приведенных в пункте 4.8, то контрольные сосуды FB (см.5.3.2) следует рассматривать таким же образом, но за исключением исследуемого или стандартного веществ.

5.3.5 Летучие исследуемые вещества должны вводиться в герметически закрытые сосуды (см. 5.3.8) с помощью микрошприцев. Доза рассчитывается на основании введенного объема и плотности вещества.

5.3.6 Вода должна добавляться в сосуды, при необходимости, для достижения одинакового объема жидкости в каждом сосуде. Необходимо убедиться, что соотношение свободного пространства и

жидкой фазы (обычно 1:2) и концентрация исследуемого вещества таковы, что в свободном пространстве доступно количество кислорода, достаточное для обеспечения полного биоразложения.

5.3.7 Затем все сосуды закрывают, например, с бутилкаучуковыми пробками и алюминиевыми колпачками. Летучие исследуемые вещества должны быть добавлены на данном этапе (см. 5.3.4). Для проведения контроля снижения концентрации РОУ в тестовом растворе, анализа начальной концентрации НУ (стерильные контрольные пробы, см. 5.3.2) или других показателей из тестового сосуда отбирают соответствующую пробу. Тестовые сосуды и их содержимое затем исключаются из испытания.

5.3.8 Герметически закрытые сосуды размещают на ротационном шейкере (15 г) со скоростью встряхивания, достаточной для хорошего перемешивания содержимого бутылок и поддержания суспензии (например, от 150 до 200 оборотов в минуту), и инкубируют в темноте при температуре 20 °С, поддерживаемой на уровне ±1 °С.

5.4 Отбор проб

Способ отбора проб будет зависеть от лаг-фазы и кинетической скорости биоразложения исследуемого вещества. Сосуды исключают из испытания в день отбора пробы, который должен проходить, как минимум, один раз в неделю или чаще (например, два раза в неделю), если требуется полная кривая биоразложения. Для этого необходимое количество параллельных сосудов, представляющих F_T, F_B и F_C, и, если используются, F_I и F_S, извлекают из шейкера (см. 5.3). Испытание обычно проводят в течение 28 дней. Если кривая биоразложения показывает, что плато-фаза была достигнута ранее, чем через 28 дней, испытание может быть закончено раньше. Отбирают пробы из пяти сосудов, оставшихся на 28 день испытания, для анализа используют результаты для расчета доверительного интервала или коэффициента вариации для биоразложения в процентах. Пробы из сосудов для проверки на ингибирование и для абиотического разложения не должны отбираться так же часто, как из других сосудов, достаточно отбирать пробы в первый и 28 день испытания.

5.5 Анализ содержания неорганического углерода (НУ)

5.5.1 Образование CO_2 в сосудах определяется путем измерения увеличения концентрации неорганического углерода (НУ) в период инкубации. В данном испытании для измерения количества образовавшегося НУ рекомендуется использовать два метода, описание которых приведено ниже. Поскольку методы могут давать немного разные результаты, в ходе испытания необходимо использовать только один метод.

5.5.2 Метод (a) рекомендуется, если в среде могут содержаться остатки, например, стеклянной фильтровальной бумаги и/или нерастворимые исследуемые вещества. Данный анализ может выполняться с помощью газового хроматографа, если использование анализатора углерода недоступно. Важно, чтобы сосуды находились при температуре испытания или близкой температуре при проведении анализа газа в свободном пространстве. Метод [b] может быть проще для лабораторий, использующих анализатор углерода для измерения НУ. Важно, чтобы раствор гидроксида натрия (см. 4.7) для преобразования CO_2 в карбонат был либо свежеприготовленным, либо было известно содержание в нем НУ для учета при расчете результатов испытания (см. 6.5).

5.6 Метод (a): подкисление до pH < 3

5.6.1 Перед каждой серией анализов анализатор НУ калибруется с использованием соответствующих стандартных веществ по НУ (например, 1 масс. % CO_2 в N_2). Концентрированная ортофосфорная кислота (см. 4.6) вводится через мембрану каждого сосуда для снижения pH среды менее трех (например, добавляют 1 мл на 107 мл тестовой среды). Сосуды помещают обратно в шейкер. После встряхивания в течение 1 часа при температуре испытания сосуды извлекают из шейкера, аликвоты (например, 1 мл) газа отбираются из свободного пространства каждой бутылки и вводятся в анализатор НУ. Измеренные концентрации НУ регистрируют в виде мг · С/л.

5.6.2 Принцип настоящего метода заключается в том, что после подкисления до pH < 3 и установления равновесия при 20 °С, константа равновесия для распределения CO_2 между жидкой и газовой фазами в тестовом сосуде равна единице при измерении в виде концентрации [13]. Это должно быть подтверждено для тестовой системы как минимум один раз следующим образом:

Готовят сосуды, содержащие 5 и 10 мг/л НУ с использованием раствора безводного карбоната натрия (Na_2CO_3) в воде, не содержащей CO_2 и подкисленной до pH 6,5 концентрированным раствором ортофосфорной кислотой (см. 4.6), барботируют в течение ночи воздухом, не содержащим CO_2, и по-

вышают pH до нейтрального значения путем добавления щелочи. Обеспечивают, чтобы соотношение объема свободного пространства и объема жидкости было таким же, как в испытаниях (например, 1:2). Подкисляют и приводят к равновесию, как описано в 5.6, и измеряют концентрации НУ в свободном пространстве и жидкой фазе. Проверяют, что концентрации одинаковы в пределах ошибки эксперимента. Если это не так, исполнитель должен пересмотреть тестовые процедуры.

Эта проверка на распределение НУ между жидкой и газовой фазами не обязательно должна проводиться каждый раз, когда проводится испытание; она предположительно может быть проведена при выполнении калибровки.

5.6.3 Если необходимо измерять удаление РОУ (только для растворимых в воде исследуемых веществ), отбирают пробы жидкой фазы из разных сосудов (неподкисленных), фильтруют через мембранные фильтры и вводят в анализатор РОУ. Данные сосуды могут быть использованы для других анализов, в случае необходимости — для измерения основного биологического разложения.

5.7 Метод (b): конвертация CO_2 в карбонат

5.7.1 Перед каждой серией анализов, анализатор НУ калибруется с помощью соответствующего стандарта, например, раствором бикарбоната натрия ($NaHCO_3$) в воде, не содержащей CO_2 (см. 5.6.2), в диапазоне от 0 до 20 мг/л, как для НУ. Раствор гидроксида натрия (7М, по 4.7) (например, 1 мл на 107 мл среды) вводится через мембрану в каждый тестовый сосуд, и сосуды встряхивают в течение 1 ч при температуре испытания. Используют тот раствор гидроксида натрия, что и для прочих анализов в этот день испытания. Если для всех проб требуются абсолютные пустые значения НУ, определения НУ для раствора гидроксида натрия необходимо проводить каждый раз при его использовании. Сосуды извлекают из шейкера и позволяют среде осесть. Из каждого сосуда шприцем отбирают подходящие объемы (например, от 50 до 1000 мкл) жидкой фазы. Образцы вводят в анализатор неорганического углерода и регистрируют концентрации НУ. Необходимо убедиться, что используемый анализатор оборудован соответствующим образом для работы с щелочными образцами, получаемыми в данном методе.

5.7.2 Принцип настоящего метода заключается в том, что после добавления щелочи и встряхивания, концентрация НУ в свободном пространстве сосуда ничтожно мала. Это должно быть подтверждено для тестовой системы, хотя бы один раз с использованием стандартных веществ (по НУ), после добавления щелочи и достижения равновесия концентрации НУ измеряют в жидкой и газовой фазе (см. 5.6.2). Концентрация в свободном пространстве должна приближаться к нулю. Подобная проверка на практически полное поглощение CO_2 не должна проводиться каждый раз при проведении испытания.

5.7.3 Если необходимо измерять удаление РОУ (только для растворимых в воде исследуемых веществ), пробы необходимо отбирать из жидкой фазы разных сосудов (не содержащих добавленной щелочи), фильтровать через мембрану и подавать в анализатор РОУ. Эти сосуды могут использоваться для других анализов, при необходимости, для измерения основного биологического разложения.

6 Данные и отчет о проведении испытания

6.1 Расчет результатов испытания

6.1.1 Предполагая, что происходит 100 % минерализации исследуемого вещества до CO_2, ТНУ сверх того, что проводится в контрольной пробе, равен ООУ, добавляемому к каждому тестовому сосуду в начале испытания, то есть:

ТНУ равно ООУ.

Общая масса (мг) неорганического углерода (ОНУ) в каждом сосуде:

ОНУ = (мг С в жидкости + мг С в свободном пространстве)

$$ОНУ = (V_L \cdot C_L) + (V_H \cdot C_H), \quad (1)$$

где V_L — объем жидкости в сосуде, л;

C_L — концентрация НУ в жидкости, мг/л углерода;

V_H — объем свободного пространства, л;

C_H — концентрация НУ в свободном пространстве, мг/л углерода.

Расчет ОНУ для двух аналитических методов, используемых для измерения НУ в данном испытании, приведены ниже в 6.2 и 6.3.

Процент биоразложения %D в каждом конкретном случае определяется по формуле

$$\%D = \frac{(\mathrm{TIC}_t - \mathrm{TIC}_b)}{\mathrm{TOC}} \cdot 100, \quad (2)$$

где TIC_t — ОНУ в тестовом сосуде в момент времени t, мг;

TIC_b — среднее значение ОНУ в контрольной пробе в момент времени t, мг;

ТОС — ООУ, первоначально добавленное в тестовый сосуд, мг.

Процент биоразложения %D рассчитывается для исследуемого F_T, стандартного F_C веществ и контроля ингибирования F_I, при необходимости, из соответствующих количеств ОНУ, получаемых для каждого времени отбора проб.

6.1.2 Если в стерильной контрольной пробе происходит значительное увеличение содержания ОНУ F_S в течение всего периода испытания, можно сделать вывод, что происходит абиотическая деградация исследуемого вещества, и это необходимо принимать во внимание при расчете D по формуле (2).

6.2 Подкисление до pH < 3

Поскольку подкисление до pH < 3 и установление равновесия приводят к выравниванию концентрации ОНУ в жидкой и газовой фазах, необходимо измерять только концентрацию НУ в газовой фазе. Таким образом, из формулы (1):

$$\text{ОНУ} = (V_L + V_H) \cdot C_H = V_B \cdot C_H, \quad (3)$$

где V_B — объем тестового сосуда.

6.3 Перевод CO_2 в карбонат

В данном методе расчеты выполняются как в формуле (1), но не принимается в расчет незначительное количество НУ в газовой фазе, то есть

$$V_H \cdot C_H = 0, \quad (4)$$

$$\text{ОНУ} = V_L \cdot C_L. \quad (5)$$

6.4 Выражение результатов

6.4.1 Кривую биоразложения получают путем построения графика зависимости биоразложения D в % от времени инкубации и, если возможно, обозначают на ней лаг-фазу, фазу биоразложения, 10-дневный интервал и плато-фазу, то есть фазу, в которой достигается максимальное разложение и кривая биоразложения выравнивается. Если для параллельных тестовых сосудов получены сопоставимые результаты F_T (различие менее 20 %), строят кривую по средним значениям (приложение А, рисунок А.1); если нет, кривые строят для каждого сосуда. Определяют среднее значение биоразложения (в процентах) в плато-фазе или оценивают наибольшее значение (например, когда кривая убывает в плато-фазе), но важно отметить, что в последнем случае наибольшее значение не должно являться отклоняющимся значением (выбросом). В отчете о проведении испытания максимальный уровень биоразложения определяют как «степень биоразложения исследуемого вещества». Если количество тестовых сосудов оказалось недостаточным для выявления плато-фазы, данные, измеренные в последний день испытания, используют для расчета среднего значения. Данное последнее значение, среднее для пяти параллельных проб, служит для определения точности, с которой был определен процент биоразложения. Также указывают значения, полученные по окончании 10-дневного интервала.

6.4.2 Таким же образом строят кривую для стандартного вещества F_C и для пробы для проверки абиотического удаления F_S, и контроля ингибирования F_I.

6.4.3 Количество ОНУ в контрольной пробе (F_B) регистрируется так же, как для абиотической проверки F_S, если данные пробы были включены в испытание.

6.4.4 Вычисляют D для сосудов F_I на основании теоретического выхода НУ, ожидаемого только от стандартного компонента смеси. Если на 28 день $\frac{\left(D^1_{F_C} - D^2_{F_I}\right)}{D_{F_C}} \cdot 100 > 25\%$, можно предположить, что исследуемое вещество ингибирует активность посевной культуры, и это может учитываться при малых

значениях D_{FT}, полученных в условиях испытания. В этом случае испытание можно повторить с использованием наименьшей тестовой концентрации и, желательно, снизив содержание РНУ в посевной культуре и ОНУ, образуемого в контрольной пробе, поскольку наименьшая концентрация будет в свою очередь снижать точность метода. В альтернативном случае, может использоваться другая посевная культура.

Если в сосуде F_S (абиотическая проверка) наблюдается значительное увеличение (более 10 %) количества ОНУ, возможно, происходят следующие абиотические процессы разложения:

- процент разложения в сосудах F_C, содержащих контрольное вещество;
- процент разложения в сосудах F_I.

6.5 Достоверность результатов

6.5.1 Испытание признается достоверным, если:

- средний процент биоразложения в сосудах F_C, содержащих стандартное вещество более 60 % на 14 день инкубации, и
- среднее количество ОНУ, присутствующее в контрольной пробе F_B по окончании испытания более 3 мг · С/л.

Если данные ограничения не соблюдаются, испытание необходимо повторить с посевной культурой из другого источника и/или пересмотреть используемые процедуры. Например, если в испытании получают высокие контрольные значения НУ, необходимо использовать процедуру, приведенную в 4.12.

6.5.2 Если разложение исследуемого вещества не достигает 60 % ТНУ и было показано, что ингибирование не происходит (см. 6.4), испытание можно повторить с повышенной концентрацией посевной культуры (до 30 мг/л активного ила и 100 мл стоков/л) или посевной культурой из другого источника, особенно если значение разложения находилось в диапазоне от 20 % до 60 %.

6.6 Интерпретация результатов

6.6.1 Биоразложение более 60 % ТНУ в 10-дневный интервал в настоящем испытании показывает, что исследуемое вещество легко поддается биологическому разложению в аэробных условиях.

6.6.2 Если проходное значение 60 % ТНУ не достигается, определяют значение pH среды в сосуде, которое не должно быть кислотным или щелочным; значение менее 6,5 может означать, что произошла нитрификация. В таком случае анализ повторяют с более высокой концентрацией буферного раствора.

6.7 Отчет о проведении испытания

6.7.1 Составляют таблицу D (в процентах) для каждого исследуемого вещества (F_T), стандартного вещества (F_C) и контроля ингибирования (F_I), если он проводится, для каждого дня испытания. Если для каждой параллельной пробы получены сопоставимые результаты, строят график зависимости средних значений D (в процентах) от времени. Регистрируют количество ОНУ в контрольных пробах (F_B) и РОУ и/или другие показатели в стерильных контрольных пробах (F_S) и их процентное удаление.

6.7.2 Определяют среднее значение D (в процентах) в плато-фазе или используют наибольшие значения, если кривая разложения убывает в плато-фазе, и рассматривают это значение как «степень биоразложения исследуемого вещества». Необходимо учитывать, что в последнем случае наибольшее значение не должно быть отклоняющимся значением (выбросом).

6.7.3 Отчет о проведении испытания должен содержать следующую информацию:

Исследуемое вещество:

- общепринятое наименование, химическое наименование, номер CAS, структурную формулу и соответствующие физико-химические свойства;
- чистота (примеси) исследуемого вещества.

Условия проведения испытания:

- ссылка на настоящее руководство;
- описание используемой тестовой системы (например, объем сосуда, соотношения объема жидкости и свободного объема в сосуде, метод перемешивания и т. д.);
- использование исследуемого и стандартного веществ в тестовой системе: используемая концентрация и количество углерода, добавленная в каждый сосуд; любое использование растворителей;
- описание используемой посевной культуры (инокулята), предварительная обработка и предварительная подготовка;

- температура инкубации;
- подтверждение принципа анализа содержания неорганического углерода;
- основные характеристики используемого анализатора неорганического углерода (и любых других используемых аналитических методов);
- количество параллельных проб.

Результаты:

- исходные данные и расчетные значения биологического разложения, представленные в табличной форме;
- график зависимости разложения (в процентах) от времени для исследуемого и стандартного веществ, лаг-фаза, фаза разложения, 10-дневный интервал и наклон кривой;
- процент удаления в плато-фазе, по окончании испытания и по прошествии 10-дневного интервала;
- причины признания результатов испытаний непригодными;
- любые другие сведения, имеющие отношение к процедуре испытания;
- обсуждение результатов.

Приложение А
(справочное)

Пример кривой биоразложения

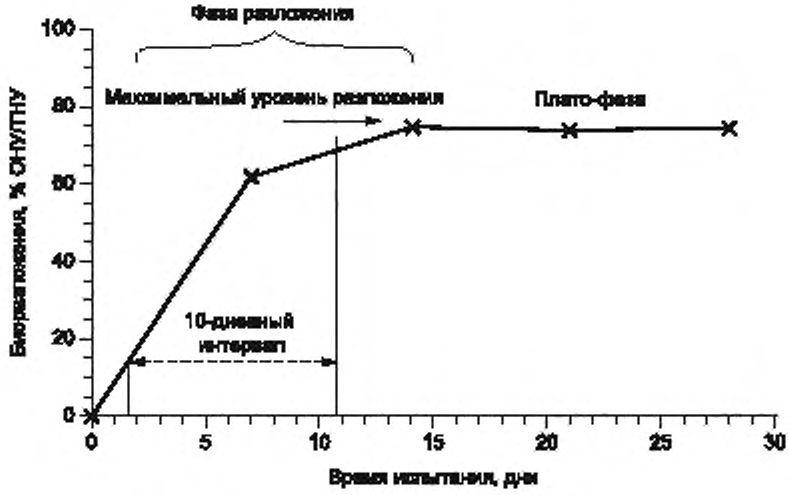


Рисунок А.1— Кривая биоразложения 1-октанола

Библиография

[1] OECD (1992) OECD Guideline for the Testing of Chemicals 301B: Ready Biodegradability-CO2 Evolution (Modified Sturm Test), (original version, adopted in May 1981). Paris

[2] Sturm, R.N (1973) Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50, 159—167

[3] Larson, R.J. (1979) Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38, 1153—1161

[4] Larson, R.J, Hansmann, M.A. and Bookland, EA. (1996) Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere, 33, 1195—1210

[5] International Organization for Standardization, ISO Standard 9 439 (1990; revised 1999) Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm). Geneva

[6] US EPA (1996) Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC

[7] US EPA (1996) Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC

[8] Gledhill, W.E. (1975) Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30, 922—929

[9] Weytjens, D, Van Ginneken, I and Painter, H.A. (1994) The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere, 28, 801—812

[10] Ennis, D.M. and Kramer, A. (1975) A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40, 181—185

[11] Ennis, D.M., Kramer, A., Jameson, C.W, Mazzocki, P.H. and Bailey, P.H. (1978) Appl. Env. Microbiol. 35, 51—53

[12] Boatman, R.J., Cunningham, S.L. and Ziegler, D.A. (1986) A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5, 233—243

[13] Struijs, J. and Stoltenkamp, J. (1990) Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19, 204—211

[14] Birch, R.R. and Fletcher, R.J. (1991) The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere, 23, 507—524

[15] Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere, 19, 1527—1550

[16] International Organization for Standardization, ISO Standard 14 593 (1999) Water Quality —Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic mediummethod by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO_2 headspace test), Geneva

[17] Battersby, N.S. (1997) The ISO headspace CO_2 biodegradation test, Chemosphere, 34, 1813—1822

[18] US EPA (1996) Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC

[19] Battersby NS, Ciccognani D, Evans, M.R, King, D, Painter, H.A, Peterson, D.R. and Starkey, M. (1999) An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere, 38, 3219—3235

[20] OECD (1992) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 301 Ready Biodegradability Tests —revision. Paris

[21] OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris

[22] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (1984). Section 2: Effects on biotic systems. 209 Activated sludge respiration inhibition test. Paris

[23] Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ. And Dekkers, ALM (1995) A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation, 6, 319—327

[24] EU (1999) Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK

[25] International Organization for Standardization ISO (1996), ISO Standard 10 634. 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. Geneva

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.100.01

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на окружающую среду, окружающая среда, биоразлагаемость

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 10.04.2019. Подписано в печать 06.06.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,86.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru