МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33042— 2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Тест на репродуктивность дождевых червей

(Eisenia fetida/Eisenia andrei)

(OECD, Test No 222:2004, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

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 центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») на основе собственного аутентичного перевода на русский язык руководящего документа, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 октября 2014 г. № 71-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test No 222:2004 Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*) (ОЭСР, Тест № 222:2004 Тест на репродуктивность дождевых червей (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*))

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 ноября № 1748-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33042–2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г.

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

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

© Стандартинформ, 2015

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

Введение

Этот метод предназначен для оценки влияния химикатов в почве на репродуктивную способность (и другие сублетальные эффекты) дождевых червей *Eisenia fetida* (Savigny 1826) или *Eisenia andrei* (Andre 1963) [1, 2]. Тест прошел межлабораторную кольцевую проверку [3]. Руководство по оценке острой токсичности химикатов для дождевых червей было издано ОЭСР [4]. Существует много других международных и национальных руководств по определению острой и хронической токсичности для этого вида организмов [5–8].

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
Тест на репродуктивность дождевых червей (Eisenia fetida/Eisenia andrei)

Testing of chemicals of environmental hazard
Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andredi*)

Дата введения — 2015—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод оценки влияния химических веществ на репродуктивную функцию дождевых червей.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применяются термины с соответствующими определениям, приведенные в Приложении 1.

3 Принцип теста

Взрослых червей подвергают воздействию тестируемого вещества разной концентрации смешанного с почвой или, в случае пестицидов, внесенного в/на почву, в зависимости от способа их применения. Метод обработки зависит от цели теста. Диапазон тестируемых концентраций выбирается так, чтобы охватить те концентрации, которые вызывают сублетальные и летальные эффекты в течение восьми недель. Гибель и влияние вещества на рост взрослых червей определяют после 4 недель экспозиции. Взрослых особей удаляют из почвы и оценивают репродуктивность спустя 4 недели, проводя подсчет червей нового поколения. Репродуктивность червей, подвергшихся воздействию тестового вещества, сравнивают с контрольной, определяя недействующую концентрацию (NOEC) и/или показатель EC_x (например, EC_{10}, EC_{50}) по уравнению регрессии, чтобы оценить концентрацию, которая вызвала x%-уменьшение репродуктивной функции. Тестируемые концентрации должны охватывать широкий диапазон EC_x (например, включать EC_{10}, EC_{50}) так, чтобы EC_x рассчитывали, исходя из интерполяции, а не экстраполяции (см. Приложение 1)

4 Информация о тестируемом веществе

4.1 Должна быть известна следующая информация о тестируемом веществе:
- растворимость в воде;
- lg K_{ow};
- давление пара;
- доступная информация о судьбе и поведении в окружающей среде (например, о скорости фотолиза и гидролиза, если этого требуют условия применения тестируемого вещества).

4.2 Данный стандарт применим ко всем веществам независимо от их растворимости. Метод не применим к летучим веществам, у которых константа Генри или коэффициент распределения воздух/вода больше единицы или к веществам с давлением пара выше 0,0133 Па при 25 °С.

4.3 В данном стандарте не учитывается возможная деградация тестируемого вещества в период теста. Соответственно нельзя предположить, что концентрация вещества будет оставаться неизменной в течение всего теста. В этом случае рекомендуется химический анализ тестируемого вещества в начале и конце теста.

5 Вещество сравнения

NOEC и/или EC_x вещества сравнения должны быть определены, чтобы гарантировать адекватность условий лабораторного теста и убедиться, что реакция тестируемых организмов не изменяется статистически значимо со временем. Желательно проверять вещество сравнения, по крайней мере, один раз в год или, если тест проводится редко, параллельно с определением

токсичности тестируемого вещества. Карбендазим или беномил – подходящие вещества сравнения, которые, как показано, влияют на репродуктивность [3]. Значимые эффекты должны наблюдаться при содержании:

a) 1 и 5 мг действующего вещества (д.в.)/кг сухой почвы или b) 250-500 г/га (25-50 мг/м^2). Если вещество сравнения включено в тестируемую серию, то используют одну его концентрацию, а число повторностей должно быть то же, что и в контролях.

6 Достоверность теста

6.1 Контроль должен удовлетворять следующим критериям, чтобы считать результаты теста достоверными:

- каждая повторность (10 взрослых червей) должна производить не менее 30 молодых особей к концу теста;
- коэффициент варьирования репродукции должен быть не более 30%;
- гибель взрослых червей в течение первых 4 недель должна быть не более 10%.

6.2 Если тест не отвечает выше описанным критериям достоверности, то тестирование следует прекратить, до тех пор пока тест не будет удовлетворять критериям достоверности. Обоснование достоверности должно быть включено в отчет.

7 Описание теста

7.1 Оборудование

7.1.1 Следует использовать тестовые сосуды из стекла или другого химически инертного материала вместимостью 1-2 литра. Сосуды должны иметь поперечное сечение площадью около 200 см^2, так чтобы глубина влажного субстрата составляла 5–6 см, когда в сосуд добавляется 500-600 г сухого субстрата. Устройство сосудов должно обеспечивать постоянный газовый обмен между субстратом и атмосферой, быть на свету (для этой цели подходят перфорированные прозрачные крышки) и исключать выползание червей. Если количество субстрата в сосуде болше 500–600 г, то число червей в нем пропорционально.

7.1.2 Для теста требуется обычное лабораторное оборудование, включающее:

- сухое помещение;
- стереомикроскоп;
- pH-метр и фотометр;
- удобные и точные весы;
- соответствующая аппаратура для контроля температуры;
- соответствующая аппаратура для контроля влажности (не существенно, если сосуды имеют крышки);
- инкубатор или небольшая комната с кондиционером;
- водяная баня.

7.2 Приготовление искусственной почвы

7.2.1 Искусственная почва, используемая в этом тесте (5,7) должна иметь следующий состав (на сухую массу, 105 °С):

- 10 % сфагнового моха (pH 5,5-6,0, без видимых растительных остатков, тонко растертый и сухой);
- 20 % каолиновой глины (с содержанием каолинита около 30%);
- 0,3-1,0 % карбоната кальция ($CaCO_3$, пудра, аналитической чистоты) для доведения исходного pH почвы до 6,0±0,5;
- 70 % воздушно-сухого кварцевого песка (желательно тонкий песок с более 50 % частиц размером 50-200 мкм).

Примечания

1 Требуемое количество $CaCO_3$ будет зависеть от компонентов почвенного субстрата, включая корм для червей, и его следует определять в отдельных пробах почв непосредственно перед тестом. pH смешанного образца измеряют в 1 М растворе хлорида калия (KCl) или в 0,01 М растворе хлорида кальция ($CaCl_2$) [13].

2 Содержание органического углерода искусственной почвы может быть уменьшено, например, снижением содержания торфа до 4-5% и увеличением содержания песка, соответственно. С уменьшением содержания органического углерода адсорбция тестируемого вещества почвой (органическим углеродом) снижается, а доступность тестируемого вещества червям увеличивается. Было показано, что *Eisenia fetida* удовлетворяет критериям достоверности теста для полевых почв с более низким содержанием органического углерода (например, 2,7%) [14] и для искусственной почвы с содержанием торфа 5%. Поэтому нет

необходимости перед использованием такой почвы демонстрировать ее соответствие критериям достоверности, если содержание торфа ниже 5%.

3 Если в тесте дополнительно используют естественные почвы (например, при оценке риска высокого уровня), их пригодность и соответствие критериям достоверности должны быть продемонстрированы.

7.2.2 Сухие компоненты почвы тщательно перемешивают (например, в большом лабораторном миксере) в хорошо проветриваемом помещении. Перед началом теста сухую искусственную почву увлажняют добавлением деионизированной воды, чтобы достичь примерно половины требуемой влажности почвы, которая составляет 40-60% от максимальной водоудерживающей способности почвы (соответствует 50±10% влажности на сухую массу почвы). В этом случае при сжатии почвы рукой из нее не выделяется вода. Максимальная водоудерживающая способность (МВС) искусственной почвы определяют в соответствии с процедурой, описанной в Приложении 2 или стандарте ISO 11274 [15].

7.2.3 Если тестируемое вещество вносят на поверхность почвы или смешивают с почвой без воды, окончательное количество воды может быть добавлено в почву во время ее приготовления. Если тестируемое вещество смешивают с почвой с некоторым количеством воды, дополнительное количество воды можно добавить с тестируемым веществом (см. 7.5.1).

7.2.4 Влажность почвы определяют в начале и конце теста в соответствии с ISO 11465 [16], а pH почвы – согласно Приложению 3 или ISO 10390 [13]. Эти определения следует проводить в образце контроля и образцах каждой тестируемой концентрации. pH почвы следует корректировать, когда тестируют вещества, являющиеся кислотами или основаниями. Влажность почвы следует периодически контролировать во время теста взвешиванием сосудов (см. 8.1.2 и 8.2.3).

7.3 Выбор и подготовка тестовых животных

7.3.1 В тесте используют виды дождевых червей *Eisenia fetida* или *Eisenia andrei*. Для начала теста требуются взрослые черви возрастом от 2 месяцев до 1 года. Следует отбирать червей из синхронизированной культуры с однородной возрастной структурой (Приложение 4). Отдельные особи в тесте не должны отличаться друг от друга по возрасту более чем на 4 недели.

7.3.2 Отобранных червей следует акклиматизировать в искусственной почве в течение не менее одних суток. В течение этого времени червей следует кормить той же пищей, что в тесте (см. 8.3.1 и 8.3.3).

7.3.3 Группы из 10 случайно отобранных червей взвешивают в начале теста. Червей перед взвешиванием обмывают деионизированной водой, а избыток воды убирают с помощью фильтровальной бумаги. Масса одной особи червя должна составлять от 250 до 600 мг.

7.4 Подготовка тестируемых веществ

Два метода внесения тестируемого вещества в почву можно использовать: перемешивание тестируемого вещества с почвой (см. 7.5) и его внесение на поверхность почвы (см. 7.6). Выбор соответствующего метода зависит от цели теста. Обычно рекомендуется перемешивание тестируемого вещества с почвой. Кроме того, процедура внесения должна соответствовать практике применения вещества в сельском хозяйстве (например, опрыскивание - в случае жидких препаратов или применение пестицидов в виде специальных препаратов – гранул или средств для обработки семян). Следует избегать применения растворителей с тестируемым веществом, если растворители не обладают низкой токсичностью для дождевых червей, соответствующий контроль растворителей должен быть включен в тест (см. 8.1.3).

7.5 Перемешивание тестируемого вещества с почвой

7.5.1 Тестируемое вещество, растворимое в воде

Раствор тестируемого вещества в деионизированной воде готовят непосредственно перед началом теста в количестве, достаточном для приготовления всех растворов одной концентрации. В некоторых случаях может потребоваться сорастворитель, облегчающий приготовление тестируемого раствора. Следует приготовить такое количество раствора, которое соответствует окончательной влажности почвы (40-60% максимальной водоудерживающей способности почвы). Раствор тщательно перемешивают с почвенным субстратом перед помещением его в тестовый сосуд.

7.5.2 Тестируемое вещество, нерастворимое в воде

Тестируемое вещество растворяют в небольшом количестве подходящего органического растворителя (например, в ацетоне), вносят на поверхность и перемешивают с небольшим количеством кварцевого песка. Растворителю дают испариться в вытяжном шкафу в течение нескольких минут. Затем обработанный песок тщательно перемешивают с предварительно увлажненной искусственной почвой. Далее добавляют деионизированную воду, чтобы достичь влажности почвы, соответствующей ее 40–60% максимальной водоудерживающей способности и перемешивают почву. После этого почва готова для помещения ее в тестовый сосуд. Следует соблюдать предосторожность, связанную с возможной токсичностью некоторых растворителей для дождевых червей.

7.5.3 Тестируемое вещество, нерастворимое в воде и органических растворителях

Готовят смесь из 10 г тонко размолотого промышленного кварцевого песка необходимого для тестируемой концентрации количества тестируемого вещества. Эту смесь тщательно перемешивают с предварительно увлажненной искусственной почвой. Далее добавляют деионизированную воду, чтобы достичь влажности почвы, соответствующей ее 40–60% максимальной водоудерживающей способности и перемешивают почву. После этого почва готова для помещения ее в тестовый сосуд.

7.6 Внесение тестируемого вещества на поверхность почвы

7.6.1 Почву обрабатывают после того, как в нее посадили червей. Тестовый сосуд сначала заполняют увлажненной почвой и помещают на поверхность взвешенных дождевых червей. Здоровые черви обычно зарываются в субстрат, а остающиеся через 15 мин на поверхности считаются дефектными и подлежат замене. Новые черви должны иметь тот же общий вес, что и замененные.

7.6.2 Тестируемое вещество вносят на поверхность почвы через полтора часа после посадки червей, так, чтобы избежать прямого контакта тестируемого вещества с червями. Когда тестируемым веществом является пестицид, его можно наносить на поверхность в виде спрея. В этом случае тестируемое вещество следует наносить на поверхность почвы с помощью соответствующего лабораторного опрыскивателя аналогичного полевому опрыскивателю.

Перед обработкой снимают крышку сосуда и вставляют в него вкладыш, который предохраняет боковые стенки сосуда от опрыскивания. Вкладыш может быть изготовлен из тестового сосуда без основания. Обработку следует проводить при температуре20±2 °С и в зависимости от того применяется ли тестируемое вещество в виде водного раствора, эмульсии или дисперсии объем примененного тестируемого вещества должен составить от 600 до 800 мкл/м^2. Количество примененного вещества проверяют с использованием соответствующей калибровочной техники. Специфичные препаративные формы, такие как гранулы и протравители семян, применяют способами, используемыми в сельскохозяйственной практике.

7.6.3 Тестовые сосуды следует оставить открытыми в течение 1 ч, чтобы дать испариться летучим растворителям, если их использовали. Будьте внимательны – не дайте червям в это время выползти из тестовых сосудов.

8 Процедура теста

8.1 Тестируемые группы и контроли

8.1.1 Поместите 10 червей в сосуд с 500–600 г искусственной почвы (т.е. 50–60 г почвы на одного червя). Если используют большее количество почвы (это может быть в случае теста с пестицидами с особыми условиями применения, например, при обработке семян), то на 50–60 г почвы потребуется больше червей. Десять червей готовят для каждого контроля и сосудов с обработанной почвой. Червей промывают водой и затем помещают на фильтровальную бумагу, чтобы дать стечь лишней воды.

8.1.2 Во избежание системных ошибок в распределении червей по тестовым сосудам, следует оценить однородность тестируемой популяции, которую определяют взвешиванием 20 червей, случайным образом взятых из тестируемой популяции. При уверенности в однородности популяции, червей отбирают, взвешивают и рассаживают по тестовым сосудам случайным образом. После этого взвешивают каждый сосуд и определяют начальную массу, необходимую для последующего контроля влажности почвы в сосудах (см. 8.2.3). Тестовые сосуды закрывают как описано в 7.1.1 и помещают камеру испытаний.

8.1.3 Соответствующая подготовка контрольных вариантов для каждого из способов обработки описана в 7.5 и 7.6. В целом процедура контроля аналогична тесту с обработкой, за исключением того, что в контрольные варианты не вносят тестируемое вещество. При необходимости, органические растворители, кварцевый песок и другие средства добавляют в тех же количествах в контроли, если их используют при тестировании вещества. Если растворитель или другой носитель используют при добавлении тестируемого вещества, следует приготовить дополнительный контроль без носителя или тестируемого вещества и протестировать его, чтобы быть уверенным, что носитель не влияет на результат.

8.2 Условия теста

8.2.1 Температура теста – 20 ± 2 °С. Тест проводят в условиях контролируемых циклов света и темноты (желательно 16 ч света и 8 ч темноты) с освещением от 400 до 800 люкс в месте, где расположены тестовые сосуды.

8.2.2 Тестовые сосуды не аэрируют во время теста, но конструкция сосудов с крышками обеспечивает возможность газообмена, в то же время, гарантируя ограниченное испарение влаги (см. 7.1.1).

8.2.3 Содержание воды в почвенном субстрате поддерживают, периодически взвешивая тестовые сосуды (без крышек). Потери влаги восполняют деионизированной водой. Содержание воды может варьироваться в пределах 10% от исходного содержания в начале теста.

8.3 Кормление

8.3.1 Любой качественный корм годится для поддержания масса червей в течение теста. Опыт показывает, что молотый овес, коровий и конский навоз – подходящий корм. Следует удостовериться, что коров и лошадей, чей навоз используется, не подвергали воздействию таких веществ, как стимуляторы роста, нематициды или аналогичные ветеринарные препараты, которые могут оказать вредное воздействие на дождевых червей во время теста. Рекомендуется самостоятельно собранный коровий навоз, так как опыт показал, что продаваемый навоз, используемый как удобрение, может нанести вред червям. Навоз перед использованием должен быть воздушно-сухим, тонко растертым и пастеризованным.

8.3.2 Каждую свежую партию корма следует опробовать на нетестируемых червях, чтобы удостовериться в подобающем качестве корма. Рост червей и количество коконов не должно уменьшаться при использовании новой партии корма (как описано в условиях руководства ОЭСР 207 [4]).

8.3.3 Корм дают в первый день после посадки червей и обработки почвы тестируемым веществом. В каждый сосуд добавляют 5 г корма. В оставшиеся 4 недели теста кормление не производят. Примерно 5 г корма распределяют по поверхности почвы в каждом сосуде и увлажняют деионизированной водой (около 5-6 мл на сосуд). В дальнейшем корм дают раз в неделю в течение 4-х недельного теста. Если весь корм остается несъеденным, порции уменьшают, чтобы избежать развития грибов и плесени. Взрослых червей удаляют из почвы на 28-й день теста.

8.4 Выбор тестируемых концентраций

Имеющаяся информация о токсичности тестируемого вещества (например, данные острой токсичности [4] и/или данные предварительного диапазонного теста) помогают выбору соответствующих тестируемых концентраций. При необходимости, проводят диапазонный тест, например, с концентрациями 0,1; 1,0; 10, 100 и 1000 мг/кг сухой массы почвы. Достаточно одной повторности на каждую концентрацию и контроль. Продолжительность этого теста – 2 недели и к концу этого срока оценивают смертность червей.

8.5 Проект эксперимента

8.5.1 Так как однократная суммарная статистика не может быть рекомендована для данного теста, этот стандарт обеспечивает определение NOEC и EC_x. NOEC вероятно будет требоваться регулирующими органами в предсказуемом будущем. Более широко распространено использование EC_x, вытекающее из статистических и экологических предпосылок. Поэтому предлагаются три варианта, основанные на рекомендациях кольцевого репродукционного теста для червей энхитраид [17] .

8.5.2 При определении диапазона концентраций следует иметь в виду:

- для определения NOEC требуется не менее пяти/двенадцати концентраций в геометрической серии. Рекомендуется четыре повторности для каждой концентрации плюс восемь контролей. Концентрационный фактор в серии концентраций не должен превышать 2,0;
- для определения EC_x (например, EC_{10}, EC_{50}) рекомендуется адекватное количество концентраций, вызывающих не менее четырех статистически значимых откликов на эти концентрации;
- при комбинированном подходе, позволяющем определять как NOEC, так и EC_x, следует использовать восемь концентраций в геометрической серии. Концентрационный фактор – не более 1,8.

8.6 Продолжительность теста и измерения

8.6.1 На 28-й день живых взрослых червей осматривают и подсчитывают. Любое необычное поведение (например, неспособность закапываться в почву, обездвиженность) и особенности морфологии (например, открытые раны) регистрируют. Перенос почвы с червями на чистый лоток помогает поиску взрослых червей. Черви из почвы должны быть хорошо промыты деионизированной водой, а избыток воды удаляют, помещая червей на фильтровальную бумагу. Не обнаруженные черви регистрируются как умершие, так как предполагается, что такие черви умерли и разложились до конца теста.

8.6.2 Почву, удаленную из сосудов, помещают в них снова, но уже без удаленных взрослых червей. Далее почву инкубируют еще четыре недели при тех же условиях, за исключением кормления, которое производят только один раз в начале этой фазы теста (см. 7.3.3).

8.6.3 К концу 4-х недельного периода количество ювенильных червей, вылупившихся из коконов, и количество коконов подсчитывают с использованием процедуры, изложенной в Приложении 5. Все признаки вреда или ущерба, нанесенного червям в тестовый период, следует зарегистрировать.

8.7 Предельная концентрация теста

Если не наблюдается эффекта при наивысшей концентрации предварительного диапазонного теста (1000 мг/кг), то репродукционный тест следует представить как пороговый тест с концентрацией

1000 мг/кг. Предельная концентрация теста дает возможность показать, что NOEC для репродукции выше предельной концентрации и следует минимизировать количество червей, используемых в тесте. Восемь повторностей следует использовать как для обработанной почвы, так и для контроля.

9 Данные и отчет

9.1 Обработка результатов

9.1.1 Обзор обработки данных представлен в приложении 6, однако в настоящем стандарте не приводится специальной инструкции по статистической обработке результатов.

9.1.2 Один параметр – смертность. Изменение поведения взрослых червей (например, неспособность закапываться в почву, вытягивание вдоль стеклянной стенки тестового сосуда), особенности их морфологии (открытые раны) следует также принимать во внимание помимо учета молодых червей. Пробит-анализ [18] или логистическую регрессию обычно применяют, чтобы определить LC_{50}. Однако, в случае, когда эти методы не удобны для применения (например, если имеется менее трех концентраций с частичной смертностью), то можно использовать альтернативные методы. Они могут включать метод скользящего среднего [19], метод Спирмена-Кербера [20] или простую интерполяцию (например, геометрическое среднее LC_0 или LC_{100} вычисляют как квадратный корень LC_0, умноженный на LC_{100}).

9.1.3 Другой показатель – плодовитость (количество произведенных молодых червей). Кроме того, как и для диапазонного теста, все другие вредные признаки должны быть учтены в отчете. Статистический анализ требует вычисления среднего арифметического значения X и стандартного отклонения показателя репродуктивности для опытов с обработанными вариантами и контроля.

9.1.4 Если выполнен анализ варьирования, то стандартное отклонение s и степени свободы (df) могут быть заменены оценкой обобщенного варьирования, полученного с помощью ANOVA и ее степенями свободы, соответственно, – это варьирование не зависит от концентрации. В этом случае используют однократные показатели варьирования контроля и обработанных вариантов. Эти показатели обычно вычисляют с помощью коммерческих статистических пакетов программ, используя каждый сосуд как повторность.

9.1.5 Дальнейшая статистическая обработка зависит от того, распределены ли значения повторностей нормально и являются ли они однородными в отношении их варьирования.

9.2. Оценка NOEC

9.2.1 Предпочтительны мощные инструменты оценки. Следует использовать информацию, например, из предыдущего опыта кольцевых тестов или данные предыдущих опытов, при условии, что они нормально распределены. Варьирование гомодескатичности (равенство дисперсий случайных отклонений) наиболее критично. Опыт говорит, что варьирование возрастает с увеличением среднего. В этих случаях трансформация данных может привести к варьированию однородности. Кроме того, в такой трансформации предпочтительней опираться на данные предыдущих опытов, чем на данные текущих исследований.

Для однородных данных следует применять множественные t-тесты такие как тест Вильямса (α = 0,05, односторонний) [21, 22] или, в определенных случаях, тест Даннетта [23, 24]. Следует заметить, что в случае неравных повторностей, таблица t-значений должна быть откорректирована, как предлагают Даннет и Вильямс. Иногда из-за высокого варьирования, отклики не увеличиваются постоянно. В этом случае сильное отклонение от монотонности теста Даннетта наиболее вероятно. Если имеются отклонения варьирования однородности, то это может быть причиной для более основательного исследования возможных влияний на варьирование, чтобы решить могут ли быть применены t-тесты без потери многих их возможностей [25]. Альтернативно, когда данные демонстрируют варьирование однородности, могут применяться и, в целом, предпочтительнее t-тестов, такие множественные U-тесты, как U-тест Бонферони (согласно Холму [26]) или непараметрические тесты Джонкшира-Терпстра [27, 28] и Ширли [29, 30] (см. также Приложение 6).

9.2.2 Если проведен тест с предельной концентрацией и необходимые параметрические условия теста (нормальное распределение, однородность) соблюдены, то можно использовать парный t-тест Стьюдента или U-тест Манна-Уини [31].

9.3 Оценка EC_X

9.3.1 Чтобы вычислить любое значение EC_X используют регрессионный анализ (линейный или нелинейный) после получения соответствующей функции доза-отклик. Для роста червей (растущий отклик) EC_X-значения могут быть оценены подходящим методом регрессионного анализа [32]. Среди удобных функций для количественных данных (умершие/выжившие черви и количество молодых червей) – нормальные сигмоидные, логистические или функции Вейбулла, содержащие два или четыре параметра, некоторые из которых могут также моделировать отклики на низкие концентрации. Если функция доза-отклик описывается линейной регрессией, то перед оценкой EC_X значимый

коэффициент r^2 (коэффициент детерминации) и/или наклон графика определяют с помощью регрессионного анализа, вводя значение, соответствующее x% в уравнение регрессии. 95% значимый уровень вычисляют по Филлеру (цитировано по Финни [18]) или с помощью других современных методов.

9.3.2 Альтернативно отклик моделируют как процент или долю модельного параметра, которые интерпретируют как отклик. В этих случаях нормальная (логистическая, вейбулловская) сигмоидная кривая может быть легко получена из результатов регрессионной пробит-процедуры [18]. В этих случаях функцию взвешивания преобразуют в метрический отклик по Кристенсену [33]. Однако, если наблюдается гормезис (воздействие ультрамалых концентраций), пробит-анализ следует заменить логистической функцией с четырьмя параметрами или Вейбулловской функцией, предназначенной для нелинейной регрессионной процедуры [34]. Если не находится подходящей функции для описания зависимости доза-отклик, то можно использовать альтернативные методы оценки EC_X и пределов значимости, такие как метод скользящего среднего Томсона [19] и метод Спирмена-Кербера [20].

9.4 Отчет о тесте

Отчет о тесте должен включать следующую информацию:

Тестируемое вещество:

- идентификационное описание тестируемого вещества (партия, CAS-номер, чистота);
- свойства тестируемого вещества (lg K_{ow}, растворимость в воде, давление пара, константа Генри (H), информация о судьбе и поведении в окружающей среде).

Тестовый организм:

- используемые тест-организмы: вид, научное наименование, источник получения и условия разведения;
- возраст, диапазон размера (массы) тестового организма.

Условия теста:

- детальное описание тестовой почвы;
- максимальная водоудерживающая способность почвы;
- описание техники внесения тестируемого вещества в почву;
- характеристики вспомогательных веществ, используемых при внесении тестируемого вещества в почву;
- детали калибровки опрыскивающего оборудования, если необходимо;
- описание процедуры эксперимента;
- размер тестовых контейнеров и объем тестовой почвы;
- условия теста (интенсивность освещения, продолжительность циклов свет–темнота, температура);
- описание режима кормления; тип и количество корма, используемого в тесте, даты кормления;
- pH и содержание воды в почве в начале и конце теста.

Результаты теста:

- смертность взрослых червей (%) в каждом тестовом сосуде в начале и конце первых 4 недель теста;
- общая масса взрослых червей в начале теста в каждом сосуде;
- изменение массы живых червей (% от первоначального веса) в каждом тестовом сосуде после первых 4 недель теста;
- количество молодых червей в каждом тестовом сосуде в конце теста;
- описание патологических симптомов поведения;
- результаты, полученные для вещества сравнения;
- показатели LC_{50}, NOEC и/или EC_x (например, EC_{50}, EC_{10}) для репродукции (если они применимы) с диапазонами значимости, графиками моделей для их вычисления и вся необходимая информация, полезная для интерпретации результатов;
- график зависимости доза–отклик.

Должны быть представлены любые отклонения от процедуры, описанной в стандарте, и все необычные явления во время теста.

Приложение 1
(обязательное)

Термины и определения

В настоящем документе применены следующие термины и определениям:

EC_x (концентрация, вызывающая x% эффект): Концентрация, которая вызывает x% эффект на тестируемый организм по сравнению с контрольными данными, полученными в течение определенного периода времени. Например, EC_{50} – концентрация, вызывающая изменение показателя на 50%, характеризующего токсичность тестируемого вещества в течение определенного периода времени. Для данного теста эффективные концентрации выражаются как масса тестируемого вещества на единицу сухой массы тестируемой почвы или масса тестируемого вещества на единицу площади почвы.

LC_0 (концентрация, не вызывающая смертность): Концентрация тестируемого вещества, которая не убивает какой-либо

LC_{50} (медианное значение летальной концентрации): Концентрация тестируемого вещества, при которой погибает 50% тестируемых организмов в течение определенного периода времени. Для данного теста LC_{50} выражается как масса тестируемого вещества на единицу сухой массы тестируемой почвы или масса тестируемого вещества на единицу площади почвы.

LC_{100} (тотально летальная концентрация): Концентрация тестируемого вещества, которая убивает 100% тестируемых организмов в течение определенного периода времени. Для данного теста LC_{100} выражается как масса тестируемого вещества на единицу сухой массы тестируемой почвы.

LOEC (самая низкая концентрация, при которой наблюдается эффект): Самая низкая концентрация вещества, которая вызывает статистически значимое влияние ($p < 0,05$). Для данного теста LOEC выражается как масса тестируемого вещества на единицу сухой массы тестируемой почвы или масса тестируемого вещества на единицу площади почвы. Все концентрации выше LOEC обычно оказывают эффект статистически отличный от контрольного. Любые отклонения от этого факта следует отмечать в отчете о тесте.

NOEC (недействующая концентрация): Самая высокая концентрация тестируемого вещества (первая ниже LOEC), при которой не наблюдается эффекта. Для данного теста концентрация, соответствующая NOEC, статистически значимо ($p < 0,05$) не отличается от контроля в течение периода проведения теста.

скорость репродукции: Среднее число молодых червей, приходящееся на взрослую особь в период теста.

Приложение 2
(справочное)

Определение максимальной водоудерживающей способности почвы

Признан подходящим следующий метод определения максимальной водоудерживающей способности почвы. Он описан в ISO DIS 11268-2 (Приложение C).

Отобрать определенное количество (например, 5 г) тестового почвенного субстрата, используя удобный пробоотборник (трубчатый бур и т.п.). Закрыть дно трубки с почвой куском фильтровальной бумаги и поместить ее на поддон в сосуд. Трубку постепенно затопить водой до верхнего уровня почвы. Оставить ее на три часа в воде. Затем извлечь трубку из воды, поставить на слой мокрого тонко растертого кварцевого песка, накрыть сверху стеклом (чтобы предотвратить высыхание почвы) и дать стечь воде, которая не удерживается капиллярами почвы, в течение двух часов. Трубку с почвой затем следует взвесить и высушить до постоянной массы при 105°C. Максимальную водоудерживающую способность почвы (МВС) вычисляют следующим образом:

МВС (в % сухой массы) = (S-T-D)/D*100

где:
S – масса почвы, насыщенной водой, + масса трубки + масса фильтровальной бумаги;
T – масса тары (трубки + фильтровальной бумаги);
D – сухая масса почвы.

Приложение 3
(справочное)

Определение pH почвы

Данный метод определения pH почвы основан на описании, данном в ISO 10390.

Определенное количество почвы высушивают при комнатной температуре не менее 12 часов. К навеске почвы (не менее 5 г почвы) добавляют 5 объемов 1 М раствора хлорида калия (KCl) аналитической чистоты или 0,01 М раствора хлорида кальция ($CaCl_2$) аналитической чистоты. Суспензию встряхивают 5 мин и оставляют для осаждения частиц почвы не менее чем на 2 ч (но не более 24 ч). pH жидкой фазы затем измеряют pH-метром, который откалиброван серией буферных растворов (например, pH 4,0 и 7,0).

Приложение 4
(рекомендуемое)

Культивирование *Eisenia fetida/Eisenia andrei*

Выращивание червей следует проводить в климатической камере при 20 ± 2 °С. При этой температуре и достаточном количестве корма черви вырастают в течение 2-3 месяцев.

Оба вида червей выращивают с использованием различных видов кормов. Рекомендуемый усредненный корм – смесь 50:50 конского или коровьего навоза и торфа. Следует убедиться, что коров и лошадей, чей навоз используется, не подвергали воздействию таких веществ, как стимуляторы роста, нематициды или аналогичные ветеринарные препараты, которые могут оказать вредное воздействие на дождевых червей во время теста. Рекомендуется самостоятельно собранный коровий навоз, так как опыт показал, что продаваемый навоз, используемый как удобрение, может нанести вред червям. Корм должен иметь pH примерно 6–7 (регулируется карбонатом кальция), низкую ионную проводимость (менее 6 мг или 0,5% концентрации солей) и не должен быть сильно загрязнен аммонием или мочей животных. Субстрат должен быть влажным, но не мокрым. Для выращивания червей удобны ящики вместимостью 10-50 л.

Для получения червей стандартного возраста и размера (массы), рекомендуется выращивание начинать с коконов. Как только культура червей получена, взрослых особей помещают в ящик для кормления со свежим кормом на 14–28 дней, чтобы начать производство коконов. Затем взрослых червей удаляют и молодые черви, полученные из коконов, служат основой для следующей культуры червей. Червей постоянно кормят и время от времени переносят в ящики со свежим кормом. Опыт показал, что высушенный и тонко размолотый коровий и конский навоз, а также размолотый овес являются наиболее подходящим кормом. Следует убедиться, что коров и лошадей, чей навоз используется, не подвергали воздействию таких веществ, как стимуляторы роста, нематициды или аналогичные ветеринарные препараты, которые могут оказать вредное воздействие на дождевых червей во время длительного культивирования. Черви, вылупившиеся из коконов, используются для тестов, когда они достигают возраста2–12 месяцев и считаются взрослыми червями.

Черви считаются здоровыми, если они передвигаются по субстрату, не стараются его покинуть и постоянно размножаются. Определить, что корм заканчивается, можно по червям, которые двигаются очень медленно и имеют желтоватый цвет конца. В этом случае рекомендуется добавление свежего корма или уменьшение количества червей в ящике.

Приложение 5
(рекомендуемое)

Техника подсчета молодых червей, вылупившихся из коконов

Ручная сортировка червей из почвенного субстрата занимает очень много времени. Поэтому рекомендуются следующие альтернативные методы:

a) Тестовый сосуд помещают в ванну с водой при температуре40 °С и повышают ее до 60 °С. В течение 20 мин молодые черви появляются на поверхности почвы, их легко собирают и подсчитывают.

b) Тестовую почву промывают через сито, используя метод, разработанный Ван Гестелом и др. [35] и предназначенный для смеси торфа, навоза или размолотого овса, добавленной к почве в виде тонко размолотого порошка. Два сита диаметром 30 см с размером отверстий 0,5 мм размещают одно над другим. Содержимое тестового контейнера промывают на сите мощной струей воды, оставляя молодых червей и коконы в основном на верхнем сите. Важно отметить, что вся поверхность верхнего сита должна оставаться мокрой во время этой операции, чтобы молодые черви плавали в пленке воды и не пытались проскочить через отверстия сита. Лучшие результаты получают при использовании душевой насадки, а не крана.

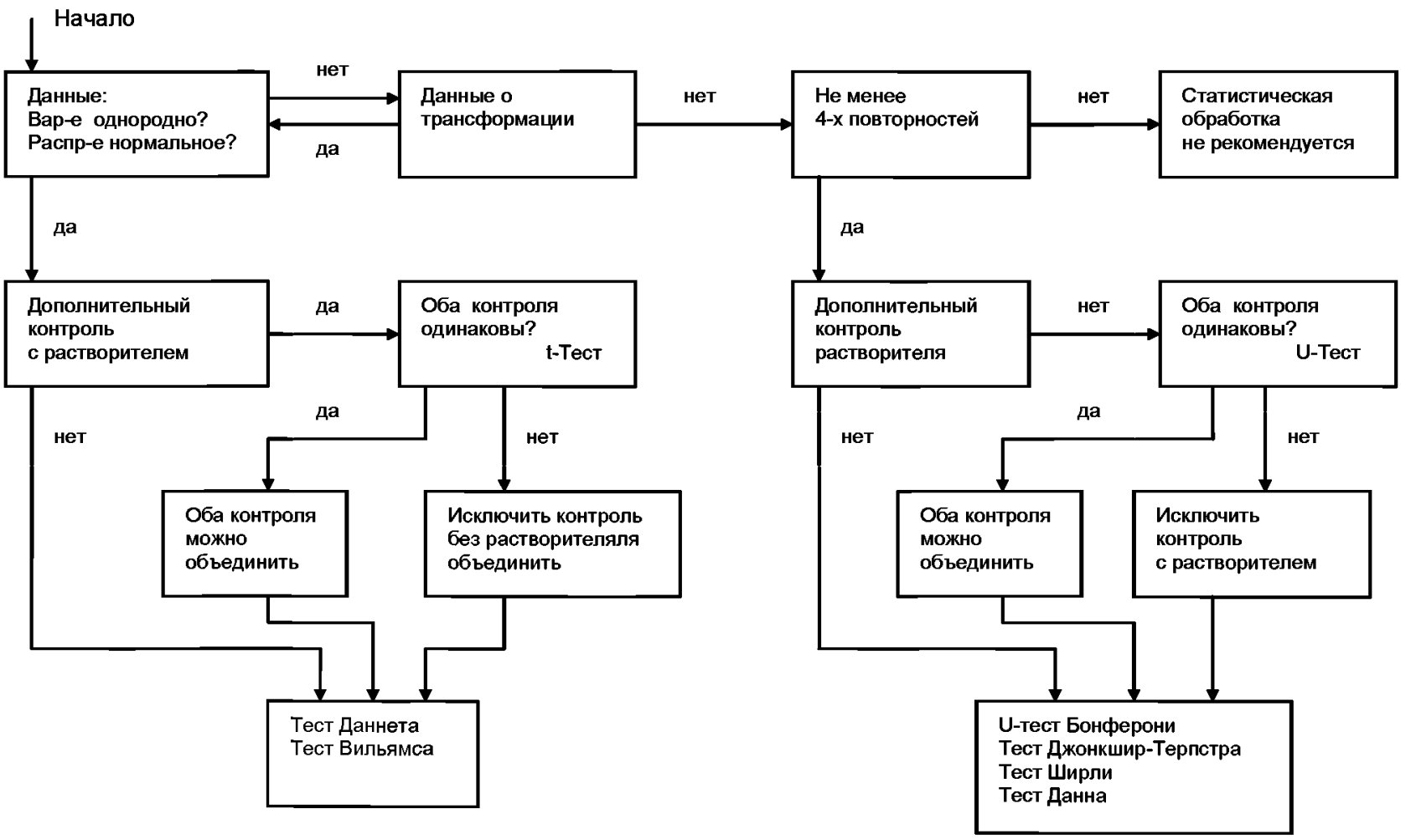
Как только почвенный субстрат промыт через сито, молодых червей и коконы смывают с верхнего сита в чашку. Чашке с содержимым дают постоять, чтобы пустые коконы всплыли, а молодые черви и коконы осели на дно. Воду из чашки сливают, а молодых червей и коконы переносят в чашку Петри с небольшим количеством воды. Червей можно удалять для подсчета из чашки Петри с помощью иглы и пинцета.

Опыт показал, что метод a) более пригоден, так как во втором методе черви могут проскочить через 0,5 мм сито.

Следует всегда определять эффективность метода извлечения червей и коконов, соответственно из почвенного субстрата. Если молодых червей собирают с помощью ручной сортировки, советуем проводить эту операцию дважды для всех образцов.

Приложение 6
(справочное)

Обзор статистической оценки данных (определение NOEC)



Библиография

[1] Jaenicke, J. (1982). Eisenia foetida is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.
[2] Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm - III. Electrophoresis reveals that Eisenia foetida (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 - 282.
[3] Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species Eisenia fetida/ Eisenia andrei – comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
[4) OECD Guideline for testing chemicals 207. Earthworm acute toxicity test. Adopted: 4 April 1984.
[5] ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.
[6] ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.
[7] SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
[8] EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
[9] Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
[10] Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
[11] Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.
[12] Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
[13] ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality - Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
[14] Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
[15] ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.
[16] ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.
[17] Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.
[18] Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
[19] Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. - Charles Griffin & Company Ltd, London.
[20] 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.
[21] 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.
[22] Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
[23] Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
[24] Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
[25] Hoeven, N. van der (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols?Ecotoxicology 7: 355-361
[26] Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
[27] Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

[28] Terpstra, T. J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
[29] Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
[30] Williams, D.A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
[31] Sokal, R.R. and F.J. Rohlf (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
[32] Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.
[33] Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.
[34] Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.
[35] Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50 Т58 IDT

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, репродуктивная функция, дождевые черви

Подписано в печать 02.02.2015. Формат 60х84 1/8.

Усл. печ. л. 2,33. Тираж 33 экз. Зак. 809.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru