

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
ИСО 10634—  
2024

---

## КАЧЕСТВО ВОДЫ

**Оценка биоразлагаемости  
органических соединений в водной среде.  
Подготовка и обработка малорастворимых в воде  
органических соединений для последующей оценки**

(ISO 10634:2018, Water quality — Preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium, IDT)

Издание официальное

Москва  
Российский институт стандартизации  
2024

## Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский институт стандартизации» (ФГБУ «Институт стандартизации») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 апреля 2024 г. № 544-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 10634:2018 «Качество воды. Подготовка и обработка малорастворимых в воде органических соединений для последующей оценки их биоразлагаемости в водной среде» (ISO 10634:2018 «Water quality — Preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ИСО/ТК 147 «Качество воды», подкомитетом ПК 5 «Биологические методы» Международной организации по стандартизации (ИСО).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2012 (пункт 3.5).

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

5 ВЗАМЕН ГОСТ Р ИСО 10634—2016

6 Некоторые элементы настоящего стандарта могут являться объектами патентных прав

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет ([www.rst.gov.ru](http://www.rst.gov.ru))*

© ISO, 2018

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

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 Нормативные ссылки . . . . .                                                                                          | 1  |
| 3 Термины и определения. . . . .                                                                                        | 2  |
| 4 Методы подготовки и испытаний . . . . .                                                                               | 2  |
| 5 Прямое добавление или добавление на инертном носителе . . . . .                                                       | 2  |
| 6 Ультразвуковая и механическая обработка . . . . .                                                                     | 4  |
| 7 Адсорбция на инертном носителе с удалением из системы летучего растворителя . . . . .                                 | 5  |
| 8 Добавление с использованием не подверженного биологическому разложению растворителя или эмульгатора. . . . .          | 7  |
| 9 Предварительные испытания . . . . .                                                                                   | 8  |
| 10 Сочетание методов. . . . .                                                                                           | 10 |
| 11 Протокол испытания. . . . .                                                                                          | 10 |
| Приложение А (справочное) Примеры кривых биоразлагаемости . . . . .                                                     | 11 |
| Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам . . . . . | 13 |
| Библиография . . . . .                                                                                                  | 14 |

## Введение

Работа по стандартизации, проведенная ИСО/ТК 147/ПК 5, показала, что в ближайшем будущем не предусмотрена разработка единого метода оценки биоразлагаемости малорастворимых в воде органических соединений (т. е. менее 100 мг/л — см. [1]—[3]). Фактически выбор наиболее подходящего рабочего метода для получения соответствующей эмульсии или дисперсии данных соединений в испытуемой среде зависит, в частности, от их физико-химических свойств. Следовательно, выбор наиболее подходящего метода должен быть оставлен на усмотрение лабораторий, ответственных за проведение испытаний на основе их опыта и информации о продукте, предоставленной заявителем. В связи с этим в настоящем стандарте приведены различные методы обработки малорастворимых в воде органических соединений перед их испытанием на биоразлагаемость. Цель состоит в том, чтобы достичь стадии, на которой для любого заданного метода во всех лабораториях используют один и тот же рабочий метод, тем самым упрощая сравнение результатов. Необходимо учитывать особенности выбранного протокола для оценки и интерпретации результатов испытания на биоразлагаемость.

При проведении параллельных испытаний по методам, приведенным в настоящем стандарте, возможно, получатся неодинаковые результаты биоразлагаемости испытуемого соединения. Использование растворителей и методик диспергирования или эмульгирования может служить дополнительным источником неопределенности и может привести к результатам испытаний, отличным от результатов, полученных без использования данных методов. Кроме того, могут быть получены дисперсии или эмульсии, которых в природе не существует. Рекомендуется проводить испытания на биоразлагаемость с прямым добавлением испытуемого соединения и параллельным применением методик диспергирования, поскольку активность используемого инокулята должна быть сопоставимой. Присутствие микроорганизмов, способных разлагать испытуемое соединение, предполагается идентичным. Состав и активность могут изменяться при последующих испытаниях.

В соответствии с действующими стандартами по испытаниям на биоразлагаемость испытания необходимо проводить только на чистых веществах или соединениях, содержащих небольшое количество примесей. Испытания на биоразлагаемость не рекомендуются для неоднородных смесей или многокомпонентных соединений, поскольку результаты таких испытаний трудно интерпретировать, особенно при частичном разложении. Кроме того, использование растворителей и методов диспергирования может привести к нерепрезентативным неоднородным распределениям и к некорректным результатам испытаний в последующих испытаниях на биоразлагаемость.

## НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

## КАЧЕСТВО ВОДЫ

Оценка биоразлагаемости органических соединений в водной среде.  
Подготовка и обработка малорастворимых в воде органических соединений  
для последующей оценки

Water quality. Assessment of biodegradability of organic compounds in the aquatic environment. Preparation and processing poorly soluble organic compounds in water for further evaluation

Дата введения — 2025—03—01

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** — Пользователям настоящего стандарта необходимо соблюдать стандартные правила лабораторной практики. Целью настоящего стандарта не является решение всех проблем безопасности, при их наличии, связанных с его использованием. Пользователь несет ответственность за установление соответствующих правил техники безопасности и охраны здоровья.

**ВАЖНО** — Крайне важно, чтобы испытания в соответствии с настоящим стандартом проводил квалифицированный персонал.

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы подготовки малорастворимых в воде органических соединений (т. е. жидких и твердых соединений) с растворимостью в воде приблизительно менее 100 мг/л и введения их в испытательные сосуды для последующего испытания на биоразлагаемость в водной среде стандартными методами.

Дополнительные испытания на биоразлагаемость являются преимущественно методами с использованием анализа выделенного диоксида углерода в соответствии с ИСО 9439 и определением содержания кислорода в соответствии с ИСО 9408, а также с соблюдением стандартных мер предосторожности, приведенных в ИСО 10707. Таким образом, можно отметить, что методы измерения удаления растворенного органического углерода (РОУ) не применимы.

В настоящем стандарте не приведены методы испытаний на биоразлагаемость. Он ограничен описанием способа введения испытуемых веществ в испытательную среду и сохранением их в диспергированном состоянии [4]. Эти методы применяют с соблюдением условий проведения испытания, приведенных в стандартизованных методах оценки биоразлагаемости. ИСО 9439, основанный на выделении  $\text{CO}_2$ , не применим для испытаний летучих соединений.

Некоторые методы подготовки, приведенные в настоящем стандарте, могут быть не приняты регулирующими органами для получения заключения по полной биоразлагаемости испытуемых соединений.

Примеры кривых биоразлагаемости приведены в приложении А.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 9408, Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer (Качество воды. Оценка

полной аэробной биоразлагаемости органических соединений в водной среде путем определения кислородной потребности в закрытом респирометре)

ISO 9439, Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution test (Качество воды. Оценка полной аэробной биоразлагаемости органических соединений в водной среде. Метод измерения количества выделенного диоксида углерода)

ISO 10707, Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test) [Качество воды. Оценка «полной» аэробной биоразлагаемости органических соединений в водной среде. Метод анализа биохимической потребности в кислороде (испытание в закрытой склянке)].

### 3 Термины и определения

В настоящем стандарте термины не приведены.

ИСО и МЭК ведут терминологические базы данных для использования в области стандартизации по следующим адресам:

- платформа онлайн-просмотра ИСО: доступна по адресу <http://www.iso.org/obp>;
- Электропедия МЭК: доступна по адресу <http://www.electropedia.org/>.

### 4 Методы подготовки и испытаний

#### 4.1 Методы подготовки

В настоящем стандарте приведено несколько методов введения испытываемых соединений в испытываемую среду. Методы подготовки следующие:

- прямое добавление: данный метод рекомендуют для малорастворимых в воде органических соединений, вместо приготовления исходного раствора;
- ультразвуковая дисперсия: данный метод допускается применять для нелетучих жидких и твердых соединений;
- адсорбция или взвешивание на инертном носителе;
- дисперсия или солюбилизация с добавкой;
- сочетание перечисленных выше методов.

**Примечание** — Что касается сочетания методов, то данные методы, как правило, применяют параллельно (т. е. одновременно, с использованием одного и того же метода и одного и того же инокулята), чтобы понять, является ли один из методов доминирующим или оба способствуют повышению биодоступности и биоразлагаемости.

#### 4.2 Аналитические методы

Концентрация испытываемого соединения должна соответствовать требованиям ИСО 9439, ИСО 9408 и ИСО 10707.

Если испытываемое соединение вводят в испытательный сосуд непосредственно или на инертном носителе, нет необходимости подтверждать испытываемую концентрацию.

Если в методе подготовки используют исходный раствор испытываемого соединения, необходимо подтвердить испытываемую концентрацию. Для этого:

- необходим определенный аналитический метод, если носитель или добавка представляют собой органическое химическое вещество (например, поверхностно-активное вещество);
- анализ общего содержания органического углерода (ООУ) приемлем, если носитель или добавка представляют собой неорганическое соединение (например, силикагель) или если путем физической обработки (например, ультразвуковой обработки) получена однородная дисперсия.

### 5 Прямое добавление или добавление на инертном носителе

#### 5.1 Общие положения

Испытания на биоразлагаемость необходимо проводить параллельно с прямым добавлением испытываемого соединения и с использованием методов диспергирования, поскольку активность используемого инокулята должна быть сопоставимой. Присутствие микроорганизмов, способных разлагать испытываемое соединение, предполагается одинаковым.

Испытуемое соединение взвешивают и вводят в испытательные сосуды или взвешивают на инертном носителе и добавляют в испытательные сосуды, непрерывно перемешивая их содержимое.

Твердые соединения могут быть измельчены (например, с помощью ступки и пестика) насколько это возможно перед взвешиванием. Допускается использовать жидкий азот.

**Примечание** — Добавление испытуемого вещества, адсорбированного на инертном носителе, может повлиять на окончательный результат биоразлагаемости. Биодоступность соединения может быть ограничена адсорбцией на инертном носителе. Следовательно, полученный результат биоразлагаемости может уменьшиться (например, если адсорбция на поверхности инертного материала ограничивает доступ испытуемого вещества к инокуляту). Если испытуемое соединение токсично для микроорганизмов, ограничение биодоступности может ограничить токсическое воздействие и увеличить результат биоразлагаемости.

## 5.2 Реактивы

### 5.2.1 Инертные носители

Используют силикагель, фильтры из стекловолокна, микроскопические срезы или другие не подверженные биологическому разложению инертные носители, которые не выделяют органический или неорганический углерод в водную среду.

С помощью предварительных исследований подтверждают, что носитель инертен и не содержит углерода. Чтобы избежать или свести к минимуму влияние площади поверхности, количество носителя должно быть минимальным. Испытуемое соединение должно быть адсорбировано на поверхности.

Например, используют следующие носители:

- микроскопический срез;
- полиэтиленовый срез;
- срез из нержавеющей стали;
- силикагель для тонкослойной хроматографии (размер частиц 15 мкм);
- силикагель, используемый для колоночной хроматографии (размер частиц от 200 до 500 мкм).

## 5.3 Оборудование

### 5.3.1 Мешалки

Необходимо достаточное количество мешалок для перемешивания содержимого всех испытательных сосудов, используемых в определенном испытании на биоразлагаемость, за исключением испытания в закрытой склянке (см. ИСО 10707).

Стержни мешалки должны быть изготовлены из такого материала, компоненты пластикового покрытия которого не будут загрязнять испытательную среду и не будут адсорбировать испытуемое соединение. Следует избегать нагрева испытательных сосудов при перемешивании и повышения температуры испытания.

### 5.3.2 Сосуды

Рекомендуется использовать химико-лабораторное стекло или химически инертную лабораторную посуду для взвешивания и подготовки проб, чтобы избежать загрязнения углеродом и адсорбции испытуемого соединения.

### 5.3.3 Механический диспергатор<sup>1)</sup>

## 5.4 Методы

### 5.4.1 Прямое добавление

Испытуемые соединения взвешивают и добавляют в испытательные сосуды.

Невязкие жидкие соединения добавляют с помощью высокоточного мерного шприца с учетом их относительной плотности.

### 5.4.2 Добавление на инертном носителе

#### 5.4.2.1 Твердое испытуемое соединение

Взвешивают на носителе (5.2.1) количество соединения, которое соответствует концентрации органического углерода, требуемой в соответствии с методом испытания.

Вводят носитель в каждый испытательный сосуд.

<sup>1)</sup> Примером подходящего продукта, имеющегося в коммерческой продаже, является Ultra-turrax®. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает одобрения указанного продукта со стороны ИСО.

Вводят носитель без испытуемого соединения в каждый из контрольных сосудов.

#### 5.4.2.2 Жидкое испытуемое соединение

Взвешивают жидкость, включая вязкое соединение, без обработки. Готовят такое количество испытуемого соединения, которое требуется в соответствии с методом испытания на биоразлагаемость, для смешивания с носителем.

Например, при конечном объеме испытуемого раствора 1 л добавляют 50 мг носителя (5.2.1) и такое количество испытуемого соединения, которое необходимо для испытательного сосуда, путем прямого взвешивания и эмульгируют с помощью механического диспергатора в течение 1 мин. При этом проводят ту же процедуру, используя только носитель в контрольных сосудах. После смешивания инертного носителя с жидким испытуемым соединением добавляют воду для разбавления и инокулят.

## 6 Ультразвуковая и механическая обработка

### 6.1 Общие положения

Эмульсию или дисперсию испытуемого соединения готовят с помощью ультразвукового зонда или ультразвуковой ванны и вводят в испытательные сосуды, содержимое которых постоянно перемешивают (см. 5.3.1 и 5.3.2).

### 6.2 Оборудование

6.2.1 Ультразвуковой зонд, способный продуцировать частоту примерно 20—35 кГц.

6.2.2 Ультразвуковая ванна, способная продуцировать частоту примерно 20—35 кГц.

6.2.3 Мешалки, в достаточном количестве, чтобы можно было перемешивать содержимое всех испытательных сосудов (см. 5.3.2).

### 6.3 Проведение испытания с использованием ультразвукового зонда

#### 6.3.1 Приготовление испытуемого соединения

##### 6.3.1.1 Приготовление исходного раствора

Добавляют, например, 1 г или 1 мл испытуемого соединения в лабораторный стакан вместимостью 500 мл, содержащий приблизительно 400 мл деионизированной воды.

Испытуемое соединение должно быть представлено в избытке, чтобы получить насыщенный раствор.

##### 6.3.1.2 Приготовление с требуемым количеством

Добавляют необходимое количество испытуемого соединения в испытательные сосуды с минеральной средой без инокулята.

#### 6.3.2 Проведение испытания

Устанавливают ультразвуковой зонд (6.2.1) таким образом, чтобы его кончик находился как можно ближе к границе раздела между минеральной средой и испытуемым соединением.

Используют мешалку (6.2.3) для перемешивания содержимого испытательного сосуда таким образом, чтобы испытуемое соединение опустилось на дно.

Устанавливают зонд на частоту от 20 до 35 кГц и поддерживают ее в течение 5—30 мин.

Выключают зонд и оставляют эмульсию или дисперсию отстояться на 15—30 мин.

Некоторые соединения подвержены разложению под действием ультразвука, возможно, из-за повышения температуры в основном объеме раствора. Этой проблемы можно избежать, измеряя и контролируя температуру, уменьшая мощность ультразвукового зонда или применяя периодическую обработку ультразвуком. Можно охладить испытательный сосуд, чтобы избежать перегрева, например, поместив испытательный сосуд в баню со льдом или в холодную воду. В некоторых случаях могут возникнуть проблемы из-за разрушения соединений. В таком случае следует применить другой метод.

При использовании исходного раствора анализируют аликвоту полученной эмульсии или дисперсии и определяют концентрацию испытуемого соединения после декантации с использованием соответствующего аналитического метода. Вводят соответствующий объем эмульсии или дисперсии в испытательные сосуды, чтобы получить концентрацию органического углерода, необходимую в соответствии с используемым методом испытания.

Получение стабильной эмульсии или дисперсии может быть проблематично. Поэтому необходимы особые меры предосторожности при распределении аликвот по испытательным сосудам. Если невозможно получить достаточно стабильную эмульсию или достаточно высокую концентрацию для

проведения испытания, испытуемое соединение можно ввести напрямую в испытательную среду и диспергировать ультразвуком в испытательных сосудах перед добавлением инокулята.

#### **6.4 Метод с использованием ультразвуковой ванны**

Подготавливают испытательные сосуды с необходимой концентрацией испытуемого соединения и минеральной средой без инокулята. Помещают испытательные сосуды в ультразвуковую ванну (6.2.2).

Устанавливают ванну на частоту примерно от 20 до 35 кГц в течение приблизительно 5—30 мин. Потребляемая мощность ультразвуковой обработки зависит от многих факторов. Воздействие необходимо протестировать в предварительных испытаниях, чтобы получить подходящее сочетание электрической мощности и продолжительности обработки.

Выключают ванну и оставляют эмульсию или дисперсию отстаиваться на 15—30 мин (см. 6.3.2).

#### **6.5 Другие методы**

Кроме обработки ультразвуком возможны и другие методы улучшения физической биодоступности, например эмульсии Пикеринга, как описано в [5]:

«Эмульсии стабилизируются поверхностно-активными веществами, такими как молекулы поверхностно-активных веществ, имеющими сходство с обеими фазами. Поверхностно-активные вещества, традиционные стабилизаторы, непрерывно адсорбируются и десорбируются на границе раздела фаз. Это лежит в основе явления фазового разделения, поскольку имеет место конкуренция между адсорбцией и коалесценцией. В последние несколько лет вместо молекул поверхностно-активных веществ стали использовать твердые частицы. Эти типы эмульсий называются эмульсиями Пикеринга».

Такие методы будут применять к испытуемым соединениям, суспендированным в минеральной среде. Их использование будет допустимо, если испытуемая среда останется неизменной и сохранит свои свойства. Необходимо:

- использовать соответствующий специальный аналитический метод, проанализировать аликвоту полученной эмульсии или дисперсии и определить концентрацию испытуемого соединения после декантации;

- подготовить контрольные сосуды, содержащие минеральную среду, и использовать подготовку без испытуемого соединения.

В некоторых случаях могут возникнуть проблемы из-за разрушения соединений. В таком случае следует использовать другой метод.

Данный метод демонстрирует свою способность улучшать биодоступность испытуемого соединения в испытаниях на биоразлагаемость [6].

### **7 Адсорбция на инертном носителе с удалением из системы летучего растворителя**

#### **7.1 Общие положения**

Испытуемое соединение адсорбируют или взвешивают на инертном носителе и вводят в испытательные сосуды. Соединение поддерживают в диспергированном состоянии в среде путем непрерывного перемешивания.

#### **7.2 Реактивы**

##### **7.2.1 Инертные носители**

Используют силикагель, фильтры из стекловолокна, микроскопические срезы или другие не подверженные биологическому разложению инертные носители, которые не выделяют органический или неорганический углерод в водную среду (см. 5.2.1).

##### **7.2.2 Растворитель**

Летучий растворитель выбирают по его способности растворять испытуемое соединение.

Он должен быть не токсичен для бактерий и не подвергаться биологическому разложению при условиях последующих испытаний на биоразлагаемость, а также иметь высокую степень чистоты. Это гарантирует, что введено незначительное количество органического углерода с нелетучими остатками. Это необходимо испытать заранее или при последующих испытаниях на биоразлагаемость.

В зависимости от испытуемого соединения можно использовать трихлорметан (уникальный численный идентификатор CAS RN: 67-66-3).

**Примечание 1** — Остаточное содержание углерода от неиспарившегося растворителя может повлиять на результаты испытаний, несмотря на применение контрольного опыта с использованием растворителя.

**Примечание 2** — Чтобы предотвратить мобилизацию адсорбированных органических остатков из оборудования летучими растворителями, может потребоваться дополнительная промывка растворителем перед использованием оборудования.

Можно использовать нетоксичные и не подверженные биологическому разложению растворители (например, 3,7,11,15-тетраметилгексадекан-1,2,3-триол, уникальный численный идентификатор CAS RN: 74563-64-7 или диметилизосорбид, уникальный численный идентификатор CAS RN: 5306-85-4). Тем не менее их пригодность для испытаний на биоразлагаемость должна быть доказана заранее.

### 7.3 Оборудование

7.3.1 Мешалки в достаточном количестве, чтобы можно было перемешивать содержимое всех испытательных сосудов (см. 5.3.1).

7.3.2 Сосуды (см. 5.3.2).

### 7.4 Метод

7.4.1 Подготавливают необходимое в соответствии с применяемым методом испытания на биоразлагаемость количество испытуемого соединения для впитывания в носитель. Для этого могут быть выполнены два вида подготовки: индивидуальная (7.4.2) или с использованием распределения (7.4.3).

7.4.2 В качестве примера индивидуальной подготовки смешивают в выбранном растворителе (7.2.2) носитель (7.2.1) с количеством испытуемого соединения, необходимым в соответствии с методом испытания, путем перемешивания 50 мг в каждом испытательном сосуде, вместимостью 100 мл, в течение 2 ч. Одновременно проводят аналогичную процедуру с использованием только носителя и растворителя в качестве контрольного опыта.

В обоих случаях извлекают носитель и высушивают, полностью выпаривая растворитель. Это можно сделать путем последовательного использования роторного испарителя, вентилируемого сушильного шкафа и вакуумно-сушильного шкафа при температуре примерно 45 °С.

7.4.3 В качестве примера с использованием распределения смешивают в выбранном растворителе (7.2.2) путем перемешивания в каждом испытательном сосуде вместимостью 250 мл в течение 2 ч 30 мг носителя (7.2.1) с 150 мл раствора испытуемого соединения. Одновременно проводят аналогичную процедуру с использованием только носителя и растворителя в качестве контрольного опыта.

В обоих случаях извлекают носитель и высушивают, полностью выпаривая растворитель. Это можно сделать путем последовательного использования роторного испарителя, вентилируемого сушильного шкафа и вакуумно-сушильного шкафа при температуре примерно 45 °С.

7.4.4 Для аналитической верификации определяют количество соединения, адсорбированного в носитель, на трех пробах массой 1,5 г или более, используя один из следующих методов:

- проводят количественный элементный анализ количества углерода, полученного из соединения, используя высокотемпературный анализатор общего углерода, а затем вычитают значения, полученные для носителя, обработанного только растворителем;
- определяют химическую потребность в кислороде соединения, адсорбированного в инертный носитель, а затем вычитают значения, полученные для носителя, обработанного только растворителем;
- экстрагируют соединение с использованием органического растворителя и проводят количественный анализ с помощью определенного аналитического метода.

Из количества испытуемого соединения, эффективно адсорбированного в носитель, определяют количество носителя, которое необходимо ввести в испытательные сосуды для получения концентрации органического углерода испытуемого соединения, требуемой в соответствии с используемым методом испытания.

Вводят такое же количество носителя, обработанного только растворителем, в каждый контрольный сосуд.

Результаты контрольного опыта с использованием растворителя необходимо учитывать при вычислении результатов для испытуемого соединения.

**Примечание** — Последние следы растворителя бывает трудно удалить. Сложности могут возникать, если растворитель подвержен биологическому разложению или ингибирует бактерии.

## 8 Добавление с использованием не подверженного биологическому разложению растворителя или эмульгатора

### 8.1 Общие положения

Дисперсию, эмульсию или солюбилизацию испытуемого соединения готовят с использованием растворителя, эмульгатора, масляного или другого химического носителя и вводят в испытательные сосуды, содержимое которых непрерывно перемешивают.

**Примечание** — Как правило, добавление растворителей, эмульгаторов или других добавок, не удаленных из системы, увеличивает общую неопределенность испытаний. Использование эмульгатора для приготовления исходных или испытуемых дисперсий, как правило, является наименее предпочтительным методом [7].

### 8.2 Реактивы

#### 8.2.1 Растворитель

Готовят раствор испытуемого соединения в органическом растворителе и вводят в испытательные сосуды, содержимое которых непрерывно перемешивают.

Растворитель, в достаточной степени смешивающийся с водой, выбирают по его способности растворять испытуемое соединение. Выбранный растворитель не должен вступать в реакцию с испытуемым соединением или каким-либо компонентом среды. Растворитель необходимо использовать в минимальных количествах ( $1 \text{ мл} \cdot \text{л}^{-1}$  или менее). Растворитель должен быть нетоксичным для бактерий и не подвергаться биологическому разложению в условиях последующего испытания на биоразлагаемость.

Если растворитель летучий, его следует удалить перед добавлением инокулята. Могут возникнуть трудности при удалении растворителей, которые хорошо смешиваются с водой [8]. В этом случае их не следует использовать.

#### 8.2.2 Эмульгатор

Эмульгатор должен быть нетоксичным для бактерий и не подвергаться биологическому разложению в условиях последующего испытания на биоразлагаемость.

Если биоразлагаемость и ингибирующее воздействие на бактерии эмульгатора неизвестны, то их необходимо исследовать заранее или во время дополнительных анализов последующего испытания на биоразлагаемость, например используя один сосуд, содержащий только эмульгатор для измерения биоразлагаемости, а другой сосуд, содержащий эмульгатор и контрольные соединения, например бензоат натрия, анилин для измерения ингибирования.

В качестве примера допускается использовать следующие соединения<sup>2)</sup>:

а) блок-сополимер оксида этилена и оксида пропилена со значением гидрофильно-липофильного баланса примерно 9;

б) блок-сополимер оксида этилена и оксида пропилена со значением гидрофильно-липофильного баланса примерно 13,5.

#### 8.2.3 Минеральное масло

Минеральное масло должно быть нетоксичным для бактерий и не подвергаться биологическому разложению в условиях последующих испытаний на биоразлагаемость, как, например, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан (CAS RN: 4390-04-9) [9].

#### 8.2.4 Силиконовое масло

Силиконовое масло, такое как полидиметилсилоксан и полифенилметилсилоксан, например AR 20®<sup>3)</sup> (CAS RN: 63148-58-3), зачастую не поддается биологическому разложению и не токсично для бактерий [10], [11].

<sup>2)</sup> Примерами подходящих продуктов, имеющихся в коммерческой продаже, для соединений а) и б) соответственно являются Pluronic P9400® и Pluronic P10300®. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает одобрения указанных продуктов со стороны ИСО.

<sup>3)</sup> Примером подходящего продукта, имеющегося в коммерческой продаже, является Ultra-turrax AR 20®. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает одобрения указанного продукта со стороны ИСО.

### 8.3 Оборудование

8.3.1 Мешалки в достаточном количестве, чтобы можно было перемешивать содержимое всех испытательных сосудов (см. 5.3.1).

8.3.2 Механический диспергатор<sup>1)</sup>.

## 9 Предварительные испытания

### 9.1 Реактивы

#### 9.1.1 Выбор концентрации эмульгатора

В качестве примера готовят три раствора испытуемого соединения ( $x$  мг) в  $y$  мл растворителя (8.2.1) или минеральной среде с каждым из следующих эмульгаторов:

а) только блок-сополимер [8.2.2 а)] в количестве  $0,5x$  мг;

б) только блок-сополимер [8.2.2 б)] в количестве  $0,5x$  мг;

с) смесь блок-сополимера [8.2.2 а)] в количестве  $0,25x$  мг и блок-сополимера [8.2.2 б)] в количестве  $0,25x$  мг.

Вычисляют количество соединения, растворенного в растворителе ( $x$  мг), чтобы получить требуемую концентрацию органического углерода в испытуемом соединении в используемой испытательной среде.

Гомогенизируют, непрерывно перемешивая (например, в течение 10 мин), а затем добавляют по капле полученный раствор к объему испытательной среды, который необходим для каждого испытательного сосуда в соответствии с испытанием на биоразлагаемость. Удаляют растворитель, не прекращая перемешивание или с помощью любого другого соответствующего метода.

Путем визуальной оценки выбирают вариант подготовки а), б) или с), благодаря которому получают наиболее однородную и стабильную эмульсию. Для получения однородной и стабильной эмульсии может потребоваться несколько дней.

#### 9.1.2 Выбор концентрации минерального масла

В качестве примера готовят два раствора испытуемого соединения ( $x$  мг) в испытуемой среде с каждым из следующих количеств минерального масла:

а)  $0,5x$  мг;

б)  $0,25x$  мг.

Эмульгируют с помощью механического диспергатора в течение 1 мин. Путем визуальной оценки выбирают вариант подготовки а) или б), благодаря которому получают наиболее однородную эмульсию.

#### 9.1.3 Выбор концентрации силиконового масла

В качестве примера готовят два раствора испытуемого соединения ( $x$  мг), в испытуемой среде с каждым из следующих количеств силиконового масла:

а)  $x \cdot 50$  мг;

б)  $x \cdot 25$  мг.

Эмульгируют с помощью механического диспергатора в течение 1 мин. Путем визуальной оценки выбирают вариант подготовки а) или б), благодаря которому получают наиболее однородную эмульсию.

### 9.2 Методы

#### 9.2.1 Использование растворителя

Готовят раствор испытуемого соединения в минимальном объеме выбранного органического растворителя (8.2.1).

В испытательные сосуды вводят количество раствора, необходимое для получения концентрации органического углерода, в соответствии с используемым методом испытаний.

Вводят такое же количество растворителя без какого-либо испытуемого соединения в каждый из контрольных сосудов.

По возможности, полностью выпаривают растворитель, используя, например, последовательно ротаторный испаритель, вентилируемый сушильный шкаф и вакуумный сушильный шкаф при температуре примерно  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Последние следы растворителя бывает трудно удалить. Сложности могут возникать, если растворитель подвержен биологическому разложению или ингибирует бактерии.

Испытуемый раствор можно равномерно распределить по дну испытательных сосудов, а затем продуть газом (например, воздухом, азотом) и/или перемешать. Остаточное количество растворителя бывает трудно удалить. Сложности могут возникать, если растворитель подвержен биологическому разложению или ингибирует бактерии.

Готовят смесь, содержащую только испытуемую среду и растворитель, чтобы получить результаты контрольного опыта для проверки того, что биоразлагаемость растворителя не превышает 10 % по сравнению с биоразлагаемостью испытуемого соединения.

Результаты контрольного опыта с использованием растворителя необходимо учитывать при вычислении результатов для испытуемого соединения.

#### **9.2.2 Использование эмульгатора**

Готовят достаточное количество эмульсии или дисперсии, сочетающей эмульгатор и испытуемое соединение в соответствии с методом, выбранным в результате предварительных испытаний для всех испытательных сосудов, необходимых для проведения испытания на биоразлагаемость.

В качестве альтернативы можно приготовить эмульсию или дисперсию для каждого испытательного сосуда с концентрацией эмульгатора в соответствии с методом, выбранным в результате предварительных испытаний.

Готовят эмульсию или дисперсию, содержащую только испытательную среду и эмульгатор, чтобы получить результаты контрольного опыта для проверки того, что биоразлагаемость эмульгатора не превышает 10 % по сравнению с биоразлагаемостью испытуемого соединения.

Результаты контрольного опыта с использованием эмульгатора необходимо учитывать при вычислении результатов для испытуемого соединения.

#### **9.2.3 Использование минерального масла**

Готовят достаточное количество эмульсии или дисперсии, сочетающей минеральное масло и испытуемое соединение, в соответствии с методом, выбранным в результате предварительных испытаний, для всех используемых испытательных сосудов, необходимых для проведения испытания на биоразлагаемость.

В качестве альтернативы можно приготовить эмульсию или дисперсию для каждого испытательного сосуда с концентрацией минерального масла в соответствии с методом, выбранным в результате предварительных испытаний.

Готовят эмульсию или дисперсию, содержащую только испытательную среду и минеральное масло, чтобы получить результаты контрольного опыта для проверки того, что биоразлагаемость эмульгатора не превышает 10 % по сравнению с биоразлагаемостью испытуемого соединения.

Результаты контрольного опыта на минеральное масло необходимо учитывать при вычислении результатов для испытуемого соединения [10], [11].

#### **9.2.4 Использование силиконового масла**

Готовят достаточное количество дисперсии, сочетающей силиконовое масло и испытуемое соединение, в соответствии с методом, выбранным в результате предварительных испытаний, для всех используемых испытательных сосудов, необходимых для проведения испытания на биоразлагаемость.

В качестве альтернативы можно приготовить дисперсию для каждого испытательного сосуда с концентрацией силиконового масла в соответствии с методом, выбранным в результате предварительных испытаний.

Например, готовят для каждого испытательного сосуда дисперсию в пробирке путем смешивания  $y$  мл силиконового масла и  $x$  мг испытуемого соединения в минеральной среде, чтобы получить конечную концентрацию силиконового масла 1 мл/л и конечную концентрацию испытуемого соединения, необходимую для проведения испытания на биоразлагаемость. Гомогенизируют данную дисперсию путем всасывания и сброса микропипеткой. Нагревают в течение 10 мин при температуре 40 °C в термостате. Нагревание следует исключить, если оно может изменить структуру испытуемого соединения. Диспергируют механическим диспергатором в течение 1 мин.

Готовят дисперсию, содержащую только испытательную среду и силиконовое масло, чтобы получить результаты контрольного опыта для проверки того, что биоразлагаемость силиконового масла не превышает 10 % по сравнению с биоразлагаемостью испытуемого соединения.

Результаты контрольного контроля с использованием силиконового масла необходимо учитывать при вычислении результатов для испытуемого соединения [10], [11].

### 9.3 Другие добавки

Другие соединения или натуральные добавки допускается использовать для усовершенствования методов испытания на биодоступность испытуемых соединений, такие как некоторые биологические поверхностно-активные вещества. В отношении таких других добавок можно применить выбор эмульгатора (9.1.1), чтобы выбрать метод (9.2.2) подготовки добавки и эмульгатора.

Добавка должна быть нетоксичной для бактерий и не должна подвергаться биологическому разложению в условиях последующего испытания на биоразлагаемость, особенно если ее невозможно удалить в достаточной степени. Она не должна изменять структуру испытуемого соединения и должна использоваться в небольших количествах (приблизительно 10 мг/л или менее), чтобы предотвратить любое существенное изменение испытательной среды. Следовательно, соединения в виде полностью биоразлагаемых моносахаридов не подходят для приготовления испытуемого соединения.

Важно приготовить дисперсию, содержащую только испытательную среду и добавку, чтобы получить результаты контрольного опыта для проверки того, что биоразлагаемость добавки не превышает 10 % по сравнению с биоразлагаемостью испытуемого соединения.

Результаты контрольного опыта с использованием данной добавки необходимо учитывать при вычислении результатов для испытуемого соединения.

## 10 Сочетание методов

Также можно комбинировать химические методы, приведенные в разделах 5, 7 и 8, и физические методы, приведенные в разделе 6 [например, использование ультразвуковой дисперсии (6.3) с силиконовым маслом (8.2.4) [4]—[6]]. Этот процесс следует проводить на испытуемом соединении, суспендированном в минеральной среде.

Его использование будет допустимо, если испытательная среда останется неизменной и сохранит свои свойства. Для этого необходимо:

- использовать соответствующий аналитический метод (см. 4.2), проанализировать аликвоту полученной эмульсии или дисперсии и определить концентрацию испытуемого соединения в декантированной среде после декантации;
- подготовить контрольные сосуды, содержащие минеральную среду, и использовать подготовку без испытуемого соединения.

Кроме того, предпочтительно применять методы параллельно (т. е. одновременно с использованием одного и того же метода и одного и того же инокулята), чтобы понять, является ли один из методов доминирующим или оба способствуют повышению биодоступности и биоразлагаемости.

## 11 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать, как минимум, следующую информацию:

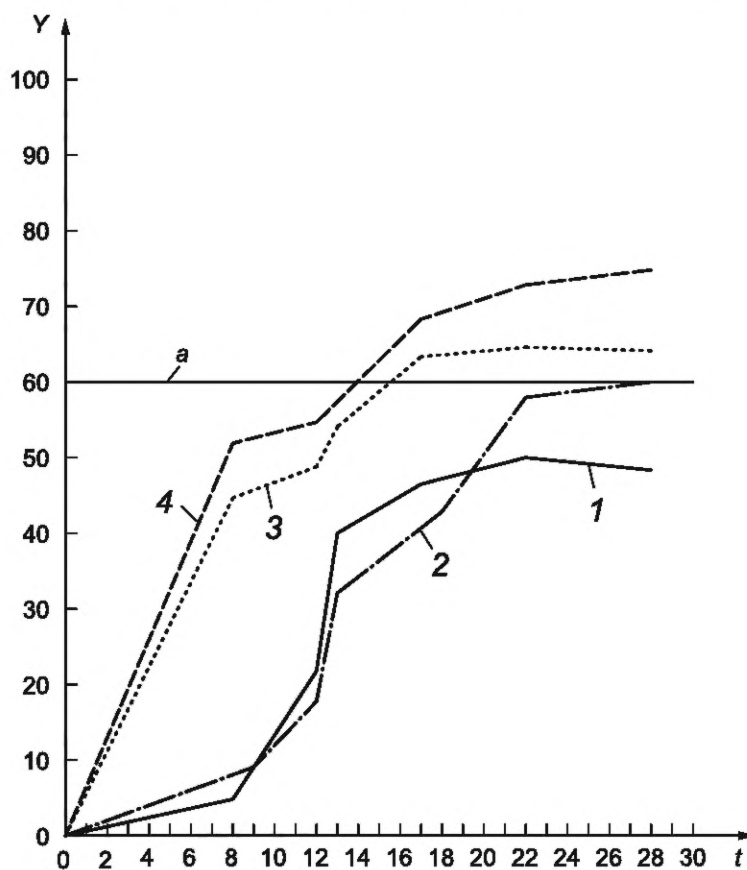
- a) использованный метод испытания и ссылку на настоящий стандарт;
- b) любую предварительную обработку соединения перед испытанием;
- c) метод введения испытуемого соединения;
- d) продолжительность и интенсивность обработки;
- e) природу и количество носителя или добавки;
- f) концентрацию соединения в эмульсии или дисперсии;
- g) степень восстановления выделения адсорбированного испытуемого соединения на инертном носителе.

**Примечание** — Может быть полезно проиллюстрировать полученную эмульсию или дисперсию при помощи фотографий, сопоставив с испытательными сосудами, содержащими необработанное испытуемое соединение.

## Приложение А (справочное)

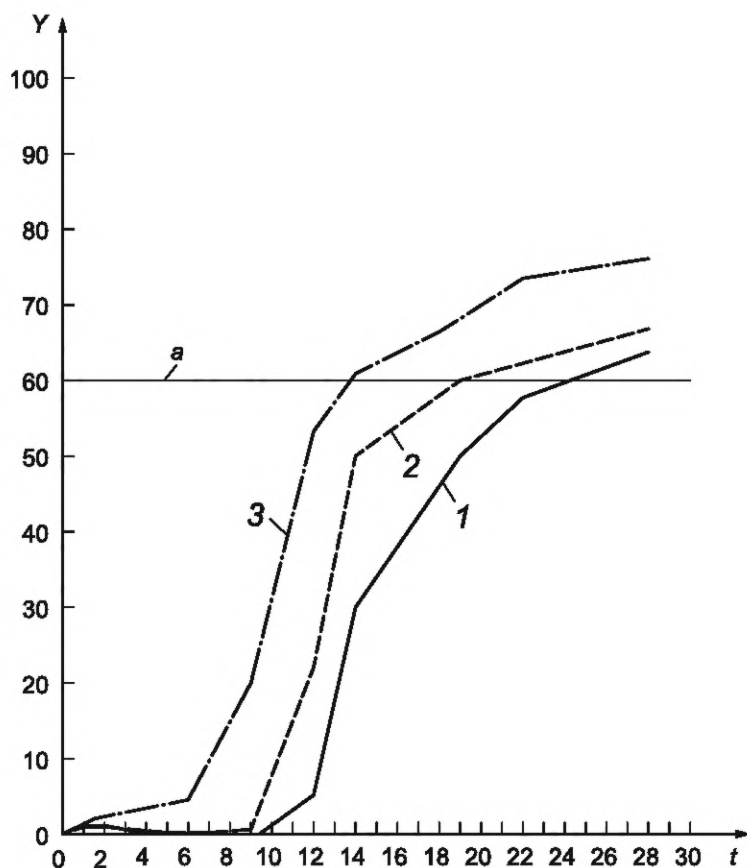
### Примеры кривых биоразлагаемости

В данном приложении приведены примеры кривых биоразлагаемости (см. рисунки А.1 и А.2), которые были получены с помощью пяти методов подготовки, приведенных в настоящем стандарте. Последующие испытания на биоразлагаемость были проведены в соответствии с ИСО 9439 (выделенный диоксид углерода).



1 — прямое добавление; 2 — ультразвуковая дисперсия; 3 — дисперсия с эмульгатором; 4 — адсорбция на инертном носителе;  
t — время (дни); Y — процент биоразложения; a — пороговое значение полной биоразлагаемости

Рисунок А.1 — Кривые биоразлагаемости антрахинона в соответствии с методом испытания по ИСО 9439



1 — прямое добавление; 2 — дисперсия с силиконовым маслом; 3 — дисперсия с силиконовым маслом и эмульгатором;  
 $t$  — время (дни);  $Y$  — процент биоразложения;  $a$  — пороговое значение полной биоразлагаемости

Рисунок А.2 — Кривые биоразлагаемости антрахинона в соответствии с методом испытания по ИСО 9439, выполненным при концентрации антрахинона 20 мг/л, с двумя повторами для каждой обработки и с использованием эмульгатора Pluronic PE9400®<sup>2)</sup>

На рисунке А.1 показано, что метод подготовки с адсорбцией на инертном носителе и использованием дисперсии с эмульгатором преодолел пороговое значение 60 % через 28 дней, но не прошел 10-дневный интервал по сравнению с методом прямого добавления, который не прошел 60 %-ный порог.

На рисунке А.2 лаг-фаза более важна. Метод прямого добавления имеет процент биоразлагаемости выше, чем результаты, представленные на рисунке А.1 (пройдено пороговое значение 60 %), но не удовлетворяет критериям 10-дневного интервала. Дисперсии с силиконовым маслом и дисперсии с силиконовым маслом и эмульгатором преодолели пороговое значение 60 % в течение 10-дневного интервала, что свидетельствует о том, что антрахинон полностью биоразлагаем [12].

**Приложение ДА**  
**(справочное)**

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

Таблица ДА.1

| Обозначение ссылочного международного стандарта                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Степень соответствия | Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ISO 9408                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | IDT                  | ГОСТ Р ИСО 9408—2016 «Качество воды. Оценка биоразлагаемости органических соединений в водной среде. Метод оценки полной аэробной биоразлагаемости путем определения кислородной потребности в закрытом респирометре» |
| ISO 9439                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | IDT                  | ГОСТ Р ИСО 9439—2016 «Качество воды. Оценка биоразлагаемости органических соединений в водной среде. Метод оценки полной аэробной биоразлагаемости путем измерения количества выделенного диоксида углерода»          |
| ISO 10707                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | —                    | *                                                                                                                                                                                                                     |
| <p>* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Официальный перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде стандартов.</p> <p><b>Примечание</b> — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта:</p> <p>- IDT — идентичный стандарт.</p> |                      |                                                                                                                                                                                                                       |

## Библиография

- [1] ISO 5667-16:2017 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples
- [2] OECD. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment, № 23. OECD Publishing, 2000
- [3] ECHA. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7b: Endpoint specific guidance Version 3.0, February 2016 (see Appendix R.7.8-1)
- [4] ECETOC. Biodegradation Tests for Poorly-Soluble Compounds. Technical Report No. 20. ECETOC, Brussels, 1986
- [5] Kalashnikova I., Bizot H., Bertoncini P., Cathala B., Capron I. Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter*. 2013, 9(3) p. 952
- [6] Sweetlove C. Développement de techniques permettant d'améliorer la prédiction de la biodégradabilité en milieu naturel de produits organiques faiblement hydrosolubles dans les tests de laboratoire. PhD Thesis. University of Nantes, France, 2017. Available from: <http://www.theses.fr/s108961>
- [7] ISO 14442 Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water
- [8] Handley J.W., Mead C., Rausina G.A., Waid L.J., Gee J.C., Herron S.J. The use of inert carriers in regulatory biodegradation tests of low density poorly water-soluble substances. *Chemosphere*. 2002, 48(5) pp. 529—534
- [9] Auffret M., Labbé D., Thouand G., Greer C.W., Fayolle-Guichard F. Degradation of a Mixture of Hydrocarbons, Gasoline, and Diesel Oil Additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(24) pp. 7774—7782
- [10] Van Ginkel C.G., Gancet C., Hirschen M., Galobardes M., Lemaire P., Rosenblom J. Improving ready biodegradability testing of fatty amine derivatives. *Chemosphere*. 2008, 73(4) pp. 506—510
- [11] Sweetlove C., Chenèble J.-C., Barthel Y., Escaffre F., Boualam M., L'Haridon J. Impact of inoculum and Bioavailability Improvement Methods (BIM) on ready biodegradability of two poorly water soluble chemicals. Abstract book p.243 SETAC EUROPE 25th annual meeting, Barcelona, Spain, 2015
- [12] Sweetlove C., Chenèble J.-C., Barthel Y., Boualam M., L'Haridon J., Thouand G. Evaluating the ready biodegradability of two poorly water-soluble substances: comparative approach of bioavailability improvement methods (BIMs). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016, 23(17) pp. 1—11

---

УДК 631.423.4:006.354

ОКС 13.060.70

Ключевые слова: качество воды, оценка биоразлагаемости, органические соединения, растворенный органический углерод, испытания, прямое добавление, ультразвуковая дисперсия, адсорбция, инертный носитель

---

Редактор *Н.В. Таланова*  
Технический редактор *В.Н. Прусакова*  
Корректор *М.И. Першина*  
Компьютерная верстка *И.Ю. Литовкиной*

Сдано в набор 26.04.2024. Подписано в печать 03.05.2024. Формат 60×84%. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 2,32. Уч-изд. л. 1,86.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

---

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»  
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,  
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)