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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33640— 2015

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Испытание токсичности на водных червях с использованием обогащенного осадка

**OECD, Test No. 225:2007
(MOD)**

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт стандартизации материалов и технологий» (ФГУП «ВНИИ СМТ»)

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

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

За принятие стандарта проголосовали:

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 ноября 2015 г. № 1862-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33640—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 сентября 2016 г.

5 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному документу OECD, Test No. 225:2007 Sediment-Water *Lumbriculus* Toxicity Test Using Spiked Sediment (ОЭСР, Тест № 225:2007 Испытание токсичности на водных червях с использованием обогащенного осадка).

Сравнение структуры международного документа со структурой настоящего стандарта приведено в приложении ДА.

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия — модифицированная (MOD)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Предварительные условия и информация об испытуемом веществе 2
4 Принцип метода 2
5 Стандартное испытание 3
6 Достоверность испытания 3
7 Описание метода 3
7.1 Тест-система 3
7.2 Испытуемые сосуды и оборудование 3
7.3 Тестовые виды 4
7.4 Культивирование тестовых организмов 4
7.5 Вода 4
7.6 Осадок 4
7.7 Внесение испытуемого вещества 5
8 Проведение испытания 6
8.1 Предварительное испытание 6
8.2 Конечное испытание 7
8.3 Дизайн испытания 7
8.4 Условия воздействия 8
8.5 Измерения качества воды 8
8.6 Биологические наблюдения 9
8.7 Проверка концентрации испытуемого вещества 10
9 Данные и отчет о проведении испытания 11
9.1 Обработка результатов 11
9.2 Интерпретация результатов 12
9.3 Отчет о проведении испытания 12
Приложение А (рекомендуемое) Состав восстановленной воды 14
Приложение Б (рекомендуемое) Физико-химические характеристики приемлемой воды для растворения 15
Приложение В (рекомендуемое) Руководство по приготовлению и хранению искусственного осадка 16
Приложение Г (рекомендуемое) Метод культивирования *Lumbriculus variegatus* 17
Приложение Д (рекомендуемое) Краткий отчет о результатах кольцевого испытания на токсичность осадка для *Lumbriculus variegatus* 19
Приложение ДА (справочное) Сравнение структуры международного документа со структурой настоящего стандарта 21
Библиография 25

Введение

Питающиеся осадком эндодонные организмы потенциально подвергаются сильному воздействию связанных с осадком веществ, и поэтому им следует уделять преимущественное внимание, например [1]–[3]. Среди питающихся осадком водные олигохеты играют важную роль в донных отложениях водных систем. По биотурбации осадка и, выступая в качестве добычи, эти животные могут оказывать сильное влияние на биодоступность этих веществ для других организмов, например benthivorous (донных, придонных и придонно-пелагических) рыб. В отличие от эпидонных организмов, эндодонные водные олигохеты (например, *Lumbriculus variegatus*) зарываются в осадок и заглатывают частицы осадка ниже его поверхности. Это гарантирует воздействие испытуемого вещества на тестовые организмы посредством всех возможных путей поглощения (например, при контактировании и употреблении в пищу загрязненных частиц осадка, а также через поровую воду и надосадочную воду).

Настоящий стандарт основан на существующих протоколах испытаний токсичности осадка и биоаккумуляции, например [3]–[10]. Метод описан в статических условиях испытания. Принципом воздействия, используемым в данном стандарте, является обогащение осадка испытуемым веществом. Использование обогащенного осадка предназначено для имитации осадка с примесью испытуемого соединения.

Вещества, которые должны быть проверены в отношении воздействия на обитающие в осадке организмы, обычно сохраняются в данном осадке в течение длительного периода времени. Обитающие в осадке организмы могут подвергаться воздействию несколькими путями. Относительное значение каждого пути воздействия, а также время, необходимое для каждого из них для достижения общих токсических эффектов, зависит от физико-химических свойств химического вещества и его дальнейшего метаболического пути в организме животного. Для веществ с высокой адсорбцией (например, с $\log K_{ow} > 5$) или для веществ, ковалентно связывающихся с осадком, поглощение организмами загрязненного корма может быть основным путем воздействия. Для предупреждения недооценки токсичности высоколипофильных соединений корм добавляется до применения испытуемого вещества [11]. Метод описан достаточно подробно, чтобы можно было провести испытание, однако допускается адаптация экспериментального дизайна в зависимости от условий конкретных лабораторий и разнообразных характеристик испытуемых веществ.

Руководство ОЭСР № 218 «Испытание токсичности на хирономидах с использованием обогащенного осадка» [6] предоставляет многие важные и полезные сведения для выполнения приведенного метода испытания токсичности осадка. Таким образом, этот документ служит основой, на которой были разработаны изменения, необходимые для проведения испытаний токсичность осадка с *Lumbriculus variegatus*. Другими документами, на которые имеются ссылки, являются например, стандарт ASTM для определения биоаккумуляции осадка, связанного с загрязняющими веществами, донными беспозвоночными [3], методы охраны окружающей среды США для измерения токсичности и биоаккумуляции осадка, связанного с загрязняющими веществами, пресноводными беспозвоночными [7], а также стандарт ASTM для отбора, хранения, характеристики и обращения с осадками для токсикологических испытаний и для отбора образцов, используемых для сбора донных беспозвоночных [12]. Кроме того, практический опыт, полученный в ходе кольцевого метода испытания ([13], отчет по испытанию с использованием кольцевого метода) и литературные сведения являются основными источниками информации для составления настоящего стандарта.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Испытание токсичности на водных червях с использованием обогащенного осадка

Testing of chemicals of environmental hazard.
Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment

Дата введения — 2016—09—01

1 Область применения

1.1 Настоящий стандарт предназначен для проведения испытания по оценке последствий длительного воздействия на эндодонные олигохеты *Lumbriculus variegatus* (Müller, 1774) связанных с осадком химических веществ.

1.2 Целью метода испытаний является определение воздействия испытуемого вещества на репродукцию и биомассу тестовых организмов. Измеряемыми биологическими показателями являются общее число выживших червей и биомасса (сухая масса) в конце воздействия. Эти данные анализируются либо с помощью регрессионной модели для установления концентрации, которая может вызвать *x*%-ный эффект (например, EC_{50}, EC_{25} и EC_{10}), или с помощью статистической проверки гипотез для определения неэффективной наблюдаемой концентрации (NOEC) и наименьшей наблюдаемой эффективной концентрации (LOEC).

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями:

2.1 **коэффициент распределения органический углерод-вода** (organic carbon-water partitioning coefficient; K_{oc}): Отношение концентрации вещества в/на фракции органического углерода в почве и концентрации вещества в воде в состоянии равновесия.

2.2 **коэффициент распределения октанол-вода** (octanol-water partitioning coefficient; K_{ow}): Отношение растворимости вещества в *н*-октаноле и воде при равновесии; также иногда выражается как P_{ow}. Логарифм K_{ow} (log Kow) используется в качестве показателя потенциальной способности вещества к биоаккумуляции в водных организмах.

2.3 **период кондиционирования** (conditioning period): Период времени, используемый для стабилизации микробных компонентов осадка и удаления, например, аммиака, образующегося из компонентов осадка; данный период имеет место до обогащения осадка испытуемым веществом. Как правило, надосадочная вода удаляется после кондиционирования.

2.4 **период равновесия** (equilibration period): Период времени, используемый для обеспечения распределения испытуемого вещества между твердой фазой, поровой водой и надосадочной водой; имеет место после обогащения осадка испытуемым веществом и перед добавлением тестовых организмов.

2.5 **фаза воздействие** (exposure phase): Время, в течение которого тестовые организмы подвергаются воздействию испытуемого вещества.

2.6 **искусственный осадок** (formulated sediment): Смесь веществ, использованных для имитации физических компонентов природного осадка.

Издание официальное

2.7 **обогащенный осадок** (spiked sediment): Осадок, в который добавлено испытуемое вещество.

2.8 **надосадочная вода** (overlying water): Вода, находящаяся над осадком в испытуемом сосуде.

2.9 **поровая вода или интерстициальная вода** (pore water): Вода, занимающая пространство между осадком и частицами почвы.

2.10 **EC_x:** Концентрация испытуемого вещества в осадке, приводящая к *x* %-ному эффекту (например, 50 %) на биологические показатели в течение указанного периода воздействия.

2.11 **наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация** (lowest Observed Effect Concentration; LOEC): Самая низкая испытуемая концентрация испытуемого вещества, при которой наблюдается значительное токсическое действие(при $p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. Тем не менее все испытуемые концентрации выше LOEC должны оказывать равный или больший эффект, чем наблюдаемые при LOEC. Если эти два условия не могут быть выполнены, то должно быть предоставлено исчерпывающее обоснование, каким образом была выбрана LOEC (и, следовательно, NOEC).

2.12 **неэффективная наблюдаемая концентрация** (No Observed Effect Concentration; NOEC): Испытуемая концентрация непосредственно ниже LOEC, которая по сравнению с контролем не имеет статистически значимого эффекта ($p \leq 0,05$) в течение определенного периода воздействия.

3 Предварительные условия и информация об испытуемом веществе

3.1 Информация об испытуемом веществе, такая как меры безопасности, надлежащие условия хранения и аналитические методы, должна быть получена до начала испытания. Руководство по испытанию веществ с физико-химическими свойствами, затрудняющими выполнение испытания, приведено в [14].

3.2 Перед проведением испытания должна быть известна следующая информация о испытуемом соединении:

- общее наименование, химическое название (предпочтительно название по ИЮПАК), структурная формула, регистрационный номер CAS, чистота;
- давление пара;
- растворимость в воде.

3.3 Следующая дополнительная информация считается полезной перед началом испытания:

- коэффициент распределения октанол-вода, K_{ow};
- коэффициент распределения органический углерод-вода, выраженный в K_{oc};
- гидролиз;
- фотопревращение в воде;
- способность к биологическому разложению;
- поверхностное натяжение.

3.4 Информация о некоторых характеристиках осадка, который будет использоваться, должна быть получена до начала испытания [7]. Для получения дополнительной информации см. 7.6.1–7.6.4.

4 Принцип метода

4.1 Черви аналогичного физиологического состояния (синхронизированные согласно приложению Г) подвергаются воздействию ряда концентраций токсикантов, добавляемых к фазе осадка системы осадок-вода. В качестве среды используют искусственный осадок и восстановленную воду. Испытуемые сосуды без добавления испытуемого вещества служат в качестве контрольных. Испытуемое вещество вносят в осадок в большом объеме раствора для каждого уровня концентрации для сведения к минимуму вариабельности между повторностями каждого уровня концентрации, а затем тестовые организмы вносят в испытуемые сосуды, в которых концентрации осадка и воды были уравновешены (см. 7.7.2). Тестовые организмы подвергают воздействию системы осадок-вода в течение 28 сут. В связи с низким содержанием питательных веществ в искусственном осадке в осадок добавляют корм (см. 7.6.1–7.6.2 и приложение В) для обеспечения роста и размножения червей в контрольных условиях. Таким образом, гарантируется, что тестовые организмы подвергаются воздействию посредством воды и осадка, а также их питания.

4.2 Предпочтительной конечной точкой этого типа исследования является EC_x (например, EC_{50}, EC_{25} и EC_{10}; эффективная концентрация, влияющая на *x* % тестируемых организмов) для воспроизведения и биомассы, соответственно, по сравнению с контролем. Однако следует отметить, что с учетом высокой неопределенности для низких значений EC_x (например EC_{10}, EC_{25}) с очень высоким значением 95 % доверительного интервала [15] и статистической мощности, рассчитанной в ходе проверки гипотез, EC_{50} считается самой надежной конечной точкой. Кроме того, неэффективная наблюдаемая концентрация

(NOEC) и наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация (LOEC) могут быть рассчитаны для биомассы и воспроизводства, если дизайн испытания и данные подтверждают эти расчеты (см. 8.3.1–8.3.5). Цель испытания, то есть определение EC_x или NOEC, будет определять дизайн испытания.

5 Стандартное испытание

Предполагается проведение испытания с контрольными организмами для демонстрации достаточных возможностей лаборатории в проведении данного испытания, и если имеются архивные данные, то воспроизводимость испытания. Кроме того, стандартное испытание на токсичность проводят через регулярные интервалы времени с использованием стандартного токсиканта для оценки чувствительности тестовых организмов. Стандартное испытание токсичности в воде в течение 96 ч может только удовлетворительно продемонстрировать чувствительность и состояние тестовых животных [4], [7]. Информация о токсичности пентахлорфенола (PCP) в полноценном испытании (28 г воздействие обогащенным осадком) приведена в приложении Д и в отчете о кольцевом методе испытания [13]. Описана, например, острая токсичность PCP только при воздействии через воду в ссылке [16]. Эта информация может быть использована для сравнения чувствительности тестовых организмов в стандартном испытании с PCP в качестве эталонного токсиканта. Хлорид калия (KCl) или сульфат меди ($CuSO_4$) были рекомендованы в качестве стандартных токсикантов с *Lumbriculus variegatus* [4], [7]. В настоящее время установление критериев качества, основанных на данных о токсичности для KCl, затруднительно из-за отсутствия литературных данных для *L. variegatus*. Информацию о токсичности меди для *L. variegatus* можно найти в [17]–[21].

6 Достоверность испытания

Следующие требования должны быть выполнены, чтобы считать испытание достоверным:

- результаты кольцевого испытания [13] показали, что для *Lumbriculus variegatus* среднее число живых червей на повторность в контроле должно увеличиваться не менее чем в 1,8 раза в конце воздействия по сравнению с количеством червей в повторности при начале воздействия;
- значение pH надосадочной воды должно составлять 6–9 в течение всего испытания;
- концентрация кислорода в надосадочной воде должна быть не менее 30 % насыщения воздуха (ASV) при измеренной температуре в ходе испытания.

7 Описание метода

7.1 Тест-система

Рекомендуются статические системы без обновления надосадочной воды. Если соотношение осадок-вода (см. 7.2.1) является подходящим, то, как правило, достаточно мягкой аэрации для поддержания качества воды на приемлемом для тестовых организмов уровне (например, для обеспечения максимального содержания растворенного кислорода, минимального накопления экскреторных продуктов). Полустатические или проточные системы с прерывистым или непрерывным обновлением надосадочной воды используются только в исключительных случаях, так как регулярное обновление надосадочной воды, как предполагается, влияет на химическое равновесие (например, вызывает потери испытуемого соединения в тест-системе).

7.2 Испытуемые сосуды и оборудование

7.2.1 Испытание проводят в стеклянных стаканах, например вместимостью 250 мл и диаметром 6 см. Можно использовать другие подходящие стеклянные сосуды, обеспечивающие соответствующую высоту слоя надосадочной воды и осадка. Каждый сосуд должен вмещать слой искусственного осадка высотой примерно 1,5–3 см. Отношение высоты слоя осадка к высоте слоя надосадочной воды должно составлять 1:4. Сосуды должны иметь подходящую вместимость в соответствии с уровнем загрузки, то есть число тестовых червей, добавленных на единицу массы осадка (см. 8.4.1.1).

7.2.2 Испытуемые сосуды и другое оборудование, контактирующие с испытуемым веществом, должны быть полностью изготовлены из стекла или другого химически инертного материала. Для всех частей оборудования не используют материалы, которые могут растворять, поглощать испытуемое вещество или выщелачивать другие вещества, а также отрицательно влиять на тестовые организмы.

Teflon®, нержавеющая сталь и/или стекло должны использоваться для любого оборудования, контактирующего с испытуемой средой. Для органических веществ, о которых известно, что они адсорбируются на стекле, может потребоваться силанизированное стекло. В таких ситуациях оборудование необходимо утилизировать после использования.

7.3 Тестовые виды

Тестовыми видами, используемыми в данном типе исследования, являются пресноводные олигохеты *Lumbriculus variegatus* (Мюллер). Этот вид устойчив к осадкам самых различных типов и широко используется для испытаний по токсичности осадка и биоаккумуляции [3], [5], [7], [9], [13], [15], [16], [22]–[35]. Следует указать источник тестовых животных, подтверждение идентичности видов [36], а также условия культивирования. Идентификация вида не требуется для каждого испытания, если организмы происходят из внутрилабораторной культуры.

7.4 Культивирование тестовых организмов

7.4.1 Для обеспечения достаточного количества червей для проведения испытания токсичности осадка полезно постоянно поддерживать лабораторную культуру червей. Руководство по методам лабораторного культивирования *Lumbriculus variegatus* и источникам стартовых культур приведено в приложении Г. Подробная информация о культивировании этого вида представлена в [3], [7], [27].

7.4.2 Для обеспечения проведения испытания с организмами того же вида настоятельно рекомендуется создание культур отдельных видов. Необходимо убедиться, что культура и особенно черви, используемые в испытаниях, не имеют видимых признаков заболеваний и аномалий.

7.5 Вода

7.5.1 Рекомендуется использовать восстановленную воду в соответствии с руководством ОЭСР 203 [37] в качестве надосадочной воды в испытаниях; она также может использоваться для лабораторных культур червей (приложение А). При необходимости можно использовать природную воду. Выбранная вода должна иметь качество, обеспечивающее рост и размножение тестовых видов во время акклиматизации и периода испытания без аномального внешнего вида или поведения. Выживание, рост и размножение *Lumbriculus variegatus* были подтверждены в этом типе воды [30], и представлена максимальная стандартизация условий испытаний и культивирования. При использовании восстановленной воды указывают ее состав и приводят характеристику воды перед использованием минимум по pH, содержанию кислорода и жесткости (выраженной как мг $CaCO_3$/л). Анализ воды на микрозагрязнения перед использованием может предоставить полезную информацию (см. приложение Б).

7.5.2 Значение pH надосадочной воды должно находиться в диапазоне от 6,0 до 9,0 (см. 6). Если предполагается увеличение концентрации аммиака, то pH поддерживают между 6,0 и 8,0. Для испытания, например, слабых органических кислот значение pH доводят буферизацией воды, используемой в испытании, как описано в [16]. Общая жесткость воды, используемой в испытании, должна составлять от 90 до 300 мг $CaCO_3$ на литр природной воды. В приложении Б приведены дополнительные критерии приемлемой воды для разведения в соответствии с руководством [38].

7.6 Осадок

7.6.1 Предпочтительно использовать искусственный осадок (также называемый восстановленным, смешанным или синтетическим осадком), поскольку незагрязненный природный осадок из конкретного источника может быть недоступен в течение года, и местные организмы, а также наличие микрозагрязнений могут повлиять на испытание. Использование искусственного осадка минимизирует вариабельность условий испытания, а также внесение местной фауны. Для использования в данном типе испытаний рекомендуется, согласно [6], [10], [30], [41]–[43], следующий искусственный осадок на основе искусственного осадка в соответствии с [6], [39] и [40]:

а) 4–5 % (сухая масса) сфагновый торф; важно использовать торф в виде порошка со «средней» степенью разложения, тонко измельченный (размер частиц не более 0,5 мм) и высушенный только на воздухе;

б) (20 ± 1) % (сухая масса) каолиновой глины (содержание каолинита предпочтительно выше 30 %);

в) 75–76 % (сухая масса) кварцевого песка (мелкий песок с размером частиц не более 2 мм, при этом более 50 % частиц должно быть в диапазоне 50–200 мкм);

г) деионизированная вода с 30–50 % сухой массы осадка в дополнение к сухим компонентам осадка;

д) карбонат кальция химически чистый ($CaCO_3$) добавляется для доведения pH конечной смеси осадка.

е) общее содержание органического углерода (TOC) в конечной смеси должно составлять 2 % (± 0,5 %) сухой массы осадка и доводиться соответствующими количествами торфа и песка в соответствии с перечислениями а) и в).

ж) корм, например измельченные листья крапивы (*Urtica* sp в соответствии с фармацевтическими стандартами для потребления человеком) или смеси измельченных листьев крапивы *Urtica* sp с альфа- целлюлозой (1:1), в количестве 0,4–0,5 % сухой массы осадка в дополнение к сухим компонентам осадка согласно приложению В.

7.6.2 Источники торфа, каолиновой глины, питательного материала и песка должны быть известны. В дополнение к перечислению ж) в [6] приведены альтернативные растительные материалы для использования в качестве источника питания: обезвоженные листья шелковицы (*Morus alba*), ползучий или белый клевер (*Trifolium repens*), шпинат (*Spinacia oleracea*) или овсяная злаковая трава.

7.6.3 Выбранный источник питания добавляют до или во время обогащения осадка испытуемым веществом. Выбранный источник питания должен обеспечивать по меньшей мере приемлемый уровень размножения в контроле. Анализ искусственного осадка или его компонентов на микрозагрязнения перед использованием может предоставить полезную информацию. Пример приготовления искусственного осадка описан в приложении В. Смешивание сухих компонентов также допустимо, если доказано, что после добавления надосадочной воды не происходит разделения компонентов осадка (например, плавающие частицы торфа) и что торф или осадок в достаточной степени кондиционированы (см. 7.6.4 и приложение В). Искусственный осадок следует охарактеризовать минимум по источнику компонентов, распределению частиц по размерам (процент песка, ила и глины), общему содержанию органического углерода (TOC), содержанию воды и pH. Измерение окислительно-восстановительного потенциала является необязательным.

7.6.4 При необходимости, например для определенных целей испытания, природный осадок из незагрязненных участков может также служить в качестве испытуемого и/или культурального осадка [3]. Однако при использовании природного осадка его следует охарактеризовать минимум по источнику (место отбора), pH и содержанию аммиака в поровой воде, общему содержанию органического углерода (TOC), содержанию азота, распределению частиц по размеру (песок, ил и глина в процентах) и процентному содержанию воды [7], и он не должен содержать никаких загрязнений и других организмов, конкурирующих с или питающихся тестовыми организмами. Измерение окислительно-восстановительного потенциала и емкости катионного обмена является необязательным. Перед обогащением испытуемым веществом природный осадок также рекомендуется кондиционировать в течение 7 сут в условиях, преобладающих в последующем испытании. В конце периода кондиционирования надосадочную воду удаляют и утилизируют.

7.6.5 Используемый осадок должен иметь качество, обеспечивающее выживание и размножение контрольных организмов на протяжении всего периода воздействия без аномального внешнего вида или поведения. Контрольные черви должны зарываться в осадок и заглатывать его. Размножение в контроле должно соответствовать по крайней мере критериям достоверности, описанным в 6.1. Регистрируют наличие или отсутствие фекальных шариков на поверхности осадка, указывающих на заглатывание осадка червями, и это может быть полезным для интерпретации результатов испытаний в отношении путей воздействия. Дополнительная информация о заглатывании осадка может быть получена с помощью методов, описанных в [24], [25], [44] и [45], указывающих на заглатывание осадка или выделение частиц тестовыми организмами.

7.6.6 Процедуры подготовки природных осадков перед использованием в лаборатории описаны в [3], [7] и [12]. Подготовка и хранение искусственного осадка, рекомендуемого для использования в испытании с *Lumbriculus*, описаны в приложении В.

7.7 Внесение испытуемого вещества

7.7.1 Осадок обогащают испытуемым веществом. Поскольку большинство испытуемых веществ имеет низкую растворимость в воде, то их растворяют в подходящем органическом растворителе (например, ацетоне, н-гексане, циклогексане) при минимальном объеме для приготовления стокового раствора. Для приготовления испытуемых растворов стоковый раствор разбавляют тем же растворителем. Токсичность и летучесть растворителя, и растворимость испытуемого вещества в выбранном растворителе

являются основными критериями при выборе подходящего солюбилизирующего агента. Для каждого уровня концентрации используют одинаковый объем соответствующего раствора. Осадок обогащают большими объемами растворов испытуемого вещества для каждого уровня концентраций, чтобы минимизировать вариабельность концентрации испытуемого вещества между повторностями. Каждый из испытуемых растворов затем смешивают с кварцевым песком согласно 7.6.1 (например, 10 г кварцевого песка на испытуемый сосуд). Для полного впитывания раствора кварцевым песком достаточный объем составляет 0,20–0,25 мл на 1 г песка. Затем растворитель выпаривают досуха. Для минимизации потерь испытуемого вещества при совместном выпаривании (например, в зависимости от давления пара вещества) покрытый песок используют сразу же после высыхания. Сухой песок смешивают с подходящим количеством обогащенного осадка с соответствующим уровнем концентрации. При приготовлении осадка учитывают количество песка в смеси испытуемого вещества с песком (т. е. осадок следует готовить с меньшим количеством песка). Основное преимущество этой процедуры заключается в том, что растворитель практически не вносится в осадок [7]. Альтернативно, например для природного осадка, испытуемое химическое вещество добавляют в обогащенную высушенную и мелко измельченную порцию осадка, как описано выше для кварцевого песка, или испытуемое вещество перемешивают с влажным осадком с последующим испарением любого солюбилизирующего агента. При внесении испытуемого химического вещества обеспечивают его тщательное и равномерное распределение внутри осадка. При необходимости анализируют дополнительные пробы для подтверждения требуемой концентрации в осадке, а также определения степени однородности. Для подтверждения требуемой концентрации в осадке также анализируют дополнительные пробы испытуемых растворов. Поскольку растворитель используют для нанесения испытуемого вещества на кварцевый песок, то следует использовать контроль на растворитель, который готовят с таким же количеством растворителя, как в испытуемом осадке. Указывают метод, используемый для обогащения, а также приводят обоснование выбора определенной процедуры обогащения, за исключением описанной выше. Способ обогащения адаптируют к физико-химическим свойствам испытуемого вещества, например для предупреждения потерь из-за испарения во время обогащения или уравновешивания. Дополнительное руководство по процедуре обогащения приводится Министерством охраны окружающей среды Канады (1995) [46].

7.7.2 После приготовления обогащенного осадка, распределения его в повторности испытуемых сосудов и заливки испытуемой водой требуется обеспечить распределение испытуемого вещества из осадка в водную фазу [3], [7], [9]. Предпочтительно это осуществлять в условиях температуры и аэрации, используемых при испытании. Соответствующее время уравновешивания является в каждом случае специфическим для осадка и химического вещества и может находиться в пределах от часов до суток, а в редких случаях до нескольких недель (4–5 недель) [27], [47]. В этом испытании уравновешивание может отсутствовать, но рекомендуемый период уравновешивания составляет от 48 ч до 7 сут. Таким образом, время деградации испытуемого вещества сводится к минимуму. В зависимости от цели испытания, например если имитируются условия окружающей среды, обогащенный осадок уравновешивают или выдерживают в течение длительного периода времени.

7.7.3 В конце данного периода уравновешивания определяют концентрацию испытуемого вещества в надосадочной жидкости и большом количестве осадка по меньшей мере при наиболее высокой и низкой концентрации. Данные аналитические измерения испытуемого вещества позволяют рассчитать массовый баланс и выразить результаты на основе установленных начальных концентраций. Как правило, отбор проб нарушает или разрушает систему осадок-вода. Поэтому обычно не представляется возможным использовать те же повторности для отбора проб осадка и червей. Следует подготовить дополнительные «аналитические» сосуды соответствующих размеров, обработанные аналогичным образом (в том числе в присутствии тестовых организмов), но которые не используют для биологических наблюдений. Размеры сосуда выбираются таким образом, чтобы обеспечить необходимое количество проб для проведения аналитических методов. Подробная информация по отбору проб описана в 8.7.1.1.

8 Проведение испытания

8.1 Предварительное испытание

Если информация о токсичности испытуемого вещества для *Lumbriculus variegatus* отсутствует, то полезно провести предварительный эксперимент с целью определения диапазона предельных концентраций, которые будут испытываться в конечном испытании, а также для оптимизации условий проведения эксперимента в конечном испытании. С этой целью используют ряд широко разнесенных

концентраций испытуемого вещества. Черви подвергаются воздействию каждой концентрации испытуемого вещества в течение периода (например, 28 сут, как и в конечном испытании), позволяющему оценить соответствующие испытуемые концентрации; повторности в данном случае не требуются. Во время предварительного испытания наблюдают и регистрируют поведение червей, например выползание из осадка, которое может быть вызвано испытуемым веществом и/или воздействием осадка. Концентрации более 1000 мг/кг осадка сухой массы в предварительном испытании не проверяются.

8.2 Конечное испытание

8.2.1 В конечном испытании используют не менее пяти концентраций, выбранных, например, на основе результатов предварительного испытания по определению диапазона предельных концентраций (см. 8.1) согласно 8.3.2–8.3.5.

8.2.2 В дополнение к испытуемым сосудам включают контроль (для повторностей см. 8.3.3–8.3.5), содержащий все компоненты, за исключением испытуемого вещества. Если для внесения испытуемого вещества используют солюбилизирующий агент, то он не должен оказывать существенного влияния на тестовые организмы, что устанавливается включением дополнительного контроля только на растворитель.

8.3 Дизайн испытания

8.3.1 Дизайн испытания относится к выбору количества и диапазона разнесения испытуемых концентраций, количества сосудов для каждой концентрации и количества червей, вносимых в сосуд. Дизайны с определением EC_x, установлением NOEC и проведением испытания по определению диапазона предельных концентраций описаны в 8.3.2–8.3.5.

8.3.2 Эффективная концентрация (например, EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) и диапазон концентраций, в котором действие испытуемого вещества представляет интерес, должны охватывать концентрации, включенные в испытание. Следует избегать экстраполяции значительно ниже самой низкой концентрации, влияющей на тестируемые организмы, или выше самой высокой испытуемой концентрации. Если, в исключительных случаях, такая экстраполяция проводится, то в отчете представляют исчерпывающее обоснование.

8.3.3 Для определения EC_x требуется не менее пяти концентраций минимум в трех повторностях для каждой концентрации; для контроля рекомендуются шесть повторностей или, если он используется, контроль на растворитель для повышения достоверности оценки вариабельности контроля. В любом случае, желательно использовать достаточное количество испытуемых концентраций для установления подходящей модели. Интервал между концентрациями не должен быть больше двух (исключение может быть сделано для случаев, если кривая концентрация-эффект имеет пологий наклон). Количество повторностей в каждой обработке может быть уменьшено, если количество испытуемых концентраций с эффектами в диапазоне 5–95 % увеличено. Увеличение количества повторностей или уменьшение диапазона испытуемых концентраций приводит к более узким доверительным интервалам для испытания.

8.3.4 Если необходимо установить значения LOEC/NOEC, то используют не менее пяти испытуемых концентраций в четырех повторностях (для контроля рекомендуется шесть повторностей или, при использовании растворителя, контроль на растворитель для улучшения оценки вариабельности контроля), а интервал между концентрацией не должен быть больше двух. Некоторые сведения о статистической мощности, полученные при проверке гипотез в кольцевом методе испытания, приведены в приложении Д.

8.3.5 Определение диапазона предельных концентраций выполняется (с использованием одной испытуемой концентрации и контроля), если предполагается отсутствие эффектов вплоть до 1000 мг/кг осадка по сухой массе (например, по данным предварительного испытания по определению диапазона предельных концентраций) или если испытание в одной концентрации будет достаточным для подтверждения интересующего значения NOEC. В последнем случае подробное обоснование выбора предельной концентрации следует включить в отчет о проведении испытания. Целью испытания по определению диапазона предельных концентраций является проведение испытания в достаточно высокой концентрации для того, чтобы позволить экспериментаторам, проводящим испытание, исключить возможные токсические эффекты вещества и установить предельную концентрацию, которая не ожидается в любой ситуации. Рекомендуется концентрация 1000 мг/кг (по сухой массе). Обычно необходимо не менее шести повторностей как для опытного испытания, так и для контроля. Некоторые

сведения о статистической мощности, полученные при проверке гипотез в кольцевом методе испытания, приведены в приложении Д.

8.4 Условия воздействия

8.4.1 Тестовые организмы

8.4.1.1 Испытание проводится не менее чем с 10 червями для каждой повторности, которые используются для определения биологических показателей. Данное количество червей соответствует примерно 50–100 мг влажной биомассы. Принимая содержание сухого вещества за 17,1 % [48], получается приблизительно 9–17 мг сухой биомассы на сосуд. Агентство по охране окружающей среды США (2000 [7]) рекомендует использовать уровень загрузки, не превышающий 1:50 (сухой биомассы: ТОС). Для искусственного осадка, описанного в 7.6.1, это соответствует примерно 43 г осадка (сухая масса) на 10 червей при содержании ТОС на уровне 2,0% сухого осадка. Если используется более 10 червей на сосуд, то количество осадка и надосадочной воды следует скорректировать соответствующим образом.

8.4.1.2 Все черви, используемые в испытании, должны происходить из одного источника и иметь одинаковое физиологическое состояние (см. приложение Г). Черви отбираются одинакового размера (см. 8.4.1.1). Дополнительные пробы партии или стоковой культуры червей рекомендуется взвешивать перед испытанием для оценки средней массы.

8.4.1.3 Червей, используемых в испытании, извлекают из культуры (см. приложение Г). Крупные особи (половозрелые) без признаков недавней фрагментации переносят в стеклянную посуду (например, чашки Петри), содержащую чистую воду. Затем их синхронизируют, как описано в приложении Г. После регенерации в течение от 10 до 14 сут для испытания используют неповрежденных целых червей одинакового размера, которые активно плавают или ползают после осторожного механического воздействия. Если условия испытаний отличаются от условий культивирования (например, по температуре, световому режиму и надосадочной воде), то достаточной является акклиматизация, например, в течение 24 ч при температуре, световом режиме, а также с использованием надосадочной воды, как в испытании, для адаптации червей к условиям испытания. Адаптированные олигохеты распределяют произвольно в испытуемые сосуды.

8.4.2 Кормление

Поскольку корм добавляют в осадок до (или во время) внесения испытуемого вещества, то дополнительно червей не кормят во время испытания.

8.4.3 Световой период и температура

Световой период при культивировании и испытании обычно составляет 16 ч [3], [7]. Интенсивность света должна поддерживаться низкой (например, 100–500 лк), имитируя природные условия на поверхности осадка, и ее оценивают не менее одного раза в течение периода воздействия. Температура должна составлять (20 ± 2) °С в течение всего испытания. Разность температур между испытуемыми сосудами не должна превышать ± 1 °С в указанный момент измерения. Испытуемые сосуды произвольно помещают в термостат или место, в которых проводится испытание, например, для минимизации изменения уровня размножения за счет расположения сосудов.

8.4.4 Аэрация

Надосадочную воду в испытуемых сосудах подвергают легкой аэрации (например, 2–4 пузырька в секунду) через пастеровскую пипетку, зафиксированную примерно на 2 см выше слоя осадка для минимизации возмущения осадка. Необходимо следить, чтобы концентрация растворенного кислорода не снижалась ниже 30 % насыщения воздуха (ASV). Подачу воздуха контролируют и при необходимости регулируют не менее одного раза в день по рабочим дням.

8.5 Измерения качества воды

В надосадочной воде измеряют следующие показатели качества воды:

– температура: в начале и в конце периода воздействия не менее чем в одном испытуемом сосуде для каждой концентрации и одном испытуемом сосуде в контроле один раз в неделю; по возможности температура в окружающей среде (окружающего воздуха или водяной бани) дополнительно регистрируется, например ежечасно;

– содержание растворенного кислорода: в начале и в конце периода воздействия не менее чем в одном испытуемом сосуде для каждой концентрации и одном испытуемом сосуде в контроле один раз в неделю; выражается в миллиграммах на литр и процентах ASV (значение насыщения воздуха);

– подача воздуха: следует контролировать не менее одного раза в день по рабочим дням и при необходимости регулировать;

– pH: в начале и в конце периода воздействия не менее чем в одном испытуемом сосуде для каждой концентрации и одном испытуемом сосуде в контроле один раз в неделю;

– общая жесткость воды: в начале и в конце периода испытания не менее чем в одной повторности в контроле и одном испытуемом сосуде при самой высокой концентрации; выражается в миллиграммах на литр $CaCO_3$;

– общее содержание аммиака: в начале периода воздействия не менее чем в одной повторности в контроле и одном испытуемом сосуде для каждой испытуемой концентрации, а затем три раза в неделю; выражается в миллиграммах на литр NH_4^+ или NH_3 или общей аммиак-N.

Если для измерения параметров качества воды требуется отбор значительного количества воды из сосудов, то целесообразно для этой цели подготовить отдельные сосуды для измерения качества воды, чтобы не изменять объемное соотношение вода-осадок.

8.6 Биологические наблюдения

8.6.1 Во время воздействия следует наблюдать за испытуемыми сосудами для визуальной оценки любых поведенческих отличий червей (например, выползание из осадка, фекальные шарики, видимые на поверхности осадка) по сравнению с контролем. Наблюдения регистрируют.

8.6.2 В конце испытания оценивают каждую повторность (дополнительные сосуды, предназначенные для химического анализа, могут быть исключены из такой оценки). Для извлечения всех червей из испытуемого сосуда используют подходящий метод. Следует проявлять осторожность, чтобы не повредить червей при извлечении. Одним из возможных методов является просеивание червей из осадка. Можно использовать сетку из нержавеющей стали с соответствующим размером ячеек. Большую часть надосадочной воды осторожно сливают, а оставшийся осадок и воду перемешивают до получения суспензии, которую можно пропустить через сито. При использовании сита с размером отверстий 500 мкм большая часть частиц осадка проходит через него очень быстро; однако просеивание проводят быстро для предупреждения уползания червей внутрь или через сито. Использование сита с размером отверстий 250 мкм позволит предупредить уползание червей внутрь или через него; однако следует обратить внимание, чтобы как можно меньше частиц осадка осталось на сите. Просеянную суспензию из каждой повторности сосудов можно пропустить через сито второй раз для обеспечения извлечения всех червей. Альтернативным методом является нагревание осадка помещением испытуемых сосудов в водяную баню при температуре 50–60 °С; черви покидают осадок и могут быть собраны с поверхности осадка с помощью оплавленной пипетки с широким носиком. Другим альтернативным методом является приготовление суспензии осадка и слив этой суспензии в мелкую чашу подходящего размера. Из мелкого слоя суспензии червей отбирают стальной иглой или часовым пинцетом (предпочтительно используя его подобно вилке, а не как щипцы для предотвращения травмирования червей) и переносят в чистую воду. После отделения от суспензии осадка червей промывают в испытуемой среде и подсчитывают.

8.6.3 Независимо от используемого метода, лаборатории должны продемонстрировать, что их персонал может извлекать в среднем не менее 90 % червей из всего осадка. Например, определенное количество тестовых организмов добавляют в контрольный осадок или испытуемый осадок и определяют извлечение через 1 ч [7].

8.6.4 Регистрируют и оценивают общее количество живых и мертвых особей на каждую повторность. Следующих червей считают мертвыми, если они:

а) не реагируют на мягкое механическое воздействие;

б) проявляют признаки разложения (в сочетании с указанными в перечислении «а»);

в) пропали.

Кроме того, живых червей относят к одной из следующих трех групп:

а) крупные целые черви (половозрелые особи) без регенерированных частей тела;

б) целые черви с регенерированными, более светлыми частями тела (с новой задней частью, с новой передней частью или с новой задней и передней частями);

в) нецелые черви (недавно фрагментированные черви с нерегенерированными частями тела).

Эти дополнительные наблюдения не являются обязательными, но могут быть использованы для дополнительной интерпретации результатов биологических испытаний (например, большое количество червей, указанных в перечислении в), может указывать на задержку размножения или регенерации при

данной обработке). Кроме того, если наблюдаются какие-либо различия во внешнем виде (например, поражения кожного покрова, отечные части тела) между обработанными и контрольными червями, то их также регистрируют.

8.6.5 Сразу после подсчета/оценки живых червей, обнаруженных в каждой повторности, подвергают высушиванию, предварительному взвешиванию и маркировке чаш для взвешивания (по одной на повторность), и умерщвлению с помощью капли этанола на чашу для взвешивания. Взвешенные чаши помещают в сушильный шкаф при (100 ± 5) °С для высушивания в течение ночи, затем их взвешивают после охлаждения в эксикаторе и определяют сухую массу червей (предпочтительно в граммах, не менее четырех знаков после запятой).

8.6.6 В дополнение к общей сухой массе определяют беззольную сухую массу, как описано [49], для учета неорганических компонентов, происходящих из потребляемого осадка, присутствующего в пищеварительном тракте червей.

8.6.7 Биомассу определяют как общую биомассу на каждую повторность, включая половозрелых и молодых особей червей. Мертвых червей не учитывают для определения биомассы на каждую повторность.

8.7 Проверка концентрации испытуемого вещества

8.7.1 Отбор проб

8.7.1.1 Пробы для химического анализа испытуемого вещества отбирают по меньшей мере при самой высокой и низкой концентрациях как минимум в конце фазы уравновешивания (перед добавлением тестовых организмов) и в конце испытания. Для анализа отбирают по меньшей мере основную часть осадка и надосадочной воды. Как минимум две пробы отбирают в матриксе и обработке для каждой даты отбора проб. Одну из повторностей проб сохраняют в качестве резерва (для анализа, например, в том случае, если результаты первоначального анализа находятся за пределами диапазона ± 20 % номинальной концентрации). В случае специфических свойств вещества, например, если предполагается быстрое разложение испытуемого вещества, то схему проведения анализа пересматривают (например, проводят более частый отбор проб, анализ нескольких уровней концентраций) на основе экспертной оценки. Пробы можно отобрать в промежуточные интервалы времени (например, на седьмые сутки после начала воздействия).

8.7.1.2 Надосадочную воду отбирают осторожным сцеживанием или откачиванием с минимизацией возмущения осадка. Объем проб регистрируют.

8.7.1.3 После удаления надосадочной воды осадок гомогенизируют и переносят в подходящую емкость. Массу влажной пробы осадка регистрируют.

8.7.1.4 Если дополнительно требуется провести анализ испытуемого вещества в поровой воде, то гомогенизированные и взвешенные пробы осадка центрифугируют для получения поровой воды. Например, примерно 200 мл влажного осадка помещают в центрифужные стаканы вместимостью 250 мл. Затем пробы центрифугируют без фильтрации для выделения поровой воды, например при (10000 ± 600) об/мин в течение 30–60 мин при температуре, не превышающей используемую в испытании. После центрифугирования супернатант сливают или с осторожностью отбирают пипеткой, чтобы не внести никаких частиц осадка, и регистрируют объем. Массу оставшихся гранул осадка регистрируют. Если определяют сухую массу осадка на каждую дату отбора проб, то это облегчает оценку баланса массы или извлечения испытуемого вещества в системе вода-осадок. В некоторых случаях невозможно провести анализ концентрации в поровой воде, так как объем выборки слишком мал.

8.7.1.5 При отсутствии возможности провести анализ сразу же все пробы хранят подходящим способом, например, в условиях хранения, рекомендованных для минимальной деградации конкретного испытуемого вещества (например, пробы из окружающей среды обычно хранят при температуре минус 18 °С в темноте). До начала испытания получают информацию о надлежащих условиях хранения для конкретного испытуемого вещества, например продолжительность и температура хранения, процедура извлечения и т. д.

8.7.2 Аналитический метод

8.7.2.1 Поскольку вся процедура определяется в основном достоверностью, точностью и чувствительностью аналитического метода, используемого для испытуемого вещества, то экспериментальная проверка точности и воспроизводимости химического анализа, а также извлечения испытуемого вещества из проб воды и осадка является достаточной для конкретного метода как минимум при самой низкой и высокой испытуемых концентрациях. Также проверяется отсутствие испытуемого вещества в

контрольных сосудах в концентрациях, превышающих предел количественного определения. При необходимости корректируются номинальные концентрации для извлечений контроля качества обогащения (например, извлечение которых находится за пределами 80–120 % от внесенного количества). При таком способе обращения с пробами в течение всего испытания загрязнения и потери сводятся к минимуму (например, в результате адсорбции испытуемого вещества на пробоотборнике).

8.7.2.2 Извлечение испытуемого вещества, предел количественного определения и предел обнаружения в осадке и воде регистрируют и указывают в отчете.

9 Данные и отчет о проведении испытания

9.1 Обработка результатов

9.1.1 Основными обязательными показателями эффекта при испытании, оцениваемыми статистически, являются биомасса и общее количество червей на повторность. При необходимости также оценивают репродукцию (в виде увеличения численности червей) и рост (в виде увеличения сухой биомассы). В этом случае оценку сухой массы червей в начале воздействия проводят, например, измерением сухой массы репрезентативной выборки из партии синхронизированных червей, используемых для испытания.

9.1.2 Оценивают гибель, насколько это возможно, хотя она и не является конечной точкой для данного испытания. Для оценки гибели червей, не реагирующих на мягкое механическое воздействие, или имеющих признаки разложения, или пропавших червей, следует считать павшими. Гибель по крайней мере регистрируется и учитывается при интерпретации результатов испытаний.

9.1.3 Эффективные концентрации следует выражать в мг/кг сухой массы осадка. Если измеренное извлечение испытуемого вещества из осадка или из осадка и надосадочной воды в начале воздействия находится в пределах 80–120 % от номинальной концентрации, то эффективные концентрации (EC_X, NOEC, LOEC) могут быть выражены на основе номинальной концентрации. Если извлечение отклоняется более чем на ± 20 % номинальной концентрации, то эффективные концентрации (EC_X, NOEC, LOEC) должны быть основаны на первоначально измеренных концентрациях в начале воздействия, например с учетом баланса массы испытуемого вещества в тест-системе (см. 7.7.3). В этих случаях дополнительную информацию получают из анализа стоковых и/или растворов с внесенным испытуемым веществом для подтверждения правильности приготовления испытуемого осадка.

9.1.4 EC_X

Значения EC_X для параметров, указанных в 9.1.1, рассчитываются с использованием соответствующих статистических методов (например, пробит-анализа, логистики или функции Вейбулла, корреляционного метода Спирмен — Карбера, или линейной интерполяции). Руководство по статистической оценке приведено в [15] и [50]. Значение EC_X получают, подставляя соответствующее среднее значение в контроле в процентах (x %) в найденное уравнение. Для расчета EC_{50} или любой другой EC_x среднее значение каждой обработки $\bar{x}$ подвергают регрессионному анализу.

9.1.5 NOEC/LOEC

9.1.5.1 Если статистический анализ предназначен для определения NOEC/LOEC, то необходима статистика на каждый сосуд (отдельные сосуды считаются повторностями). Следует использовать подходящие статистические методы. В общем, отрицательные эффекты испытуемого вещества по сравнению с контролем анализируют с помощью односторонней (меньшей) проверки гипотез при $p \le 0,05$. Примеры приведены в следующих пунктах. Руководство по выбору подходящих статистических методов приведено в [15] и [50].

9.1.5.2 Нормальное распределение данных проверяют, например, критерием согласия Колмогорова — Смирнова, критерием соотношения размах — стандартное отклонение (R/S-критерий) или критерием Шапиро — Уилка (двусторонний, $p \le 0,05$). Критерий Кохрана, критерий Левена или критерий Бартлетта (двусторонний, $p \le 0,05$) используют для проверки однородности дисперсии. Если выполняются требования для использования методов параметрических критериев (нормальность, однородность дисперсии), то применяют однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и последующие критерии множественных сравнений. Парные сравнения (например, t-критерий Даннета) или критерий понижающего тренда (например, критерий Вильямса) используют для расчета существующей статистически значимой разницы ($p \le 0,05$) между контролем и различными концентрациями испытуемого вещества. В противном случае для определения NOEC и LOEC используют непараметрические методы (например, U-критерий Бонферрони в соответствии с критериями тренда Холма или Джонкхиера — Терпстра).

9.1.6 Определение диапазона предельных концентраций

9.1.6.1 Если проводят определение диапазона предельных концентраций (сравнение контроля и только одной обработки) и были выполнены требования для методов параметрических критериев (нормальности, однородности), то метрические эффекты (общее количество червей и биомасса как сухая масса червей) оценивают критерием Стьюдента (*t*-критерий). Если эти требования не выполняются, то для неравных дисперсий используют *t*-критерий (*t*-критерий Уэлча) или непараметрический критерий, такой как *U*-критерий Манна — Уитни. Информация о статистической мощности, полученная при проверке гипотез в кольцевом методе испытания, приведена в приложении Д.

9.1.6.2 Для определения значимых различий между контролями (контроль и контроль растворителя) проверяют повторность каждого контроля, как описано для определения диапазона предельных концентраций. Если эти испытания не выявляют существенных различий, то можно объединить все повторности контролей и контроля на растворитель. В противном случае все обработки сравнивают с контролем на растворитель.

9.2 Интерпретация результатов

Результаты следует интерпретировать с осторожностью, если были отклонения от данного стандарта и если измеренные концентрации испытуемых концентраций находятся на уровнях, близких к пределу обнаружения аналитического метода. Любые отклонения от данного стандарта указывают.

9.3 Отчет о проведении испытания

Отчет о проведении испытания должен включать по меньшей мере следующую информацию:

9.3.1 Испытуемое вещество:

- данные химической идентификации (общее название, химическое название, структурная формула, номер CAS и т. д.), включая чистоту и аналитический метод для количественного определения испытуемого вещества; источник испытуемого вещества, идентичность и концентрация любого используемого растворителя;
- любая доступная информация о физической природе и физико-химических свойствах, полученная до начала испытания (например, растворимость в воде, давление пара, коэффициент распределения в почве (или в осадке, при наличии), log K_{ow}, стабильность в воде и т. д.).

9.3.2 Тестовые организмы:

- латинское название, источник, любая предварительная обработка, акклиматизация, условия культивирования и т. д.

9.3.3 Условия испытания:

- используемый метод проведения испытания (например, статический, полустатический или проточный);
- дизайн испытания (например, количество, материал и размер испытуемых сосудов, объем воды на сосуд, масса и объем осадка на сосуд (для проточных или полустатических методов: коэффициент замещения объема воды), используемая аэрация до и во время испытания, количество повторностей, количество червей в повторности в начале испытания, количество испытуемых концентраций, продолжительность периодов кондиционирования, уравновешивания и воздействия, периодичность отбора проб);
- высота слоя осадка и надосадочной воды;
- метод предварительной обработки и обогащения/внесения испытуемого вещества;
- номинальные испытуемые концентрации, подробная информация о пробах, предназначенных для химического анализа, и аналитические методы, с помощью которых были получены концентрации испытуемого вещества;
- характеристики осадка, описанные в 7.6.3–7.6.4, и любые другие проведенные измерения; подготовка искусственного осадка;
- подготовка воды для испытаний (если используется восстановленная вода) и характеристики (концентрация кислорода, pH, электропроводность, жесткость, а также любые другие проведенные измерения) до начала испытания;
- подробная информация о кормлении, включая тип корма, подготовку, количество и режим кормления;
- интенсивность света и световой период(ы);
- методы, используемые для определения всех биологических параметров (например, отбор проб, осмотр, взвешивание тестовых организмов) и всех абиотических параметров (например, параметры качества воды и осадка);

- объемы и/или массы всех проб, предназначенных для химического анализа;
- подробная информация об обработках всех проб для химического анализа, включая информацию о подготовке, хранении, процедурах обогащения, экстракции и аналитических методах (и точности) для испытуемого вещества и извлечении испытуемого вещества.

9.3.4 Результаты:

- качество воды в испытуемых сосудах (pH, температура, концентрация растворенного кислорода, жесткость, концентрации аммиака и любые другие проведенные измерения);
- общее содержание органического углерода (TOC), соотношение сухой массы к влажной массе, pH осадка, а также любые другие проведенные измерения;
- общее число и, если определялось, число целых и нецелых червей в каждом испытуемом сосуде в конце испытания;
- сухая масса червей для каждого испытуемого сосуда в конце испытания и, если измеряли, сухая масса дополнительных проб червей в начале испытания;
- любое наблюдаемое аномальное поведение по сравнению с контролем (например, выползание из осадка, наличие или отсутствие фекальных шариков);
- любая наблюдаемая гибель;
- оценка конечных точек по токсичности (например, EC_X, NOEC и/или LOEC) и статистические методы, используемые для их определения;
- номинальные испытуемые концентрации, установленные испытуемые концентрации и результаты всех анализов по определению концентрации испытуемого вещества в испытуемых сосудах;
- любые отклонения от критериев достоверности.

9.3.5 Оценка результатов испытания:

- соответствие результатов критериям достоверности, перечисленным в 6.1;
- обсуждение результатов, в том числе любого влияния на результаты испытания вследствие отклонения от настоящего стандарта.

Приложение А
(рекомендуемое)

Состав восстановленной воды

Состав восстановленной воды должен соответствовать указанному в документе OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 203. Fish, Acute Toxicity Test. OECD, Paris.

а) Раствор хлорида кальция

Растворяют 11,76 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ в деионизованной воде; доводят до 1 л деионизированной водой.

б) Раствор сульфата магния

Растворяют 4,93 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ в деионизованной воде; доводят до 1 л деионизированной водой.

в) Раствор бикарбоната натрия

Растворяют 2,59 г $NaHCO_3$ в деионизованной воде; доводят до 1 л деионизированной водой.

г) Раствор хлорида калия

Растворяют 0,23 г KCl в деионизованной воде; доводят до 1 л деионизированной водой.

Все химические вещества должны быть аналитической чистоты.

Электропроводность дистиллированной или деминерализованной воды не должна превышать 10 мкСм/см.

25 мл каждого раствора, указанного в перечислениях а) — г), смешивают, и общий объем доводят до 1 л деионизированной водой. Суммарная концентрация ионов кальция и магния в этих растворах составляет 2,5 ммоль/л.

Относительное количество ионов Ca:Mg составляет 4:1 и ионов Na:K 10:1. Окисляемость $K_{S4.3}$ этого раствора составляет 0,8 ммоль/л.

Аэрация воды для разбавления проводится, пока не будет достигнуто насыщения кислородом, затем ее хранят в течение примерно двух суток без дополнительной аэрации перед использованием.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Физико-химические характеристики приемлемой воды для растворения

Вещество	Концентрация
Вещество в виде частиц, мг/л	не более 20
Общий органический углерод, мг/л	не более 2
Ионизированный аммоний, мкг/л	не более 1
Остаточный хлор, мкг/л	не более 10
Общее содержание фосфор-органических пестицидов, нг/л	не более 50
Общее содержание хлорорганических пестицидов плюс полихлорированных бифенилов, нг/л	не более 50
Общий органический хлор, нг/л	не более 25

Данная таблица соответствует приведенной в [38].

Приложение В
(рекомендуемое)

Руководство по приготовлению и хранению искусственного осадка

Компоненты осадка

Составляющий компонент	Характеристика	Содержание в сухой массе осадка, в процентах
Торф	Торф сфагнум, степень разложения: средняя, высушенный на воздухе, без видимых растительных остатков, мелко измельченный (размер частиц не более 0,5 мм)	5 ± 0,5
Кварцевый песок	Размер частиц не более 2 мм, но более 50 % частиц имеют размер 50–200 мкм	75–76
Каолиновая глина	Содержание каолинита не более 30 %	20 ± 1
Источник корма	Например, порошок крапивы (*Folia urticae*), листья *Urtica dioica* (крапивы двудомной), мелко измельченные с размером частиц не более 0,5 мм; в соответствии с фармацевтическими стандартами для потребления человеком; в дополнение к сухому осадку	0,4–0,5
Органический углерод	Доведенный добавлением торфа и песка	2 (± 0,5)
Карбонат кальция	$CaCO_3$ измельченный, химически чистый, в дополнение к сухому осадку	0,05–1
Деионизированная вода	Электропроводность не более 10 мкСм см	30–50

Примечание 1 — При предполагаемом повышенном содержании аммиака, например, если испытуемое вещество, как известно, ингибирует нитрификацию, можно заменить 50 % богатого азотом порошка крапивы целлюлозой (например, порошок α-целлюлозы, химически чистый с размером частиц не более 0,5 мм [13], [51]).

Приготовление

Торф высушивают на воздухе и измельчают до мелкого порошка. Готовят суспензию необходимого количества торфяного порошка в деионизированной воде с использованием высокопроизводительного устройства для гомогенизации. pH данной суспензии доводят $CaCO_3$ до 5,5 ± 0,5. Суспензию кондиционируют в течение не менее 2 сут при осторожном перемешивании при (20 ± 2) °С для стабилизации pH и установления стабильного микробного компонента. Вновь измеряют pH, и его значение должно составлять 6,0 ± 0,5. Затем торфяную суспензию смешивают с другими составляющими компонентами (песком и каолиновой глиной) и деионизированной водой с получением однородного осадка с содержанием воды в диапазоне 30–50 % сухой массы осадка. Вновь определяют pH конечной смеси и при необходимости доводят $CaCO_3$ до 6,5–7,5. Однако если предполагается повышение содержания аммиака, то pH осадка поддерживают ниже 7,0 (например, между 6,0 и 6,5). Отбирают пробы осадка для определения сухой массы и содержания органического углерода. Если предполагается повышение содержания аммиака, то искусственный осадок кондиционируют в течение 7 сут в условиях, которые в основном используются в последующем испытании (например, соотношение осадка-вода 1:4, высота слоя осадка, как в испытуемых сосудах) перед обогащением испытуемым веществом, т. е. его покрывают сверху водой, которая не подвергается аэрации. По окончании периода кондиционирования надосадочную воду удаляют и утилизируют. После этого обогащенный кварцевый песок смешивают с осадком для каждого уровня обработки, осадок распределяют в повторности испытуемых сосудов и покрывают сверху водой для испытания. Затем сосуды инкубируют в условиях, которые в основном используются в последующем испытании. На этой точке начинается период уравновешивания. Надосадочную воду подвергают аэрации.

Выбранный источник корма добавляют до или во время обогащения осадка испытуемым веществом. Его смешивают вначале с торфяной суспензией (см. выше). Однако избыточного разложения источника корма перед добавлением тестовых организмов, например в случае длительного периода уравновешивания, можно избежать, сохраняя как можно коротким период времени между добавлением корма и началом испытания. Для подтверждения того, что корм обогащен испытуемым веществом, источник корма смешивают с осадком не позднее дня обогащения осадка испытуемым веществом.

Хранение

Сухие компоненты искусственного осадка хранят в сухом, прохладном месте или при комнатной температуре. Приготовленный осадок, обогащенный испытуемым веществом, сразу же используют в испытании. Пробы обогащенного осадка хранят до анализа в условиях, рекомендованных для конкретного испытуемого вещества.

Приложение Г
(рекомендуемое)

Метод культивирования *Lumbriculus variegatus*

Lumbriculus variegatus (Müller, 1774), Lumbriculidae, Oligochaeta являются обитателями пресноводных отложений и широко используются в качестве модели в экотоксикологических испытаниях. Они легко культивируются в лабораторных условиях. Схема методов культивирования приводится ниже.

Методы культивирования

Условия культивирования *Lumbriculus variegatus* подробно изложены в [3], [5], [7], [27]. Краткое описание этих условий приведено ниже. Основным преимуществом *L. variegatus* является их быстрое размножение, что обеспечивает быстрый рост биомассы лабораторной культивируемой популяции [3], [5], [7].

Червей культивируют в крупных аквариумах с длиной 16 : шириной 8 (57–80 л) при температуре 23 °С и световом периоде (100–1000 лк) с использованием ежедневно обновляемой природной воды (45–50 л на аквариум). Субстрат готовят, разрезая неотбеленные оберточные бумажные полотенца на полоски, которые затем смешивают с водой, предназначенной для использования при культивировании, в течение нескольких секунд до получения мелких кусочков бумажного субстрата. Этот субстрат используют непосредственно в аквариумах для культивирования *Lumbriculus*, покрывая нижнюю часть резервуара или сохраняя замороженным в деионизированной воде для последующего использования. Внесенный в резервуар субстрат обычно сохраняется в течение примерно двух месяцев.

Каждая культура червей начинается с 500–1000 червей, которым скармливают 10 мл суспензии, содержащей 6 г стартового корма на основе форели, три раза в неделю при обновляемых или проточных условиях. Статические или полустатические культуры должны получить меньшее количество корма для предотвращения бактериального и грибкового роста.

В этих условиях количество особей в культуре обычно удваивается примерно через каждые 10–14 сут.

Альтернативно *Lumbriculus variegatus* также можно культивировать в системе, состоящей из слоя кварцевого песка, используемого для искусственного осадка (высотой 1–2 см), и восстановленной воды. В качестве сосудов для культивирования используют контейнеры из стекла или нержавеющей стали высотой от 12 до 20 см. Водную массу слегка аэрируют (например, 2 пузырька в секунду) с помощью пипетки Пастера, зафиксированной примерно на 2 см выше поверхности осадка. Для предупреждения накопления, например аммиака, надосадочную воду необходимо менять, используя проточную систему или не менее одного раза в неделю вручную. Олигохет выдерживают при комнатной температуре со световым периодом 16 ч света (интенсивность 100–1000 лк) и 8 ч темноты. В полустатических культурах (обновление воды раз в неделю) червям скармливают корм TetraMin два раза в неделю (например, 0,6–0,8 мг на $см^2$ поверхности осадка), применяя в виде суспензии 50 мг TetraMin на мл деионизированной воды.

Lumbriculus variegatus отбирают из культуры, например переносом субстрата на сито с мелкими отверстиями или самих червей с использованием оплавленной стеклянной широкогорлой пипетки (диаметр около 5 мм) в отдельный стакан. Если переносили субстрат в химический стакан, то химический стакан, содержащий червей и субстрат, оставляют на ночь в проточных условиях, что позволит удалить субстрат из стакана, в то время как черви останутся в нижней части сосуда. Затем их помещают в другие подготовленные резервуары для культивирования или подвергают дальнейшей подготовке для проведения испытания согласно [3] и [4] или приведенному ниже.

Проблема, которая является критической при использовании *Lumbriculus variegatus* в испытаниях осадка, заключается в способе размножения (архитомия или морфаллаксис [6]). Это бесполое размножение приводит к появлению двух фрагментов, не принимающих пищу в течение определенного периода до развития головной или хвостовой частей [7], [8]. Это означает, что воздействие на *Lumbriculus variegatus* через заглатывание обогащенного осадка не происходит непрерывно.

Таким образом, синхронизация проводится для минимизации неконтролируемого размножения и регенерации и за счет этого последующей высокой вариабельности результатов испытаний. Такая вариабельность может иметь место, если некоторые особи фрагментированы и поэтому не потребляют корм в течение определенного периода времени, и они менее подвержены воздействию испытуемого вещества по сравнению с особями, которые не фрагментированы на время испытания [9]–[11]. За 10–14 сут до начала испытания черви должны быть искусственно фрагментированы (синхронизованы). Для синхронизации отбираются крупные черви (половозрелые особи), которые предпочтительно не имеют признаков недавнего морфаллаксиса. Этих червей помещают на предметное стекло в каплю воды для культивирования и рассекают скальпелем в средней части тела. Следует обратить внимание, чтобы задние концы имели одинаковый размер. Затем задние концы оставляют до регенерирования нового головного конца в сосудах для культивирования, содержащих тот же субстрат, который используется в культуре, и восстановленную воду до начала испытания. На регенерацию новых головных концов указывает зарывание

синхронизированных червей в субстрат (наличие регенерированных головных концов можно подтвердить исследованием репрезентативных дополнительных проб под бинокулярным микроскопом). Затем у тестовых организмов предполагается такое же физиологическое состояние. Это означает, что если размножение посредством морфаллаксиса происходит у синхронных червей во время испытания, то практически все особи, как ожидается, будут в равной степени подвержены воздействию обогащенного осадка. Кормление синхронизированных червей осуществляется сразу, как только черви начинают зарываться в субстрат или через 7 сут после расчленения. Режим кормления должен быть сопоставим с обычными культурами, но желательно кормить синхронизированных червей тем же источником питания, который используется в испытании. Червей содержат при температуре испытания, т. е. (20 ± 2) °С. Для испытания используют неповрежденных целых червей после регенерации, активно плавающих или ползающих при мягком механическом воздействии. Для того чтобы предупредить повреждение или аутотомию червей, используют, например, пипетку с оплавленными краями или стоматологические щипцы из нержавеющей стали для манипуляций с этими червями.

Источники стартовых культур для *Lumbriculus variegatus* (адреса в США соответствуют приведенным в [4]).

Europe

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R. — I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

U.S.A.

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

Приложение Д
(рекомендуемое)

Краткий отчет о результатах кольцевого испытания на токсичность осадка для *Lumbriculus variegatus*

Таблица Д.1 — Результаты выполнения отдельных кольцевых испытаний: среднее число червей в контроле и контроле на растворитель в конце испытания

	Среднее число червей в контроле	SD	CV, процент	n	Среднее число червей в контроле на растворитель	SD	CV, процент	n
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
Межлабораторное среднее	29,59		20,10		30,61		13,26	
SD	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
min	16,3				15,0			
max	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

Примечание — Условные обозначения, принятые в таблице: SD — стандартное отклонение; CV — коэффициент вариации.

Таблица Д.2 — Результаты выполнения отдельных кольцевых испытаний: средняя общая сухая масса червей на повторность в контроле и контроле на растворитель в конце испытания

	Общая сухая масса червей на повторность (контроль)	SD	CV, процент	n	Общая сухая масса червей на повторность (контроль на растворитель)	SD	CV, процент	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	33,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4

Окончание таблицы Д.2

	Общая сухая масса червей на повторность (контроль)	SD	CV, процент	n	Общая сухая масса червей на повторность (контроль на растворитель)	SD	CV, процент	n
Межлабораторное среднее	25,15		20,36		27,68		17,53	
SD	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
min	12,9				10,5			
max	41,3				41,4			
CV	31,3				26,8			
Примечание — Условные обозначения, принятые в таблице: SD — стандартное отклонение; CV — коэффициент вариации, %.								

Таблица Д.3 — Токсичность PCP: обзор конечных точек в кольцевом испытании; межлабораторное среднее для EC_{50}, NOEC и LOEC

Биологические показатели		Межлабораторное среднее, мг/кг			Межлабораторный коэффициент	SD	CV, процент	Геометр. среднее, мг/кг
			мин	макс				
Общее число червей	EC_{50}	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD; %	22,5	7,1	39,1				
Общая сухая масса червей	EC_{50}	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD; %	24,8	10,9	44,7				
Гибель/ выживаемость	LC_{50}	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	32,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Репродукция (увеличение числа червей на повторность)	EC_{50}	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD; %	29,7	13,9	47,9				
Прирост (увеличение биомассы на повторность)	EC_{50}	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD; %	32,2	13,6	65,2				
Примечание — Условные обозначения, принятые в таблице: MDD — минимальное детектируемое различие по сравнению с контрольными значениями во время проверки гипотез, используется в качестве показателя статистической мощности; SD — стандартное отклонение; CV — коэффициент вариации								

Приложение ДА
(справочное)

Сравнение структуры международного документа со структурой настоящего стандарта

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
Введение			1, 2, 3, 5	—
1	1.1	—	2	—
	1.2	—	4	—
2	2.1	—	Приложение 1	—
	2.2	—	Приложение 1	—
	2.3	—	Приложение 1	—
	2.4	—	Приложение 1	—
	2.5	—	Приложение 1	—
	2.6	—	Приложение 1	—
	2.7	—	Приложение 1	—
	2.8	—	Приложение 1	—
	2.9	—	Приложение 1	—
	2.10	—	Приложение 1	—
	2.11	—	Приложение 1	—
	2.12	—	Приложение 1	—
3	3.1	—	6	—
	3.2	—	7	—
	3.3	—	8	—
	3.4	—	9	—
4	4.1	—	10	—
	4.2	—	11	—
5	—	—	12	—
6	—	—	13	—
7	7.1	—	14	—
	7.2	—	—	—
	7.2.1	—	15	—
	7.2.2	—	16	—
	7.3	—	17	—
	7.4	—	—	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
7	7.4.1	—	18	—
	7.4.2	—	19	—
	7.5	—	—	—
	7.5.1	—	20	—
	7.5.2	—	21	—
	7.6	—	—	—
	7.6.1	а	22	a
		б		b
		в		c
		г		d
		д		e
		е		f
		ж		g
	7.6.2	—	23	—
	7.6.3	—	24	—
	7.6.4	—	25	—
	7.6.5	—	26	—
	7.6.6	—	27	—
	7.7	—	—	—
	7.7.1	—	28	—
	7.7.2	—	29	—
	7.7.3	—	30	—
8	8.1	—	31	—
	8.2	—	—	—
	8.2.1	—	32	—
	8.2.2	—	33	—
	8.3	—	—	—
	8.3.1	—	34	—
	8.3.2	—	35	—
	8.3.3	—	36	—
	8.3.4	—	37	—
	8.3.5	—	38	—
	8.4	—	—	—
	8.4.1	—	—	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
8	8.4.1.1	—	39	—
	8.4.1.2	—	40	—
	8.4.1.3	—	41	—
	8.4.2	—	42	—
	8.4.3	—	43	—
	8.4.4	—	44	—
	8.5	—	45	—
	8.6	—	—	—
	8.6.1	—	46	—
	8.6.2	—	47	—
	8.6.3	—	48	—
	8.6.4	а	49	a
		б		b
		в		c
		а		a
		б		b
		в		c
	8.6.5	—	50	—
	8.6.6	—	51	—
	8.6.7	—	52	—
	8.7	—	—	—
	8.7.1	—	—	—
	8.7.1.1	—	53	—
	8.7.1.2	—	54	—
	8.7.1.3	—	55	—
	8.7.1.4	—	56	—
	8.7.1.5	—	57	—
	8.7.2	—	—	—
	8.7.2.1	—	58	—
	8.7.2.2	—	59	—
9	9.1	—	—	—
	9.1.1	—	60	—
	9.1.2	—	61	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
9	9.1.3	—	62	—
	9.1.4	—	63	—
	9.1.5	—	—	—
	9.1.5.1	—	64	—
	9.1.5.2	—	65	—
	9.1.6	—	—	—
	9.1.6.1	—	66	—
	9.1.6.2	—	67	—
	9.2	—	68	—
	9.3	—	69	—
Приложение А			Приложение 2	
Приложение Б			Приложение 3	
Приложение В			Приложение 4	
Приложение Г			Приложение 5	
Приложение Д			Приложение 6	
Библиография			Литература	

Библиография

[1] EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I–IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg

[2] OECD(1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris

[3] ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA

[4] ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA

[5] Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279

[6] OECD (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 218: «Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment» (Adopted April 2004)

[7] U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000

[8] Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997

[9] Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL)

[10] BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin, 1995

[11] Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105–110

[12] ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03

[13] Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429

[14] OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23

[15] Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/

[16] Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, Lumbriculus variegatus, in different sediments. Chemosphere 51: 35–46

[17] Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). Lumbriculus variegatus, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. P. 205–215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials

[18] Chapman K.K., Benton M.J., Brinkhurst R.O. & Scheuerman P.R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes Lumbriculus variegatus and Tubifex tubifex for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271–278

[19] Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (Lumbriculus variegatus) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99–109

[20] Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to Ceriodaphnia dubia, Pimephales promelas, Hyalella azteca and Lumbriculus variegatus. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261–1266

[21] West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57–63

[22] Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885–1894

[23] Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468

[24] Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196–2202

[25] Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183–194

[26] Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of Lumbriculus variegatus Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292–302

[27] Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191–201

[28] Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872–885

[29] Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC

[30] Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of 14C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete Lumbriculus variegatus in artificial sediment. Chemosphere 59, 271–280.

[31] Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007

[32] Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000

[33] Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503–1508

[34] Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407–414

[35] Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94–103

[36] Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22

[37] OECD (1992b). Guidelines for Testing of Chemicals No. 203. Fish, Acute Toxicity Test. OECD, Paris

[38] OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris

[39] Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835–852

[40] Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10–20

[41] Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin

[42] Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163–1175

[43] Naylor, C. and C. Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303

[44] Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181–184

[45] Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111–124

[46] Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30

[47] Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Technol. 23, 588–595

[48] Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223–228

[49] Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244–1249

[50] OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France

[51] Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von Lumbriculus variegatus. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. Pp. 107–119

Дополнительная литература по статистическим методам:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096–1121

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482–491

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19–76. Cambridge Univ. Press

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591–611

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519–531

УДК 658.382.3:006.354 МКС 13.020.01 Т58

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, токсичность, водные черви, обогащенный осадок

Редактор *Е.В. Силитрина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Г.В. Яковлева*
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 09.11.2015. Подписано в печать 25.02.2016. Формат 60 ×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,18. Уч.-изд. л. 3,80. Тираж 32 экз. Зак. 544.

Набрано в ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
www. jurisizdat. ru gost.e-ecolog.ru

Издано и отпечатано во
ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru