ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 18763— 2019

КАЧЕСТВО ПОЧВЫ

Определение токсического воздействия загрязняющих веществ на всхожесть и рост на ранних стадиях высших растений

(ISO 18763:2016, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (АО «ВНИИС») на основе официального перевода на русский язык англоязычной версии указанного в пункте 4 стандарта, который выполнен АО «ВНИИС»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 025 «Качество почв, грунтов и органических удобрений»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 августа 2019 г. № 497-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 18763:2016 «Качество почвы. Определение токсического воздействия загрязняющих веществ на всхожесть и рост на ранних стадиях высших растений» (ISO 18763:2016 «Soil quality — Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ISO/TC 190 «Качество почв», подкомитетом SC 4 «Биологические методы» Международной организации по стандартизации (ISO).

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

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*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 (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2016 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2019

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 1
4 Принцип 2
5 Реактивы, тест-организмы и среды 3
6 Аппаратура и материалы 4
7 Обработка и подготовка проб 5
8 Процедура 5
9 Измерение 7
10 Вычисление процентного замедления 8
11 Контрольный препарат 9
12 Точность 9
13 Критерии валидности 9
14 Протокол испытания 10
Приложение А (справочное) Проведение тестирования на фитотоксичность в прозрачных планшетах с природными и искусственными почвами и почвенными материалами, с различными видами растений 11
Приложение В (справочное) Сборка планшетов для тестирования на фитотоксичность 13
Приложение С (справочное) Международные межлабораторные сличения тестов на фитотоксичность 14
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам 19
Библиография 20

Введение

Экотоксикологическое тестирование проб почвы или отходов, сбрасываемых на почву, необходимо для оценки потенциального экологического риска, возникающего в силу загрязнения почвы или сброса таких отходов, как осадки сточных вод, на сельскохозяйственные земельные участки. Также существует необходимость контроля качества почвы после рекультивации промышленных площадок. Вследствие этого разработано практичное и быстрое тестирование всхожести и роста, основанное на прорастании семян и росте сеянцев в контролируемых условиях окружающей среды.

Данное испытание не требует предварительной обработки семян и проводится в прозрачных планшетах, инкубирующихся вертикально, для того чтобы обеспечить видимость корней и ростков проросших семян. После 72-часового периода воздействия планшеты для тестирования фотографируются, и полученное изображение может быть проанализировано посредством анализа изображения по нескольким параметрам, таким как процентные показатели всхожести семян, длины корней и высоты ростков. Для обеспечения учета разной степени чувствительности, свойственной различным видам растений, испытания проводят с использованием семян трех видов растений: одного однодольного — сорго двухцветного (*Sorghum saccharatum*) и двух двудольных — кресс-салата (*Lepidium sativum*) и горчицы белой (*Sinapis alba*).

Значительным преимуществом данного тестирования является тот факт, что после съемки и сохранения фотографий планшетов для тестирования измерения с помощью анализа изображений можно перенести на устанавливаемый пользователем срок.

В качестве негативного контроля могут быть использованы референтные или стандартные почвы, такие как стандартная искусственная почва ИСО, изготовленная в соответствии с ИСО 11269-1 и ИСО 11269-2.

Коммерчески доступные семена со сроком хранения более одного года позволяют проводить данное тестирование в любое время года.

Два раунда международных межлабораторных сравнительных испытаний показали, что данное тестирование дает хорошие результаты.

По результатам значительного количества исследований опубликованы данные по проведению такого тестирования с различными видами почв и почвенных материалов и с несколькими типами видов растений.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАЧЕСТВО ПОЧВЫ

Определение токсического воздействия загрязняющих веществ на всхожесть и рост на ранних стадиях высших растений

Soil quality. Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants

Дата введения — 2021—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения влияния почвы и околопочвенных материалов на всхожесть семян и ранние этапы роста высших растений. Конечные результаты являются показателями, полезными для оценки качества почвы как ареала обитания организмов. Настоящий стандарт применим ко всем почвам, в которых почвенные организмы активны, и может быть использован для оценки следующих факторов:

- характера воздействия почвы на растения в силу токсичности твердых или жидких химикатов, загрязняющих почву или иные материалы (компост, ил, отходы), а также химикатов, добавленных в почву;
- изменений в характере воздействия почвы на растения после проведения мероприятий по восстановлению почвы.

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 11269-1, *Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth* (Качество почвы. Определение воздействия загрязняющих веществ на флору почвы. Часть 1. Метод измерения замедления роста корней)

ISO 11269-2, *Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 2: Method for the measurement of inhibition of root growth* (Качество почвы. Определение воздействия загрязняющих веществ на флору почвы. Часть 2. Воздействие контаминированной почвы на прорастание и ранний рост высших растений)

ISO/TS 20281, Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data (Качество воды. Руководящие указания по статистической интерпретации данных по экотоксикологии)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **искусственная почва** (artificial soil): Смесь песка, каолинита, торфа и карбоната кальция, приготовленная согласно стандартам ИСО 11269-1 и ИСО 11269-2.

3.2 **контрольная почва** (control soil): Референтная или стандартная почва, используемая в качестве контроля и в качестве среды при приготовлении серии разбавлений с исследуемыми почвами или референтными веществами.

Издание официальное

3.3 **референтная почва** (reference soil): Незагрязненная почва из определенного места (например, отобранная поблизости от загрязненного участка) со свойствами (содержание питательных веществ, pH, содержание органического углерода и механический состав), близкими к свойствам исследуемой почвы.

3.4 **стандартная почва** (standard soil): Почва, отобранная в поле или приготовленная искусственно, свойства которой (pH, механический состав, содержание органического углерода) находятся в известном диапазоне.

Примечание — Свойства стандартных почв могут отличаться от свойств исследуемой почвы.

3.5 **исследуемая почва** (test soil): Природная или искусственная чистая почва, в которую добавлена исследуемая субстанция, или загрязненная природная почва (почва с площадки) [5].

3.6 **появление ростков** (seedling emergence): Появление видимого ростка над поверхностью покровного материала.

[ИСО 17126:2005, 3.1, с изменениями]

3.7 **прорастание семян** (germination): Появление корешка длиной не менее 1 мм.

3.8 **чистая вода** (pure water): Вода определенной степени чистоты, получаемая, например, путем однократной перегонки, деионизации, ультрафильтрации или обратного осмоса [5].

3.9 **длина корня** (root length): Длина корня от семени до кончика корня.

3.10 **длина ростка** (shoot length): Длина части растения, растущей вверх, от семени до кончика растения.

3.11 **влагонасыщенность** (water saturation): Максимальный объем влаги, который почва может удержать, преодолевая силу тяжести, в условиях покоя почвы, условно определяется как содержание влаги через два-три дня после полного влагонасыщения.

[ИСО 11074:2015, 2.1.5 влагоемкость грунта, с изменениями]

3.12 **влагонасыщенная почва** (water saturated soil): Почва, достигшая максимально возможного содержания влаги.

3.13 **влагоемкость** (water-holding capacity): Масса воды, испаряющейся из влагонасыщенной почвы при высушивании почвы до постоянной массы при температуре 105 °С, разделенная на сухую массу почвы [7].

3.14 **негативный контроль** (negative control): Материал или субстанция, который(ая) при тестировании в рамках определенной процедуры демонстрирует пригодность процедуры к обеспечению воспроизводимой, уместно негативной, инертной или минимальной ответной реакции в рамках системы тестирования.

[ИСО 10993-10:2010, 3.12, с изменениями]

3.15 **процентный показатель воздействия** (effect percentage): Снижение всхожести семян и роста корней и/или ростков растений в исследуемой почве по сравнению с контрольной почвой, выраженное в процентах.

4 Принцип

Данный метод основан на сравнении всхожести и раннего роста однодольных и двудольных растений в исследуемой почве и/или в серии смесей с содержанием контрольной почвы. Данный метод также может быть использован для тестирования компоста, ила или отходов.

Семена одного однодольного растения, такого как *Sorghum saccharatum* (L.) Moench, и двух двудольных, таких как *Lepidium sativum* L. и *Sinapis alba* L., подвергаются воздействию исследуемых материалов в контролируемых условиях. По прошествии (72 ± 1) ч фиксируют количество проросших семян и длину корней тест-растений в исследуемой почве и контрольной почве.

При использовании других видов семян продолжительность проращивания может быть скорректирована в зависимости от времени, необходимого для прорастания семян и скорости роста корней.

В рамках тестирования используют уникальные плоские и мелкие прозрачные планшеты (6.3), состоящие из двух камер, нижняя из которых содержит увлажненную почву.

Семена отобранных тест-растений размещают на равном расстоянии друг от друга около срединной перегородки планшета (6.3) на черной фильтровальной бумаге (6.5), помещенной поверх увлажненной почвы.

После закрытия планшетов (6.3) прозрачными крышками, планшеты вертикально помещают в держатель (6.4) и выдерживают при температуре (25 ± 1) °С в течение (72 ± 1) ч.

В конце проращивания длина каждого корня (и ростка, при желании) может быть измерена напрямую линейкой и зафиксирована.

В качестве альтернативы может быть получено цифровое изображение планшетов (6.3) с проросшими растениями (с помощью либо цифровой камеры, либо веб-камеры, либо планшетного сканера) для последующего хранения в компьютерном файле. Последующее измерение длины корней осуществляют с помощью анализа изображения. Анализ всхожести и роста корней может быть сделан незамедлительно или отложен на устанавливаемый пользователем срок.

Примечание — Та же процедура при желании может быть применена для измерения длины ростков. Вычисление соотношения высоты ростка к длине корня является возможным дополнительным параметром воздействия.

5 Реактивы, тест-организмы и среды

5.1 Вода

Чистая вода с электропроводностью менее 10 мкСм/см.

5.2 Тест-организмы

Тест-организмами являются семена одного однодольного растения, такого как *Sorghum saccharatum* (L.) Moench, и двух двудольных, таких как *Lepidium sativum* L. и *Sinapis alba* L.

Исследования проведены с использованием не только трех видов растений, указанных в 5.2, но и других однодольных и двудольных видов растений. Обобщенные сведения о данных исследованиях приведены в приложении А.

Следует избегать семян, покрытых инсектицидами и/или фунгицидами.

5.3 Контрольная почва

В качестве контрольной почвы могут быть использованы либо референтные, либо стандартные почвы, если в этих почвах можно ожидать незатрудненный рост тест-растений.

При сравнении удлинения корней в почвах известного и неизвестного качества контрольная почва и исследуемая почва должны обладать одним гранулометрическим составом и быть настолько похожими, насколько это практически возможно по всем параметрам, кроме присутствия химиката или загрязняющего вещества, являющегося предметом исследования. В действительности значительные различия в свойствах почв кроме присутствия загрязняющего вещества могут приводить к различиям в длине корней и тем самым к получению ложноположительных результатов тестирования.

В качестве альтернативы может быть использована искусственная почва, приготовленная в соответствии с ИСО 11269-1 и ИСО 11269-2.

Субстрат, называемый «искусственная почва», имеет следующий состав:

	Процентное содержание указано на основе сухой массы пробы
Мелкоизмельченный сфагновый торф, не имеющий видимых остатков растений	10 %
Каолинитовая глина, содержащая не менее 30 % каолинита	20 %
Промышленный кварцевый песок (с преобладанием мелкого песка, более 50 % песчинок имеют размер от 0,05 до 0,2 мм)	69 %

Примечание — Как отмечается в ИСО 11269-1, по результатам испытаний, 5 % торфа достаточно для поддержания желаемой структуры искусственной почвы (с соответствующим увеличением процентного содержания песка до 75 %). Более низкое процентное содержание каолинитовой глины (10 % вместо 20 %) к тому же очень близко к уровню содержания глины в почве LUFA 2.2 и, следовательно, является более репрезентативным для природных почв. Таким образом, рекомендуется следующий состав искусственной почвы: торф — 5 %, каолинитовая глина — 10 % и песок — 85 %.

Необходимо от 0,3 % до 1,0 % карбоната кальция ($CaCO_3$, порошкообразный, ч.д.а) для того, чтобы получить значение pH = (6,0 ± 0,5) ед. pH.

6 Аппаратура и материалы

6.1 Инкубатор или помещение с регулируемой температурой, обеспечивающие поддерживание заданных условий при температуре (25 ± 1) °С.

6.2 Цифровая камера, веб-камера или планшетный сканер для съемки фотографий планшетов с пророщенными семенами и дальнейшего хранения изображений в компьютерном файле.

6.3 Планшеты для тестирования, прозрачные планшеты из поливинилхлорида (ПВХ).

Планшеты для тестирования состоят из нижней части, разделенной срединной перегородкой на верхнюю и нижнюю камеру, и плоской крышки. Планшеты для тестирования могут быть изготовлены вручную с помощью листа прозрачного ПВХ и небольших прямоугольных палочек, как описано в приложении В.

В качестве альтернативы могут быть использованы коммерчески доступные планшеты для тестирования. Нижняя часть данных планшетов должна вмещать приблизительно 90 $см^3$ исследуемой почвы. По сторонам обеих частей данных планшетов расположены небольшие прямоугольные углубления, предназначенные для плотного закрытия планшета с помощью уникальной системы защелкивания. Планшеты для тестирования должны быть снабжены маркировкой, содержащей детальные данные о каждом планшете (вид почвы, вид семян, номер планшета).

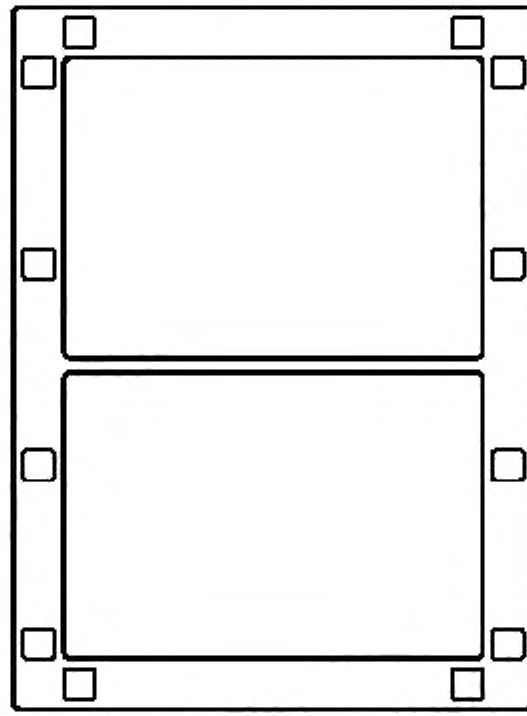

Рисунок 1 — Планшет для тестирования с боковыми углублениями для плотного закрытия планшета

6.4 Держатели для планшетов, картонные держатели, каждый для вертикальной инкубации шести планшетов (6.3).

6.5 Черная фильтровальная бумага, прямоугольные листы черной фильтровальной бумаги высокой степени чистоты (например, 85 $г/м^2$, толщина 0,17 мм, скорость фильтрации 45 с), по размеру помещающиеся в нижнюю часть планшета; листы располагают в нижней камере планшетов (6.3) поверх почвы.

6.6 Барабан микросита, небольшой пластиковый цилиндр с нейлоновой марлей в нижней части, используемый для определения объема воды, который необходимо добавить в исследуемую почву.

6.7 Микропипетка с широким отверстием, пластиковая микропипетка для использования совместно с барабаном микросита (6.6) для определения объема воды, который необходимо добавить в исследуемую почву.

6.8 Сито, 2-миллиметровое сито для просеивания исследуемой почвы перед использованием для тестирования.

6.9 Тонкая лопатка, ручной инструмент с тонким лезвием, используемый для смешивания исследуемой почвы с водой.

6.10 Плоская лопатка, ручной инструмент с широким, плоским лезвием, использующийся для распределение и уплощения исследуемой почвы в нижней камере планшетов (6.3).

6.11 Щипчики, небольшой инструмент наподобие пинцета для работы с семенами.

7 Обработка и подготовка проб

7.1 Пробы почвы

Испытания проводят с почвами, насыщенными влагой; насыщение проводят перед началом тестирования.

7.1.1 Определение влагоемкости

Насыщенная влагой почва может быть получена путем добавления к массе почвы соответствующего объема чистой воды, определяющего влагоемкость.

7.1.2 Альтернативная процедура для определения объема воды, который необходимо добавить в планшеты для тестирования для насыщения влагой воздушно-сухих почв

Для определения объема воды, который необходимо добавить в воздушно-сухие почвы, размещенные в планшетах для тестирования (6.3), может быть использована простая и быстрая процедура.

Для искусственной почвы, рекомендованной в 5.3, объем воды, который необходимо добавить для насыщения почвы влагой, определен опытным путем. На основании соотношения объема воды к объему почвы, равного 0,39, добавляют 35 см^3 чистой воды к 90 см^3 контрольной почвы, размещенной в планшете для тестирования (6.3).

Для других контрольных почв объем воды, который необходимо добавить для насыщения почвы влагой, должен быть определен опытным путем в соответствии с процедурой, описанной в следующем абзаце для проб исследуемой почвы.

Пробы исследуемой почвы предварительно должны быть высушены на воздухе, затем высушенную почву просеивают через сито (6.8) для устранения грубого материала.

Примечание — Воздушная сушка требуется только для отдельной пробы почвы для последующего определения объема воды, который необходимо добавить в планшеты для тестирования.

В химическом стакане 50 см^3 чистой воды тщательно смешивают с 90 см^3 исследуемой почвы с помощью тонкой лопатки (6.9). Спустя 1—2 мин выявляются два слоя: слой увлажненной почвы и поверх нее — слой воды.

Барабан микросита (6.6) вертикально опускают в химический стакан до поверхности увлажненной почвы, а затем опускают еще немного ниже, чтобы он начал наполняться супернатантом.

С помощью микропипетки с широким отверстием (6.7) отбирают воду из микросита и переносят ее в мерный цилиндр.

Барабан микросита (6.6) снова помещают в химический стакан и проталкивают барабан микросита еще глубже, для того чтобы в него попала дополнительная влага из почвы. Полученную воду снова перемещают в мерный цилиндр и повторяют предыдущие манипуляции до тех пор, пока влага не перестанет выделяться из почвы.

Подсчитывают, какой объем воды потребовался для полного насыщения исследуемой почвы влагой. Данный объем V_{sat} — это объем воды, изначально добавленный в почву (= 50 см^3) минус объем супернатантной воды S, который перемещен в мерный цилиндр ($V_{sat} = 50 - S$).

8 Процедура

Испытания 90 см^3 почвы проводят в планшетах (6.3).

В случае оценки взаимосвязи дозировки и ответной реакции при работе с неизвестной пробой должно быть проведено полное тестирование, включающее серию смесей контрольной почвы с пробой

(например, компост, ил, отходы). Разбавления должны быть приготовлены в рамках геометрической серии с коэффициентом разделения, не превышающим 2,0 (см. ИСО 11269-1). В соответствии с выбранным диапазоном разбавления исследуемую почву тщательно смешивают с референтной почвой или контрольной почвой (либо вручную, либо используя ручной миксер). Визуально проверяют однородность смеси. Для каждого из полученных разбавлений объем воды, который необходимо добавить в планшеты (6.3), должен быть определен опытным путем (7.1.2).

8.1 Процедура тестирования для определения воздействия загрязненных почв

8.1.1 Добавление контрольной почвы и исследуемой почвы в планшеты и увлажнение почв

8.1.1.1 Контрольная почва

Если искусственную почву (5.3) используют в качестве контроля, 90 $см^3$ контрольной почвы (5.3) помещают в нижнюю камеру планшета (6.3), затем медленно закапывают 35 $см^3$ чистой воды, распределяя по всей поверхности контрольной почвы в планшете.

Если используют другую контрольную почву, добавляемый объем воды определяют опытным путем (7.1.2).

Полное насыщение почвы влагой происходит в течение 1—2 мин.

С помощью плоской лопатки (6.10) влажную почву равномерно распределяют по всей поверхности нижней камеры планшета (6.3) с целью получения слоя одинаковой толщины.

Все предыдущие операции повторяют для всех планшетов (6.3), использующихся для негативного контроля (= девять планшетов).

8.1.1.2 Исследуемая почва

90 $см^3$ просеянной исследуемой почвы помещают в нижнюю камеру планшета (6.3), затем исследуемую почву увлажняют в соответствии с описанной выше процедурой для контрольной почвы, выливая объем чистой воды, равный V_{sat} (7.1.2), на поверхность почвы в планшете и разравнивая ее с помощью плоской лопатки (6.10).

Все предыдущие операции повторяют для всех остальных планшетов с исследуемой почвой (девяти планшетов).

Примечание — В качестве альтернативы процедуре многократного отмеривания объема почвы в 90 $см^3$ в мерном сосуде можно определить вес исследуемой почвы, соответствующий объему 90 $см^3$, и подготовить такие навески для перемещения в соответствующие планшеты (6.3).

8.1.2 Размещение семян

Поверх увлажненной почвы во все планшеты (6.3) помещают один лист черной фильтровальной бумаги (6.5), и во избежание попадания под фильтр пузырьков воздуха ожидают 1—2 мин для того, чтобы фильтр полностью пропитался водой.

Испытание проводят в трех повторениях с тремя различными видами семян. Это означает, что каждый вид семян должен быть засеян в три планшета (6.3) с контрольной почвой, и в три планшета с исследуемой почвой.

С помощью щипчиков (6.11) отбирают 10 семян одного вида тест-растений и помещают их в один ряд на черную фильтровальную бумагу (6.5) на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии около 1 см от срединной перегородки планшета (6.3).

Верхней частью планшета накрывают нижнюю часть, планшет плотно закрывают и маркируют, указывая детальные данные о тесте (вид почвы, вид семян, номер повторения).

Последнюю операцию повторяют для каждого семени для трех контрольных планшетов и для трех повторений с исследуемой почвой.

8.1.3 Инкубация планшетов для тестирования

Шесть планшетов (6.3), в которые засеяны семена одного вида (три с исследуемой почвой и три с контрольной почвой), вертикально помещают в один держатель для планшетов (6.4).

Данную операцию повторяют для оставшихся двух видов семян.

Три держателя для планшетов (6.4) вместе с установленными на них планшетами (6.3) помещают в инкубатор (6.1) и проращивают при температуре (25 ± 1) °С в течение (72 ± 1) ч.

Примечание — Отмечается, что свет не имеет воздействия ни на прорастание семян, ни на рост корней в течение короткого времени проращивания (три дня). В связи с этим освещение в инкубаторе в период выращивания не рекомендуется.

8.1.4 Запись изображений

Изображение планшетов по окончании периода воздействия может быть получено либо путем съемки на веб-камеру или цифровую камеру, либо путем сканирования на планшетном сканере. Фотография затем должна быть перенесена в файл на компьютере.

Для проведения исследований в дальнейшем может быть использована соответствующая программа для анализа изображений, которая позволяет измерять длину.

Примечание — Удобной и практичной программой для анализа изображений является программа Image J. Данную программу можно загрузить напрямую из сети Интернет по следующей ссылке: gost.e-ecolog.ru gov/ij/download.html.

9 Измерение

Все измерения должны быть произведены в течение (60 ± 10) мин после окончания периода воздействия или могут быть отложены на устанавливаемый пользователем срок путем записи изображений (8.1.4) планшетов для тестирования (6.3).

9.1 Подсчет количества проросших семян

Подсчитывают количество проросших семян N_s в планшетах (6.3) и фиксируют данное число в протоколе результатов «Индивидуальные показатели».

9.2 Измерение длины корней проросших семян

9.2.1 Измерение длины всех корней в каждом из планшетов

9.2.1.1 Методика для прямого визуального измерения

Одно проросшее семя переносят на лист черной бумаги.

С помощью щипчиков (6.11) корень вытягивают и измеряют его длину *LR* линейкой с точностью до миллиметра. Данные по всем корням фиксируют в протоколе результатов «Индивидуальные показатели».

Измеряют длину всех корней для всех семян в планшете (6.3) и во всех планшетах.

Аналогичную методику можно применять для измерения высоты ростка, и в этом случае может быть вычислено соотношение высоты ростка к длине корня.

9.2.1.2 Проведение анализа изображения для измерения длины

Запускают программу для анализа изображений, позволяющую осуществлять измерения длины.

Выбирают одно из изображений в файле с сохраненными фотографиями планшетов (6.3).

Единицу измерения для измерения длины корней, мм, калибруют в соответствии с указаниями программы для анализа изображений.

Осуществляют измерение длины *LR* всех корней проросших семян в планшетах (6.3.), каждое значение длины *LR* фиксируют в протоколе результатов «Индивидуальные показатели» (см. таблицу 1).

Данные операции повторяют для всех планшетов (6.3).

Таблица 1 — Протокол результатов «Индивидуальные показатели» (для каждого вида растений)

Номер семени	Контрольная почва 1	Исследуемая почва 1	Контрольная почва 2	Исследуемая почва 2	Контрольная почва 3	Исследуемая почва 3
1	*LR*1	*LR*1	*LR*1	*LR*1	*LR*1	*LR*1
2	*LR*2	*LR*2	*LR*2	*LR*2	*LR*2	*LR*2
3	*LR*3	*LR*3	*LR*3	*LR*3	*LR*3	*LR*3
4	*LR*4	*LR*4	*LR*4	*LR*4	*LR*4	*LR*4
5	*LR*5	*LR*5	*LR*5	*LR*5	*LR*5	*LR*5
6	*LR*6	*LR*6	*LR*6	*LR*6	*LR*6	*LR*6
7	*LR*7	*LR*7	*LR*7	*LR*7	*LR*7	*LR*7

Окончание таблицы 1

Номер семени	Контрольная почва 1	Исследуемая почва 1	Контрольная почва 2	Исследуемая почва 2	Контрольная почва 3	Исследуемая почва 3
8	*LR*8	*LR*8	*LR*8	*LR*8	*LR*8	*LR*8
9	*LR*9	*LR*9	*LR*9	*LR*9	*LR*9	*LR*9
10	*LR*10	*LR*10	*LR*10	*LR*10	*LR*10	*LR*10
Средняя длина корня в каждом планшете	M_{LR}	M_{LR}	M_{LR}	M_{LR}	M_{LR}	M_{LR}
Количество проросших семян в каждом планшете	N_s	N_s	N_s	N_s	N_s	N_s

9.2.2 Измерение длины самого длинного корня в каждом планшете

Можно сэкономить значительное количество времени при измерении только длины самого длинного корня *LLR* в каждом планшете вместо измерения длины всех корней.

Примечание — Международные межлабораторные сличения (см. раздел 11) показали, что данный метод, по существу, приводит к таким же результатам испытания, как и метод измерения всех корней в каждом планшете (см. приложение С).

Длины самых длинных корней *LLR* в каждом планшете (6.3) фиксируют в протоколе результатов «Самый длинный корень» (см. таблицу 2).

Таблица 2 — Протокол результатов «Самый длинный корень» (для каждого вида растений)

Длина самого длинного корня	Контрольная почва	Исследуемая почва
Планшет 1	*LLR*	*LLR*
Планшет 2	*LLR*	*LLR*
Планшет 3	*LLR*	*LLR*
Средняя длина самого длинного корня для трех планшетов-повторений	M_{LLR}	M_{LLR}

10 Вычисление процентного замедления

На основе данных, зафиксированных в протоколе результатов «Индивидуальные показатели», для каждого планшета (6.3) вычисляют следующие значения:

- среднее значение M_{LR} длины корней *LR*, число фиксируют в протоколе результатов «Индивидуальные показатели»;
- и/или среднее значение M_{LLR} длины самого длинного корня *LLR* (которое затем должно быть зафиксировано в протоколе результатов «Самый длинный корень»).

Затем вычисляют следующие показатели для каждого растения:

- среднее значение M_s для трех значений N_s;
- среднее значение MM_{LR} для трех значений M_{LR};

и фиксируют данные в протоколе результатов «Средние показатели» (см. таблицу 3).

Таблица 3 — Протокол результатов «Средние показатели» (для каждого вида растений)

	Контрольная почва	Исследуемая почва
Среднее количество проросших семян в трех планшетах-повторениях	M_s	M_s
Средняя длина корней в трех планшетах-повторениях	MM_{LR}	MM_{LR}

Вычисляют среднее значение M_{LLR} для всех трех значений *LLR* и фиксируют данные в протоколе результатов «Измерение самого длинного корня».

Вычисляют процентное замедление прорастания семян и роста корней для каждого растения по формуле

$$\frac{A-B}{A} \cdot 100, \quad (1)$$

где A — среднее значение всхожести семян M_s, или длины корней $MM_{LR,}$ или длины самого длинного корня M_{LLR} в контрольной почве;

B — среднее значение всхожести семян M_s, или длины корней $MM_{LR,}$ или длины самого длинного корня M_{LLR} в исследуемой почве.

Статистический анализ данных следует проводить в соответствии с указаниями, приведенными в ISO/TS 20281.

11 Контрольный препарат

Рекомендуется регулярно проводить тестирование с контрольным препаратом, для того чтобы продемонстрировать единообразие лабораторных условий испытаний. Борная кислота H_3BO_3 является одним из двух контрольных препаратов, использующихся в рамках стандартов ИСО для тестирования растений (ИСО 11269-1 и ИСО 11269-2), выбрана и для данного тестирования и использована в международном межлабораторном сличении (см. раздел 12 и приложение С).

12 Точность

В 2011 году 28 лабораторий из 12 стран приняли участие в международном межлабораторном сличении данного тестирования, проведя измерение среднего процентного показателя замедления роста средней длины корней (а также средней длины самого длинного корня) для испытания с использованием 250 мг борной кислоты на 1 кг контрольной почвы. Межлабораторное сличение показало, что при концентрации, соответствующей 250 мг борной кислоты на 1 кг контрольной почвы, замедления прорастания семян не происходит.

Результаты вычисления средней длины корней, средней длины самых длинных корней и процентных показателей воздействия, полученные участниками данного тестирования, приведены в обобщенном виде в приложении С.

В 2015 году восемь лабораторий из шести стран приняли участие в международном межлабораторном сличении данного тестирования, проведя измерение среднего процентного показателя замедления роста средней длины корней, а также средней длины самого длинного корня для испытания с использованием двух проб почв (почва 1 и почва 2) и одной пробы отходов (почва с отходами). Последняя проба на самом деле является смесью, состоящей из 75 % почвы LUFA и 25 % древесных опилок (сохраненные древесные отходы, загрязненные медью и другими тяжелыми металлами), так как изначальная проба оказалась крайне токсичной (100 % воздействия) для всех трех тест-растений. Для данного международного межлабораторного сличения в качестве негативного контроля (контрольная почва 2) выбрана почва LUFA 2.2.

Обобщенные результаты второго международного межлабораторного сличения также приведены в приложении С.

13 Критерии валидности

На основе международных межлабораторных сличений тестов на фитотоксичность, упомянутых в разделе 11, определены следующие критерии валидности:

- 70 % семян трех тестируемых видов должны прорасти в почве, использующейся в качестве негативного контроля по окончании трехдневного периода воздействия;
- средняя длина корней в почве, использующейся в качестве негативного контроля, должна составлять не менее 30 мм для трех тестируемых видов и 40 мм в том случае, если измерения производят на основе средней длины самого длинного корня.

14 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать следующую информацию:

a) ссылку на настоящий стандарт;

b) полное описание плана и процедур эксперимента;

c) данные о видах тест-растений (классификация Линнея, сорт, происхождение);

d) свойства исследуемой почвы (если уместно);

e) свойства исследуемого материала: компоста, ила, отходов (если уместно);

f) свойства контрольной почвы;

g) количество проросших семян каждого растения;

h) длину корней каждого растения и соответствующую среднюю длину;

i) в качестве альтернативы длину самого длинного корня каждого растения, если данный результат более предпочтителен, чем среднее значение длины корней каждого растения;

j) высоту ростка (если измеряется);

k) соотношение высоты ростка к длине корня (если измеряется высота ростка);

l) другие наблюдаемые эффекты;

m) результаты тестирования (в формате таблицы) для каждого тест-растения (указывают, является ли замедление роста статистически значимым или уровень значимости любого наблюдаемого замедления роста).

Приложение А
(справочное)

Проведение тестирования на фитотоксичность в прозрачных планшетах с природными и искусственными почвами и почвенными материалами, с различными видами растений

В таблице А.1 приведены обобщенные данные об основных параметрах 28 публикаций, в которых содержится описание тестирования на фитотоксичность в прозрачных планшетах для тестирования с различными видами природных и искусственных почв и почвенных материалов.

Номера в первой колонке таблицы соответствуют определенной публикации, полная ссылка на которую приведена в разделе «Библиография».

В других колонках таблицы содержатся краткая информация о типе субстрата (т. е. почвы или почвенного материала, используемого в исследовании), методе обработки, которому подвергался или не подвергался субстрат (например, впрыскивание химикатов либо смешивание с другими породами или отходами) и латинские названия видов растений, использовавшихся в конкретных исследованиях.

Таблица А.1 — Библиографические ссылки на применение теста на фитотоксичность

Ссылка	Тип субстрата	Метод обработки субстрата	Виды тест-растений
[9]	Искусственная почва (песок, вермикулит, торф)	Впрыскивание сульфаметазина	*Lupinus luteus, Pisum sativum, Lens esculenta, Glycine max, Vigna angularis, Medicago sativa*
[10]	Загрязненные почвы (пестициды)	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[11]	Референтная почва ОЭСР	Впрыскивание обработанных сточных вод, взятых на водоочистных заводах	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[12]	Природные легкие и тяжелые почвы (тощая глина, суглинок и илистая глина)	Нет	*Zea mays*
[13]	Зольная пыль от сжигания горючих сланцев	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[14]	Торф	Впрыскивание трихлоруксусной кислоты	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[15]	Компост (кора)	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[16]	Речные отложения	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[17]	Речные отложения	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[18]	Референтная почва ОЭСР. Речной песок	Впрыскивание сульфата кадмия и сульфата цинка	*Brassica napus, Sinapis alba, Spinacia oleracea*
[19]	Речные отложения. Природная почва	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[20]	Загрязненные отложения (загрязнение в результате горнорудных работ)	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[21]	Загрязненные почвы (загрязнение металлами)	Электрокинетическая очистка от металлов	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*

Окончание таблицы А.1

Ссылка	Тип субстрата	Метод обработки субстрата	Виды тест растений
[22]	Загрязненные отложения (загрязнение органическими соединениями и тяжелыми металлами)	Впрыскивание адсорбентов	*Lepidium sativum*
[23]	Загрязненные почвы (загрязнение металлами)	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[24]	Загрязненные отложения (загрязнение в результате горнорудных работ)	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[25]	Компост (из осадков сточных вод)	Смешивание со стандартной почвой ОЭСР	*Lepidium sativum*
[26]	Загрязненные почвы (загрязнение полициклическими ароматическими углеводородами)	Нет	*Lepidium sativum*
[27]	Природные почвы (песочные или суглинистые)	Добавление осадка сточных вод	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[28]	Смеси осадков сточных вод и зольной пыли	Различные соотношения осадка сточных вод и зольной пыли	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[29]	Твердые отходы	Нет	*Avena sativa, Brassica rapa*
[30]	Загрязненные почвы (загрязнение тяжелыми металлами)	Нет	*Lepidium sativum*
[31]	Природные почвы (песок, торф, глина)	Добавление осадка сточных вод	*Zea mays*
[32]	Осадок сточных вод	Добавление зольной пыли вручную/на извести	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[33]	Природная почва	Впрыскивание гербицидов	*Sinapis alba, Fagopyrum esculentum, Cucumis sativus*
[34]	Природная почва	Впрыскивание гербицидов	*Helianthus annuus, Cucumis sativus, Fagopyrum esculentum*
[35]	Загрязненные речные отложения	Нет	*Sinapis alba*
[36]	Искусственная почва	Впрыскивание борной кислоты	*Trifolium pratense*
	Загрязненная суглинистая почва	Нет	*Hordeum vulgare, Elymus lanceolatus, Medicago sativa, Cucumis sativus, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[36]	Твердые отходы	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[37]	Природные почвы	Впрыскивание дизельного топлива	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*
[38]	Субстраты на основе древесины	Нет	*Lepidium sativum, Sinapis alba, Sorghum saccharatum*

Приложение В
(справочное)

Сборка планшетов для тестирования на фитотоксичность

В.1 Общие положения

Планшеты для тестирования на фитотоксичность могут быть изготовлены вручную и любого размера.

Размеры материалов, приведенные ниже, определены для планшетов, в которых 90 $см^3$ (увлажненной) почвы помещается во вторую камеру нижней части планшета [как описано в процедуре (раздел 8) данного тестирования].

В.2 Необходимые материалы

Потребуются следующие материалы:

- два прямоугольных отрезка прозрачного листа ПВХ (или толстой кальки) длиной 193 мм и шириной 140 мм;
- три квадратные пластиковые или деревянные полоски толщиной 8 мм и длиной 124 мм;
- две квадратные пластиковые или деревянные полоски толщиной 8 мм и длиной 193 мм;
- один тюбик клея, предназначенного для приклеивания пластика или дерева к ПВХ.

В.3 Процедура сборки планшета для тестирования

Тонкий слой клея наносят на всю длину двух длинных полосок и двух коротких полосок с одной стороны.

Данные полоски помещают и приклеивают к внешним сторонам одного из листов ПВХ, для того чтобы получить прямоугольное внутреннее отделение размером 178×124×8 мм.

Тонкий слой клея наносят на всю длину третьей короткой полоски с одной стороны и помещают и приклеивают данную полоску поперек, точно посередине планшета для тестирования, для того чтобы разделить его на две камеры одинакового размера.

После высыхания клея нижняя камера планшета может быть заполнена 90 $см^3$ (увлажненной) почвы.

Дальнейшая процедура, т. е. размещение черной фильтровальной бумаги и семян, аналогична процедуре, приведенной в описании тестирования на фитотоксичность.

Планшет закрывают, размещая второй лист ПВХ поверх нижнего отделения, и удерживают плотно закрытым с помощью двух (тонких) эластичных резинок, которыми скрепляют планшет сверху и снизу.

Приложение С
(справочное)

Международные межлабораторные сличения тестов на фитотоксичность

В 2011 году 28 лабораторий из 12 стран приняли участие в международном межлабораторном сличении данного тестирования, проведя измерение среднего процентного показателя замедления роста средней длины корней (а также средней длины самого длинного корня) для испытания с использованием 250 мг борной кислоты (борная кислота) на 1 кг контрольной почвы. Искусственная почва (5.3) использована в качестве негативного контроля (контрольная почва 1).

В 2015 году восемь лабораторий из шести стран приняли участие в международном межлабораторном сличении данного тестирования, проведя измерение среднего процентного показателя замедления роста средней длины корней, а также средней длины самого длинного корня для испытания с использованием двух проб загрязненных природных почв (почва 1 и почва 2) и одной пробы отходов (почва с отходами). Последняя проба представляла собой древесные отходы, которые оказались настолько токсичными, что семена ни одного из трех видов тест-растений не взошли. Вследствие этого принято решение смешать его со стандартной почвой LUFA 2.2, которая выбрана в качестве негативного контроля (контрольная почва 2) для данного межлабораторного сличения. В итоге для кольцевого тестирования изготовлена смесь, состоящая на 75 % из почвы LUFA и на 25 % из отходов, которая обозначена как почва с отходами.

Свойства и состав проб двух загрязненных природных почв и отходов приведены в ссылочных материалах [40]—[42], а данные по стандартной почве LUFA 2.2 — в таблице данных стандартных почв Сельскохозяйственного научно-исследовательского института (LUFA) Шпейера, Германия.

Критерии валидности установлены на основе результатов первого международного межлабораторного сличения. Следовательно, для данного сличения результаты 28 участников подвергнуты статистическому анализу для выявления выбросов и вычисления общего среднего X отклонений повторяемости и воспроизводимости s_r и s_R, в соответствии с ИСО 5725-2.

Для второго международного межлабораторного сличения применены установленные критерии валидности. Восемь лабораторий выполнили данные критерии для *Lepidium sativum* и *Sinapis alba*, но одна лаборатория не выполнила два критерия для *Sorghum saccharatum*. Таким образом, получено восемь достоверных результатов для двудольных видов и семь результатов для однодольных видов. Настоящие данные также подвергнуты статистическому анализу в соответствии с ИСО 5725-2.

Обобщенные результаты двух международных межлабораторных сличений приведены в таблицах С.1—С.3.

В рамках обоих сличений, учитывая валидные результаты, высокий процент всхожести получен всеми участниками для трех тестируемых видов как в контрольных планшетах, так и в планшетах с пробами (борная кислота, почва 1, почва 2 и почва с отходами).

В ходе второго международного межлабораторного сличения почва 1 не продемонстрировала токсичности ни для двух двудольных, ни для одного однодольного вида тест-растений; почва 2, в свою очередь, оказала значительное воздействие как на замедление роста корней, так и на длину самого длинного корня трех видов растений; почва с отходами определена как нетоксичная для *Lepidium sativum*, однако оказала легкое (но значимое) токсичное воздействие на рост корней *Sinapis alba* и легкое (но статистически незначимое) воздействие на длину корней *Sorghum saccharatum*.

Таблицы С.4 и С.5 содержат процентные показатели воздействия для борной кислоты (первое сличение), почвы 2 и почвы с отходами (второе сличение).

Процентные показатели повторяемости и воспроизводимости средней длины корней и средней длины самого длинного корня являются достаточно низкими (по большей части менее 20 %) и, таким образом, весьма удовлетворительными.

Кроме того, второе межлабораторное сличение также подтверждает выводы первого кольцевого тестирования, а именно вывод о том, что на основе измерения длины самого длинного корня из трех планшетов-повторений получены результаты, аналогичные результатам измерения длины всех корней в каждом планшете: в рамках первого международного межлабораторного сличения благодаря коэффициенту определения для корреляции между средней длиной корня и длиной самого длинного корня, основанному на исследовании 51 пары данных, объясняется 93 % изменчивости данных; в рамках второго международного межлабораторного сличения, охватывающего 25 пар данных, — 88 % изменчивости данных.

Измерение только самого длинного корня вместо измерения всех корней в качестве критерия воздействия в действительности значительно экономит время.

И наконец, второе кольцевое тестирование показало, что критерий валидности, приведенный в предложении ISO/DIS, а именно 70 % прорастание семян, а также минимальная длина корней 30 и 40 мм для самых длинных корней в контрольных пробах являются значимыми критериями приемлемости данного тестирования на фитотоксичность.

Таблица С.1 — Результаты межлабораторных тестов: среднее количество проросших семян

	N	n_o	X	s_r	CV_r	S_R	CV_R
Lepidium sativum							
Контрольная почва 1	26	2	9,2	0,8	8,5	0,8	8,9
Борная кислота	27	1	9,4	0,6	6,8	0,7	7,8
Контрольная почва 2	8	0	9,4	0,7	7,9	0,7	7,9
Почва 1	5	3[a]	9,9	0,4	3,7	0,4	3,7
Почва 2	7	1	9,7	0,4	4,5	0,5	5,0
Почва с отходами	7	1	9,9	0,4	3,8	0,4	3,8
Sinapis alba							
Контрольная почва 1	26	2	9,4	0,7	7,9	0,8	8,5
Борная кислота	23	5	9,6	0,5	4,9	0,6	6,1
Контрольная почва 2	8	0	9,5	0,7	7,2	0,7	7,2
Почва 1	6	2	9,7	0,7	6,9	0,7	6,9
Почва 2	8	0	9,4	0,8	8,1	0,8	8,1
Почва с отходами	6	2	9,4	0,5	5,6	0,7	7,6
Sorghum saccharatum							
Контрольная почва 1	25	3	9,2	0,7	7,6	0,8	8,3
Борная кислота	25	3	9,0	0,8	8,7	0,8	8,8
Контрольная почва 2	7	0	8,5	1,2	13,5	1,2	13,5
Почва 1	6	1	8,4	1,2	14,2	1,2	14,2
Почва 2	6	1	8,3	1,5	18,3	1,5	18,3
Почва с отходами	7	0	8,4	1,1	13,0	1,4	17,0

N — количество лабораторий после исключения выбросов.

n_o — количество выбросов.

X — среднее количество проросших семян.

s_r — стандартное отклонение повторяемости.

CV_r — вариационный коэффициент повторяемости, %.

S_R — стандартное отклонение воспроизводимости.

CV_R — вариационный коэффициент воспроизводимости, %.

[a] Данный показатель является статистическим артефактом, не имеющим практической значимости. В действительности среднее количество проросших семян для восьми лабораторий (включая статистические выбросы) составляет 9,4, как и для контрольной почвы 2.

Таблица С.2 — Результаты межлабораторных тестов: средняя длина корней

	N	n_o	X	s_r	CV_r	S_R	CV_R
Lepidium sativum							
Контрольная почва 1	28	0	51,0	5,8	11,3	8,3	16,3
Борная кислота	27	1	27,7	3,3	11,9	4,7	17,1
Контрольная почва 2	8	0	56,2	3,6	6,3	5,8	10,2

Окончание таблицы С.2

	N	n_o	X	s_r	CV_r	S_R	CV_R
Почва 1	8	0	57,7	3,3	5,7	8,1	14,0
Почва 2	7	1	33,6	2,4	7,1	3,7	11,1
Почва с отходами	8	0	53,9	4,1	7,6	4,8	8,9
Sinapis alba							
Контрольная почва 1	26	2	50,4	5,1	10,1	9,3	18,4
Борная кислота	27	1	28,2	3,4	12,1	5,6	19,8
Контрольная почва 2	8	0	59,5	7,3	12,2	9,9	16,6
Почва 1	8	0	60,9	5,8	9,5	9,8	16,2
Почва 2	7	1	33,6	4,1	12,1	4,8	14,3
Почва с отходами	8	0	47,0	5,8	12,2	8,0	17,0
Sorghum saccharatum							
Контрольная почва 1	28	0	47,7	7,2	15,2	14,7	30,7
Борная кислота	25	3	32,4	2,9	8,8	6,7	20,6
Контрольная почва 2	7	0	33,2	4,5	13,5	4,5	13,5
Почва 1	6	1	33,2	3,3	10,0	4,9	14,7
Почва 2	7	0	21,9	4,7	21,6	5,8	26,5
Почва с отходами	7	0	26,5	4,1	15,6	8,0	30,3

N — количество лабораторий после исключения выбросов.

n_o — количество выбросов.

X — средняя длина корня, в мм.

s_r — стандартное отклонение повторяемости.

CV_r — вариационный коэффициент повторяемости, %.

S_R — стандартное отклонение воспроизводимости.

CV_R — вариационный коэффициент воспроизводимости, %.

Таблица С.3 — Результаты межлабораторных тестов: средняя длина самых длинных корней

	N	n_o	X	s_r	CV_r	S_R	CV_R
Lepidium sativum							
Контрольная почва 1	27	1	65,0	4,9	7,6	8,8	12,6
Борная кислота	27	1	38,3	4,1	10,6	4,9	12,8
Контрольная почва 2	8	0	71,8	4,1	5,7	6,1	8,4
Почва 1	7	1	75,3	3,2	4,2	7,6	10,1
Почва 2	8	0	38,0	3,5	9,2	9,7	25,6
Почва с отходами	8	0	67,8	3,6	5,3	4,9	7,3
Sinapis alba							
Контрольная почва 1	27	1	78,6	9,3	11,9	19,6	25,0
Борная кислота	26	2	46,1	4,1	8,8	8,3	17,9

Окончание таблицы С.3

	N	n_o	X	s_r	CV_r	S_R	CV_R
Контрольная почва 2	8	0	82,5	4,2	5,1	7,3	8,9
Почва 1	7	1	80,3	4,6	5,8	8,2	10,3
Почва 2	6	2	45,7	4,2	9,1	4,2	9,1
Почва с отходами	8	0	71,0	6,1	8,6	6,1	8,6
Sorghum saccharatum							
Контрольная почва 1	27	1	78,6	9,3	11,9	19,6	25,0
Борная кислота	26	2	46,1	4,1	8,8	8,3	17,9
Контрольная почва 2	6	1	49,5	6,9	14,0	7,4	14,9
Почва 1	6	1	53,7	6,6	12,3	12,2	22,8
Почва 2	7	0	31,5	5,7	18,1	9,0	28,6
Почва с отходами	6	1	47,2	5,7	12,0	11,2	23,7

N — количество лабораторий после исключения выбросов.
n_o — количество выбросов.
X — средняя длина самого длинного корня, в мм.
s_r — стандартное отклонение повторяемости.
CV_r — вариационный коэффициент повторяемости, %.
S_R — стандартное отклонение воспроизводимости.
CV_R — вариационный коэффициент воспроизводимости, %.

Таблица С.4 — Результаты межлабораторных тестов: процентный показатель воздействия на среднюю длину корня

	N	n_o	X	s_r	CV_r	S_R	CV_R
Lepidium sativum							
Борная кислота	27	1	45,0	6,7	14,8	8,6	19,1
Почва 2	7	1	38,7	4,3	11,0	9,6	24,8
Sinapis alba							
Борная кислота	27	1	43,8	6,9	15,8	11,1	25,3
Почва 2	7	1	43,8	6,9	15,8	8,1	18,4
Почва с отходами	8	0	23,3	9,4	40,3	12,0	51,5
Sorghum saccharatum							
Борная кислота	25	3	30,5	5,8	18,9	10,8	35,4
Почва 2	7	0	34,2	14,2	41,5	17,1	50,0

N — количество лабораторий после исключения выбросов.
n_o — количество выбросов.
X — средний показатель воздействия на среднюю длину корней, %.
s_r — стандартное отклонение повторяемости.
CV_r — вариационный коэффициент повторяемости, %.
S_R — стандартное отклонение воспроизводимости.
CV_R — вариационный коэффициент воспроизводимости, %.

Таблица С.5 — Результаты межлабораторных тестов: процентный показатель воздействия на длину самого длинного корня

	N	n_o	X	s_r	CV_r	S_R	CV_R
Lepidium sativum							
Борная кислота	28	0	41,8	6,0	14,4	7,4	16,6
Почва 2	8	0	42,9	4,2	9,7	8,4	19,7
Sinapis alba							
Борная кислота	27	1	44,4	6,4	14,5	8,2	18,6
Почва 2	7	1	45,1	5,2	11,4	5,7	12,8
Sorghum saccharatum							
Борная кислота	27	1	41,2	5,3	12,9	7,5	18,1
Почва 2	7	0	37,9	11,4	30,0	19,1	50,3

N — количество лабораторий после исключения выбросов.

n_o — количество выбросов.

X — средний показатель воздействия на длину самого длинного корня, %.

s_r — стандартное отклонение повторяемости.

CV_r — вариационный коэффициент повторяемости, %.

S_R — стандартное отклонение воспроизводимости.

CV_R — вариационный коэффициент воспроизводимости, %.

Подробные отчеты о двух межлабораторных сравнительных испытаниях тестов на фитотоксичность приведены в [44].

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 11269-1	—	*
ISO 11269-2	—	*
ISO/TS 20281	—	*
* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта.		

Библиография

[1] Kuhnt G., Muntau H. (Eds.) (1994). EURO-Soils: Identification, collection, treatment, characterization//European Commission, Special Publication № 1.94.60, Ispra, Italy. P. 31—40

[2] Наземные растения: тест на всхожесть семян и рост проростков (2006) //Руководящие принципы ОЭСР по тестированию химикатов № 208

[3] ISO 17512-2, Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 2: Test with collembolans (Folsomia candida) [Качество почвы. Испытание на избегание при определении качества почвы и воздействии химикатов на поведение организмов. Часть 2. Испытание с использованием ногохвосток (Folsomia Candida)]

[4] ISO 17126:2005, Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Screening test for emergence of lettuce seedlings (Lactuca sativa L.) [Качество почвы. Определение воздействия загрязнений на почвенную флору. Отбраковочные испытания на выход сеянцев латука (Lactuca sativa L.)]

[5] ISO 22241-1, Diesel engines — NOx reduction agent AUS 32 — Part 1: Quality requirements (Двигатели дизельные. Восстановитель оксидов азота AUS32. Часть 1. Требования к качеству)

[6] ISO 11074:2015, Soil quality — Vocabulary (Качество почвы. Словарь)

[7] ISO 11274, Soil quality — Determination of the water-retention characteristic — Laboratory methods (Качество почвы. Определение водоудерживающей способности. Лабораторные методы)

[8] ISO 10993-10:2010, Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for irritation and skin sensitization (Биологическая оценка медицинских изделий. Часть 10. Пробы на раздражение и аллергическую реакцию кожи)

[9] Adomas B., Piotrowicz-Cieslak A.I. (2008). Yellow lupin is a good bioindicator of soil contamination with Sulfamethazine// *Lupins for health and wealth — Proceedings of the 12th International Lupin Conference* (Palta J.A., Berger J.B., eds). International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. P. 362–367

[10] Banszkiewicz T., Szarek J., Wysocki K. (2011). Biological evaluation of soil contamination around a non-operating pesticide tomb//*Pol. J. Environ. Stud.* № 20(2). P. 485–488

[11] Bakopoulos S., Emmanouil C., Kungolos A. (2011). Assessment of wastewater effluent quality in Thessaly region, Greece, for determining its irrigation reuse potential//*Ecotoxicol. Environ. Saf.* № 74(2). P. 188–194

[12] Baran A. (2013) Assessment of *Zea mays* sensitivity to toxic content of zinc in soil//*Pol. J. Environ. Stud.* № 22(1). P. 77—83

[13] Blinova I., Bityukova L., Kasemets K., Ivask A., Kakinen A., Kurvet I. (2012). Environmental hazard of oil shale combustion fly ash//*J. Hazard. Mater.* № 229—230. P. 192—200

[14] Blok C., Aguilera E.A., Van Os E.A. (2007). Validation of a new phytotoxicity test (Phytotoxkit) against an established four-week growing test with pre-grown plant plugs//*ISHS Acta Horticulturae*. № 819. P. 209—214

[15] Blok C., Persoone G., Wever G. (2008). A practical and low cost microbiotest to assess the phytotoxic potential of growing media and soil//*ISHS Acta Horticulturae*. № 779. P. 367—374

[16] Czerniawska-Kusza I., Ciesielczuk T., Kusza G., Cıchon A. (2006). Comparison of the phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments //*Environ. Toxicol.* № 21(4). P. 367—372

[17] Czerniawska-Kusza I., Kusza G. (2011). The potential of the phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems//*Environ. Monit. Assess.* № 179. P.113—121

[18] Cojocaru P. (2013). Phytotoxicity of cadmium and zinc on *Brassica napus, Sinapis alba* and *Spinacia oleracea* using two soil types//13th SGEM GeoConference on Water Resources. Forest, Marine and Ocean Ecosystems — Conference Proceedings. P. 619—626

[19] Drobniewska A., Sumorok B., Nalecz-Jawecki G., Sawicki J. (2007). Toxicity assessment of sediments and soil from rivers and floodplains in Central Poland using a battery of microbiotests — A case study//*Fresenius Environmental Bulletin*. № 2. P. 109

[20] Garcia-Lorenzo M.L., Martinez-Sanchez M.J., Molina J., Hernandez-Cordoba M. (2010). Phytotoxkit and Ostracodtoxkit tests for assessing the toxicity of sediment samples with high concentrations of heavy metals//*Geophys. Res. Abstr.* P. 12

[21] Giannis A., Nikolaou A., Pentari D., Gidarakos E. (2009). Chelating agent-assisted electrokinetic removal of cadmium, lead and copper from contaminated soils//*Environ. Pollut*. № 157(12). P. 3379—3386

[22] Josko I., Oleszczuk P., Pranagal J., Lehmann J., Xing B., Cornelissen G. (2013). Effect of biochars, activated carbon and multiwalled carbon nanotubes on phytotoxicity of sediment contaminated by inorganic and organic pollutants// *Ecol. Eng.* № 60. P. 50—59

[23] Maisto G., Manzo S., De Nicola E., Carotenuto R., Rocco A., Alfani A. (2011). Assessment of the effects of Cr, Cu, Ni and Pb soil contamination by ecotoxicological effects//*J. Environ. Monit.* № 13(11). P. 3049—3056

[24] Martinez-Sanchez M.J., Garcia-Lorenzo M.L., Perez-Sirvent C., Molina J., Tudela M.L., Hernandez-Cordoba M. (2010). Use of bioassay test for the environmental evaluation of mining residues and their leachates: the singular case of the Portman Bay (SE, Spain)//*Geophys. Res. Abstr.* P. 12

[25] Oleszczuk P. (2008). The toxicity of composts from sewage sludges evaluated by the direct contact tests Phytotoxkit and Ostracodtoxkit//*Waste Manag.* № 28(9). P. 1645—1653

[26] Oleszczuk P., Josko I., Kushmierz M., Futa B., Wielgosz E., Ligeza S., Pranagal J. (2014). Microbiological, biochemical and ecotoxicological evaluation of soils in the area of biochar production in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon content//*Geoderma*. № 213. P. 502—511

[27] Oleszczuk P., Malara A., Josko I., Lesiuk A. (2012). The phytotoxicity changes of sewage sludge-amended soils// *Water Air Soil Pollut.* № 223(8). P. 4937—4948

[28] Papadimitriou C.A., Haritou I., Samaras P., Zouboulis A.I. (2008). Evaluation of leaching and ecotoxicological properties of sewage sludge-fly ash mixtures//*Environ. Res.* № 106(3). P. 340—348

[29] Persoone G., Wadhia K. (2008). Comparison between Toxkit microbiotests and standard tests//*Ecotoxicological Characterization of Waste. Results and Experiences of an International Ring Test* (Moser H., & Rombke J. eds.). Springer Ltd, New York. P. 213—21

[30] Plaza G.A., Lukasik W., Nalecz-Jawecki G., Margesin R. (2009). Application of the root elongation test as indicator to assess phytotoxicity of contaminated soils//*Fresenius Environmental Bulletin*. № 18(3). P. 353—359

[31] Romanowska-Duda Z.B., Grzesik M., Kalaji H. (2010). Phytotoxkit test in growth assessment of corn as an energy plant fertilized with sewage sludge//*Environment Protection Engineering*. № 36(1). P. 73—81

[32] Samaras P., Papadimitriou C.A., Haritou I., Zouboulis A.I. (2008). Investigation of sewage sludge stabilization potential by the addition of fly ash and lime//*J. Hazard. Mater.* № 154 (1-3). P.1052—1059

[33] Sekutowski T., Sadowski J. (2009). Phytotoxkit microbiotest used in detecting herbicide residue in soil//*Environment Protection Engineering*. № 35(1). P. 105—110

[34] Sekutowski T. (2011). Application of bioassays in studies on phytotoxic herbicide residues in the soil environment// *Herbicides and Environment. Tech Publisher* (Kortekamp A. ed.). P. 253—272

[35] Sestinova O., Findorakova L., Hanculak J. (2012). Toxicity testing of sediments//*Nova Biotechnologia et Chimica*. № 11(2). P. 111—116

[36] Van Der Vliet L., Velicogna J., Princz J., Scroggins R. (2012). Phytotoxkit: a critical look at a rapid assessment tool// *Environ. Toxicol. Chem.* № 31(2). P. 316—323

[37] Wadhia K., Persoone G. (2009). Toxkit tests//*Ecotoxicological Characterization of Waste. Results and Experiences of an International Ring Test*, (Moser H., & Rombke J. eds.). Springer Ltd, New York. P. 145—452

[38] Wieczorek D., Kwapisz E., Marchut-Mikolajczyk O., Bielecki S. (2012). Phytotests as tools for monitoring the bioremediation process of soil contaminated with diesel oil//*Biotechnologia*. № 93(4). P. 431—439

[39] Witcher A.L., Blythe E.K., Fain G.B., Curry K.J., Pounders C.T. (2011). Assessing phytotoxicity in fresh and aged whole pine tree substrates//*Combined Proceedings. International Propagators Society*. № 61. P. 477—482

[40] Rombke J., Moser T.H., Neumann-Hensel H., Ketelhut R. (2010). Identifikation umweltgefahrlicher Abfalle in Spiegeleintragen der AVV//Bericht fur das Umweltbundesamt, FKZ 3708-31 300. 124 S

[41] Rombke J., Eisentrager A., Hund-Rinke K., Jansch S., Neumann-Hensel H., Schallnass H-J. (2006). Erprobung und Vorbereitung einer praktischen Nutzung okotoxikologischer Testsysteme. SIDuS-Verlag, Limburg. 372 S

[42] Moser H., & Rombke J. *Ecotoxicological characterisation of waste — Results and experiences of an European ring test*. Springer Ltd, New York., 2009, p.

[43] Baudo R. *Report on the International interlaboratory comparison on the Phytotoxkit*. Section Reports, 2012, p.

[44] Baudo R. *Report on the International interlaboratory comparison on the Phytotoxkit on soils*. 2015, p. available (2016-06-01) at: http://www.microbiotests.be/information/reports/

[45] ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method [Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения]

УДК 631.453:006.86 ОКС 13.080.30

Ключевые слова: качество почвы, токсическое воздействие, загрязняющие вещества, всхожесть, семена, ранние стадии высших растений

БЗ 8—2019/56

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 14.08.2019. Подписано в печать 28.08.2019. Формат 60×84¼. Гарнитура Ариал
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,80.

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.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru