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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32426— 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Испытание ряски на угнетение роста

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»), Техническим комитетом по стандартизации ТК 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ», Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

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

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Туркмения	TM	Главгосслужба «Туркменстандартлары»
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 778-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32426—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test No. 221:2006 «Испытание ряски на угнетение роста» («Lemna spp. growth Inhibition», IDT).

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

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Май 2019 г.

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

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

Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

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

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Термины и определения . . . 1
3 Принцип теста . . . 2
3.1 Основные положения . . . 2
3.2 Информация относительно тестируемого вещества . . . 3
3.3 Применимость теста . . . 3
3.4 Референтное вещество . . . 3
4 Описание метода . . . 3
4.1 Оборудование . . . 3
4.2 Тестовый организм . . . 3
4.3 Культура . . . 4
4.4 Тестовая среда . . . 4
4.5 Экспериментальный раствор . . . 4
4.6 Тестовые и контрольные группы . . . 5
4.7 Воздействие . . . 5
4.8 Условия инкубации . . . 6
4.9 Продолжительность . . . 6
4.10 Измерения и аналитические определения . . . 6
4.11 Частота измерений и аналитических определений . . . 7
4.12 Лимитирующий тест . . . 7
5 Результаты и отчет . . . 7
5.1 Время удвоения . . . 7
5.2 Переменные . . . 8
5.3 Средняя удельная скорость роста . . . 8
5.4 Урожайность . . . 9
5.5 Кривая концентрация — эффект . . . 9
5.6 Оценка EC_x . . . 9
5.7 Статистические методы . . . 9
5.8 Отчет . . . 10
Приложение А (справочное) Описание *Lemna* spp. . . . 12
Приложение В (справочное) Обслуживание маточной культуры . . . 13
Приложения С (рекомендуемое) Питательная (культивационная) среда . . . 14
Библиография . . . 18

Введение

Настоящий стандарт описывает определение токсичности веществ с использованием видов: ряска горбатая (*Lemna gibba*) и ряска малая (*Lemna minor*). Таксономия *Lemna* spp. является трудоемкой по причине существования большого количества фенотипов. Хотя *Lemna* может проявить генетическую изменчивость в качестве ответной реакции на яды, в настоящее время недостаточно данных по вопросу этой изменчивости, чтобы рекомендовать для использования какую-либо определенную генетическую линию. Необходимо отметить, что тест не проводят в стерильных (аксенных) условиях, но он включает процедуры по минимизации другими организмами.

Метод основан на руководящих принципах [1]—[6], но включает модификации этих методов, отражая недавние исследования и консультацию в ряде ключевых вопросов. Предложенный метод был утвержден международным межлабораторным тестом [7].

Описаны детали тестирования с обновлением (полустатический и проточный эксперименты) и без обновления (статический) культивационной среды. В зависимости от целей рекомендуется применять полустатический и проточный эксперименты для летучих, фотодеградируемых, выпадающих в осадок и биоразлагаемых веществ, дополнительное руководство дано в [8].

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

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Испытание ряски на угнетение роста

Testing of chemicals of environmental hazard. Lemna spp. growth inhibition test

Дата введения — 2014—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод оценки токсичности веществ по действию на пресноводные растения рода *Lemna* (ряска).

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **биомасса** (biomass): Сухой вес живого вещества, присутствующего в популяции. В рамках этого теста биомасса измеряется косвенно, как правило, по количеству пластинок и площади их покрытия, поэтому термин «биомасса» относится к этим параметрам.

2.2 **хлороз** (chlorosis): Пожелтение зеленой пластинки.

2.3 **клон** (clone): Организм или клетка, появившиеся от одной особи неполовым путем. Организмы одного и того же клона генетически идентичны.

2.4 **колония** (colony): Означает совокупность пластинок материнской и дочерней особей (обычно две — четыре), прикрепленных друг к другу. Иногда используют термин «растение».

2.5 **EC_x:** Концентрация тестируемого вещества, растворенного в тестируемой среде, которая приводит к сокращению роста *Lemna* на x % (например, 50 %) в пределах установленного периода воздействия (с точным указанием на стандартную продолжительность или продолжительность теста). Чтобы однозначно различать значения ЕС на измеряемые темпы роста, используют символ «E_rC» для темпа роста и «E_yC» для урожайности.

2.6 **проточный (динамический) тест** (flow-throwing): Тест, в котором тестовые растворы непрерывно обновляются.

2.7 **пластинка (зеленая пластинка)** (frond): Индивидуальная/единственная «листоподобная» структура растения ряски. Редуцированные лист и стебель растения. Это наименьшая единица ряски, способная к воспроизводству.

2.8 **горб** (gibbosity): Вздутие или утолщение, появляющееся на пластинке.

2.9 **рост** (growth): Увеличение измеряемой переменной (например, количества пластинок, сухого веса, живого веса или площади покрытия пластинок) за период тестирования.

2.10 **скорость (темп) роста [средний удельный темп (скорость) роста]** [growth rate (average specific growth rate)]: Логарифмическое увеличение биомассы во время периода воздействия.

2.11 **наименьшая эффективная наблюдаемая концентрация** [lowest observed effect concentration (LOEC)]: Самая низкая концентрация, при которой вещество оказывает статистически достоверный ингибирующий эффект на рост ($p < 0,05$) при сравнении с контролем, в пределах определенного периода воздействия. Однако все тестируемые концентрации выше LOEC должны иметь токсический эффект, равный или больший LOEC. Если эти два условия не могут быть выполнены, должно быть дано развернутое объяснение для полученного LOEC (и, следовательно, NOEC).

Издание официальное

2.12 **измеряемые переменные** (measurement variables): Все типы переменных, которые измеряются в течение теста по одному или нескольким параметрам. В настоящем стандарте имеются в виду количество пластинок, живой и сухой вес.

2.13 **монокультура** (monoculture): Культура с одного вида растений.

2.14 **некроз** (necrosis): Мертвые ткани пластинок (то есть побелевшие или утонувшие).

2.15 **неэффективная наблюдаемая концентрация** [no observed effect concentration (NOEC)]: Тестовая концентрация, меньшая LOEC.

2.16 **фенотип** (phenotype): Видимые особенности организма, определенного взаимодействием его генов с окружающей средой.

2.17 **изучаемая переменная** (response variable): Переменные для оценки токсичности, полученной из любого измеряемого параметра, описывающие биомассу различными методами расчета. В настоящем стандарте это темп роста и урожайность, полученные из таких измеряемых переменных, как количество пластинок, живой или сухой вес, площадь поверхности пластинок.

2.18 **полустатический тест** [semi-static (renewal) test]: Тест, в котором тестовый раствор периодически заменяется в определенные интервалы времени во время теста.

2.19 **статический тест** (static test): Метод тестирования без обновления тестируемого раствора во время эксперимента.

2.20 **изучаемое влияние** (test endpoint): Общий фактор, который будет изменяться по сравнению с контрольным (далее — контроль) тестируемого вещества. В настоящем стандарте изучаемое влияние — ингибирование роста, который может быть выражен различными изучаемыми переменными, основанными на одной или более измеряемых переменных.

2.21 **тестовая (экспериментальная) среда** (test medium): Полностью синтетическая среда, в которой растут тестовые растения и в которую добавляют тестируемое вещество. Тестируемое вещество обычно растворяется в тестовой среде.

2.22 **урожайность** (yield): Изучаемая переменная, выражающая биомассу в конце периода воздействия за вычетом этой переменной в начале теста.

3 Принцип теста

3.1 Основные положения

3.1.1 Монокультура растений рода *Lemna* в экспоненциальной фазе роста содержится в различных концентрациях тестируемого вещества в течение семи дней. Цель теста состоит в том, чтобы определить количество связанных с веществом эффектов на рост растений за этот период, основанный на оценках выбранных переменных. Количество зеленых пластинок — основная из измеряемых переменных, но также измеряют по крайней мере еще одну переменную (общую площадь листьев, сухой вес или живой вес), так как некоторые вещества могут влиять на другие параметры значительно сильнее, чем на количество зеленых пластинок. Для количественной оценки эффектов, связанных с веществом, рост ряски в тестируемом растворе сравнивают с контролем, и концентрацию, вызывающую x % ингибирования роста (например, 50 %), определяют как EC_x (например, EC_{50}).

3.1.2 В данном исследовании наблюдаемый эффект торможения роста выражается в виде логарифмического увеличения переменной (средняя удельная скорость роста) в течение периода воздействия. Концентрация, вызывающая процент ингибирования роста (например, 50 %), определяется по средней удельной скорости роста по отношению к серии разбавлений и выражается в E_rC_x (например, E_rC_{50}). От средних определенных темпов роста, зарегистрированных в ряду испытательных решений, концентрация, вызывающая указанное замедление темпа роста на x % (например, 50 %), определена и выражена как E_rC_x (например, E_rC_{50}).

3.1.3 Основной тест также включает различные дополнительные исследования, используемые в методиках некоторых стран. Они определяются как разница между измерениями в конце и в начале периода воздействия. Концентрация, вызывающая процент ингибирования роста (например, 50 %), определяется по средней удельной скорости роста по отношению к серии разбавлений и выражается в E_rC_x (например, E_rC_{50}). От установленного среднего темпа роста, зарегистрированного в серии тестируемых концентраций, концентрация, вызывающая указанное x % ингибирование темпа роста (например, 50 %), определена и выражена как E_rC_x (например, E_rC_{50}).

3.1.4 Дополнительно могут быть статистически определены самая низкая вызывающая эффект концентрация (LOEC) и концентрация, не вызывающая эффекта (NOEC).

3.2 Информация относительно тестируемого вещества

3.2.1 Должен существовать достаточно чувствительный аналитический метод для определения количества вещества в тестируемой среде.

3.2.2 Информация о тестируемом веществе включает структурную формулу, чистоту, растворимость в воде, стабильность в воде и на свету, pK_a, K_{ow}, давление паров и способность к биодеградации. Растворимость в воде и давление паров можно использовать для расчета константы Генри, которая показывает вероятность существенных потерь тестируемого вещества во время тестирования. Это поможет узнать, нужны ли специфические меры для управления такими потерями. Если информация относительно растворимости и стабильности тестируемого вещества сомнительна, рекомендуется провести оценку в условиях теста, то есть в культивационной среде, температуре, режиме освещения, который будет использован в тесте.

3.2.3 Контроль pH среды может быть особенно важен, например, при тестировании металлов или нестабильных веществ в воде. В этом случае рекомендуется дополнительно к культивационной среде использовать буфер (см. 4.4). Более подробные пояснения по тестированию веществ с физико-химическими свойствами, затрудняющими исследование, представлены в [8].

3.3 Применимость теста

Результаты теста считают достоверными, если время удвоения количества зеленых пластинок в контроле составляет меньше 2,5 дня (60 часов), соответствуя приблизительно семикратному увеличению через семь дней и средним удельным темпам роста 0,275 день$^{-1}$. Использование культивационной среды и условия эксперимента, описанные в настоящем стандарте, позволяют достичь этого критерия в статичном тесте [5]. Этот критерий также достижим при полустатичном и проточном экспериментах. Расчет времени удвоения приведен в 5.1.

3.4 Референтное вещество

Для проверки процедуры тестирования можно использовать референтные вещества, такие как 3,5-дихлорфенол, использованный в международном межлабораторном тесте [7].

Желательно проверять референтное вещество по крайней мере два раза в год или, если тестирование выполняют редко, параллельно с определением токсичности тестируемого вещества.

4 Описание метода

4.1 Оборудование

4.1.1 Все оборудование, вступающее в контакт с тестовой средой, должно быть выполнено из стекла или другого химически инертного материала. Стеклянная посуда, используемая для культивирования и тестирования, должна быть стерилизована и очищена от всех химических загрязнений, которые могли бы попасть в тестовую среду. Тестовые емкости должны быть достаточно широкими для зеленой массы различных колоний в контрольных емкостях, чтобы расти, не накладываясь друг на друга к концу теста.

Не имеет значения, если корни касаются оснований тестового сосуда, но минимальная глубина не должна быть менее 20 мм и минимальный объем не должен быть менее 100 мл для каждого тестового сосуда. Тип тестовой емкости не важен, если он отвечает этим требованиям. Это могут быть стеклянные стаканы, кристаллизаторы или чашки Петри соответствующих размеров.

Тестовые емкости должны быть накрыты для минимизации испарения и случайных загрязнений, не нарушая необходимого воздухообмена. Соответствующие тестовые емкости, и особенно покрытие, не должны создавать затенения или изменения в спектре освещения.

4.1.2 Культуры и тестовые емкости не следует содержать вместе. Это лучше всего сделать, используя отдельные помещения для культивации, инкубаторы. Освещение и температура должны быть управляемы и поддерживаться на постоянном уровне (см. 5.8.1 и 5.8.2).

4.2 Тестовый организм

4.2.1 Организмом, используемым для этого теста, является *Lemna gibba (L. gibba)* или *Lemna minor (L. minor)*. Краткие описания видов ряски, которые используют для тестирования токсичности, даны в приложении А. Растительный материал может быть получен из коллекции культуры, другой лаборатории или собран в природе. Если материал собран в природе, растения следует содержать в той же питательной среде, которую используют для теста, минимум восемь недель до использования.

Участки отбора образцов для стартовой культуры в природе должны быть свободными от очевидных источников загрязнения. Если образцы получены из другой лаборатории или коллекции культуры,

они должны быть также выдержаны минимум три недели. Об источнике растительного материала, так же как о виде растений и клона (если известно), используемых для эксперимента, нужно всегда сообщать в отчете.

4.2.2 Следует использовать монокультуры, которые явно свободны от загрязнения другими организмами, такими как водоросли и простейшие. Здоровые растения *L. minor* будут состоять из колоний, содержащих от двух до пяти зеленых пластинок, в то время как колонии *L. gibba* могут содержать до семи пластинок.

4.2.3 Качество и однородность растений, используемых для теста, имеют существенное влияние на результат теста и поэтому должны быть отобраны с особым вниманием. Следует использовать молодые, быстро растущие растения без видимых повреждений или обесцвечивания (хлороза). Культуры хорошего качества имеют большое количество колоний, содержащих не менее двух пластинок. Большое количество колоний с одной пластинкой является признаком стресса, такого как недостаток питательных веществ, и растительный материал таких культур не следует использовать для тестирования.

4.3 Культура

4.3.1 Чтобы уменьшить частоту обслуживания культуры (например, когда не планируют тесты с *Lemna*), культуру можно содержать под уменьшенным освещением при температуре 4 °С — 10 °С. Детали культивирования даны в приложении В. Очевидные признаки загрязнения водорослями или другими организмами могут потребовать поверхностной стерилизации образца пластинки *Lemna* и смены среды на свежую (см. приложение В). В этом случае необходимо отказаться от сохранения загрязненной культуры.

4.3.2 По крайней мере за семь дней до тестирования культуру асептически пересаживают в свежую среду и культивируют в течение 7—10 дней при условиях теста.

4.4 Тестовая среда

4.4.1 Рекомендуются различные среды для *L. minor* и *L. gibba,* описанные ниже. Необходимо с осторожностью использовать pH-буферы в тестовой среде [MOPS ((4-морфолино)пропан сульфокислота, CAS 1132-61-2) в среде для *L. minor* и $NaHCO_3$ в среде для *L. gibba*], если есть подозрение, что буфер может реагировать с тестируемым веществом и оказать влияние на показатели токсичности. Среду [9] Штейнберга (Steinberg) можно использовать при соблюдении критериев достоверности.

4.4.2 Модификация среды шведского стандарта (SIS) для *Lemna* рекомендуется для культивирования и тестирования *L. minor.* Состав этой среды дан в приложении С.

4.4.3 Среда роста 20X—AAP, описанная в приложении С, рекомендуется для культивирования и тестирования *L. gibba*.

4.4.4 Среда Штейнберга, описанная в приложении С, также подходит для *L. minor*, но может быть также использована для *L. gibba*, если отвечает критериям достоверности.

4.5 Экспериментальный раствор

4.5.1 Экспериментальные растворы обычно готовят разбавлением маточного раствора. Маточные растворы обычно готовят растворением тестируемого вещества в культивационной среде.

4.5.2 Самая высокая тестируемая концентрация испытуемого вещества не должна превышать его растворимость в воде при условиях тестирования. Нужно отметить, однако, что виды *Lemna* spp. плавают на поверхности и могут быть подвергнуты воздействию веществ, которые аккумулируются в водно-воздушном пространстве (например, плохо растворимые в воде, гидрофобные или поверхностно-активные вещества). В этом случае воздействие будет результатом других концентраций, отличных от тестовых и превышающих растворимость исследуемого вещества в воде.

Для плохо растворимых веществ может потребоваться подготовить концентрированный маточный раствор или дисперсию вещества, используя органический растворитель или диспергатор для облегчения добавления точных количеств тестируемого вещества к испытательной среде и ее более легкой дисперсии и растворения. Использования этих веществ необходимо по возможности избегать. Растворители и диспергаторы не должны обладать фитотоксичностью. Например, ацетон и диметилформамид являются примерами растворителей, которые не вызывают фитотоксичность при концентрациях до 100 мкл/л. Если используют растворитель или диспергатор, их конечная концентрация должна быть сведена к минимуму и не превышать 100 мкл/л. Концентрация этих веществ должна быть одинаковой во всех тестах, и это должно быть указано в отчете об исследовании. Более подробное руководство по использованию диспергаторов дано в [8].

4.6 Тестовые и контрольные группы

4.6.1 Данные о предварительной токсичности тестируемого вещества для ряски *Lemna* могут быть полезны в отборе подходящих тестовых концентраций. В финальном тесте по определению токсичности должно быть по крайней мере пять экспериментальных концентраций, взятых в геометрической прогрессии. Желательно, чтобы фактор разведения между тестовыми концентрациями не превышал 3,2, но может быть использован больший фактор, если кривая концентрация — эффект имеет нулевой наклон. Использование менее пяти концентраций должно быть обосновано. Должно быть по крайней мере три дублирования для каждой тестовой концентрации.

4.6.2 Выбор диапазона тестовых концентраций (тест для определения диапазона и/или финальный тест определения токсичности) должен учитывать следующее:

- для определения EC_x тестовые концентрации должны быть подтверждены величинами EC_x необходимого уровня достоверности.

Пример — При оценке EC_{50} самая высокая тестовая концентрация должна быть больше, чем величина EC_{50}. Если EC_{50} выходит за пределы диапазона тестовых концентраций, доверительный интервал слишком велик, есть риск того, что сделать соответствующую статистическую оценку модели не представляется возможным;

- если целью является оценка LOEC/NOEC, самая низкая тестовая концентрация должна быть достаточной для того, чтобы рост не был значительно меньше, чем в контроле. Кроме того, самая высокая тестовая концентрация должна быть достаточно высокой для того, чтобы рост был значительно ниже, чем в контроле. Если дело обстоит иначе, тест должен быть повторен с использованием другого диапазона концентраций (с учетом того, что самая высокая концентрация не должна превышать максимальную растворимость или верхний разрешенный предел концентрации, например 100 мг/л).

4.6.3 Каждый тест должен включать контроль, содержащий ту же самую питательную среду, количество пластинок и колоний, условия окружающей среды и процедур тестирования, как и тестовые емкости, но без исследуемого вещества. Если дополнительно применяют растворитель или диспергатор, проводят дополнительный контроль с растворителем или диспергатором в тех же концентрациях, что и в экспериментальных емкостях. Число повторностей в контроле (и контроль с растворителем, если применимо) должно быть по крайней мере равным и в идеале дважды превышать количество емкостей, используемых для каждой тестовой концентрации.

4.6.4 Если определение NOEC не требуется, концепция эксперимента может быть изменена в сторону увеличения количества концентраций и сокращения количества повторностей. Количество повторений контроля должно быть не меньше трех.

4.7 Воздействие

4.7.1 Колонии, состоящие из двух — четырех зеленых пластинок, берут из маточной культуры и переносят в тестовые емкости в асептических условиях. Каждая экспериментальная емкость должна содержать в общей сложности 9—12 пластинок. Число пластинок должно быть одинаковым во всех экспериментальных емкостях. Опыт, полученный в ходе международных межлабораторных испытаний с этим методом, показал, что использование трех повторов, содержащих изначально по 9—12 пластинок каждый, достаточно для обнаружения различия приблизительно 4 % — 7 % по ингибированию в темпах роста (10 % — 15 %, рассчитанных на урожай) между обработками [7].

4.7.2 Расположение экспериментальных емкостей в инкубаторе должно быть случайным, чтобы минимизировать влияние пространственных различий в интенсивности света или температуре. Расположение емкостей во время наблюдения (или чаще в случае перемещения емкостей) также следует проводить в случайном порядке.

4.7.3 Если предварительный тест стабильности исследуемого вещества показывает, что тестовая концентрация не может быть выдержана (то есть измеренная концентрация падения ниже 80 % начальной) в течение эксперимента (семь дней), рекомендуется проводить полустатический эксперимент. В этом случае культивационная среда в контроле и экспериментальных емкостях должна обновляться минимум дважды во время теста (например, на третий и пятый день). Частота замены среды зависит от стабильности тестируемого вещества; более высокая частота обновления может потребоваться для поддержания необходимых концентраций очень нестабильных или летучих веществ. В некоторых случаях может потребоваться динамический (проточный) эксперимент [8], [10].

4.7.4 Путь воздействия через лиственные аппликации (разбрызгивание) не описан в настоящем стандарте, взамен см. [11].

4.8 Условия инкубации

4.8.1 Применяют непрерывное освещение флуоресцентной лампой теплого или холодного белого света для обеспечения конечной интенсивности освещения в диапазоне 85—135 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ с длиной волны в диапазоне фотосинтеза (400—700 нм) на таком же расстоянии от источника света, как зеленые пластинки *Lemna* (эквивалент 6500—10 000 лк). Отклонения от указанной интенсивности света не должны превышать ± 15 %. Метод определения и измерения света, особенно тип датчика, влияет на точность измерения. Сферические датчики (которые определяют свет со всех углов выше и ниже уровня измерения) и косинусоидальные датчики (которые определяют свет со всех углов выше уровня измерения) предпочтительнее однонаправленных датчиков и дадут более высокую точность для многоточечного источника света, описанного в настоящем стандарте.

4.8.2 Температура в экспериментальных емкостях должна быть (24 ± 2) °С. pH среды в контроле не должен увеличиться больше чем на 1,5 единицы за время теста. Отклонение более 1,5 единицы не должно влиять на тест, если соблюдены критерии достоверности. Необходимо быть особенно внимательным к изменениям pH в ряде случаев, таких как нестабильные вещества или металлы [8].

4.9 Продолжительность

Тест заканчивается через семь дней после помещения растений в экспериментальные емкости.

4.10 Измерения и аналитические определения

4.10.1 В начале теста необходимо подсчитать количество зеленых пластинок в экспериментальных сосудах, не пропуская все отчетливо видимые пластинки. Количество пластинок, кажущихся нормальными или ненормальными, должно быть определено в начале теста, по крайней мере один раз каждые три дня во время периода воздействия (то есть по крайней мере дважды во время семидневного периода), и в конце эксперимента. Следует отмечать изменения в развитии растений (например, в размере зеленых пластинок, признаках некроза, хлороза или сгорбленности, распада колонии или потери плавучести, в длине и появлении корней). Существенные особенности тестовой среды (например, наличие нерастворенного материала, развитие водорослей в экспериментальных емкостях) также должны быть отмечены.

4.10.2 В течение теста в дополнение к определениям числа пластинок также измеряют действие тестируемого вещества на одну или больше следующих переменных:

- общая поверхность пластинок;
- сухой вес;
- живой вес.

4.10.3 Определение общей площади поверхности пластинок имеет преимущество в том, что она может быть установлена для каждого экспериментального сосуда и для контроля в начале, во время и в конце теста. Сухой или живой вес должен быть определен в начале теста от образца, взятого из используемой маточной культуры в начале и в конце теста из каждой экспериментальной и контрольной емкостей. Если площадь поверхности не измеряется, сухой вес более предпочтителен живому.

4.10.4 Общая площадь поверхности пластинок, сухой и живой вес могут быть определены следующим образом:

- общая площадь поверхности: общая площадь поверхности всех пластинок может быть определена анализом фотографии. Проекцию тестовой емкости и растений можно снять на видеокамеру (то есть помещая емкость в световой короб) и получающееся изображение перевести в цифровую форму. Калибровку осуществляют по известной площади поверхности тестовой емкости, которая позволяет определить площадь покрытия листовых пластинок. Необходимо соблюдать осторожность, стараясь не трогать растения в тестовой емкости. Другими более трудоемкими методами являются фотографирование тестовой емкости и растений, распечатывание фотографии, вырезание силуэтов колонии и дальнейший анализ с помощью миллиметровой бумаги. Другие методы также подходят (такие как соотношение коэффициента весов между областью силуэта колоний и общей площадью поверхности);
- сухой вес: все колонии собирают в каждом тестовом сосуде и ополаскивают дистиллированной или деионизированной водой. Растения раскладывают на фильтровальную бумагу для поглощения избытка воды и высушивают при температуре 60 °С до постоянного веса. Все фрагменты корней должны быть включены. Сухой вес должен быть выражен с точностью до 0,1 мг минимум;
- живой вес: все колонии переносят в предварительно взвешенную полистироловую трубку (или трубку из любого другого инертного материала) с просверленными маленькими (1-миллиметровыми) отверстиями в закругленном основании. Трубки центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин при

комнатной температуре. Затем содержимое трубок взвешивают и рассчитывают живой вес растений за вычетом веса полой трубки.

4.11 Частота измерений и аналитических определений

4.11.1 В условиях статического эксперимента pH в каждой емкости следует измерять в начале и конце теста. При полустатическом эксперименте pH измеряют в каждой партии нового тестового раствора до замены и также в старом «тощем» растворе.

4.11.2 Интенсивность освещения измеряют в ростовой камере, инкубаторе или в комнате в точках, находящихся на том же расстоянии от источников света, на котором будут находиться листья ряски. Измерение проводят по крайней мере одно во время теста. Температура тестовой среды, инкубатора или ростовой камеры измеряют не реже одного раза в день.

4.11.3 Во время теста концентрации тестируемого вещества определяют через соответствующие интервалы времени. При проведении статического теста концентрация тестируемого вещества должна быть измерена минимум в начале и конце теста.

4.11.4 В полустатических экспериментах, где предполагается, что концентрация тестируемого вещества не останется в интервале ± 20 % номинальной, необходимо анализировать все недавно приготовленные испытательные растворы при каждом обновлении тестируемой среды (см. 4.7.3).

Однако для тестов, где начальная концентрация тестируемого вещества не остается в пределах ± 20 %, но где существует достаточное количество фактов, подтверждающих, что начальные концентрации повторяются и стабильны (то есть находятся в пределах диапазона 80 % — 120 % начальной), химический анализ можно делать только для самых высоких и самых низких тестовых концентраций.

В любом случае определение концентрации тестируемого вещества перед обновлением должно быть выполнено для каждой повторности каждой тестируемой концентрации (или в емкости, в которой смешивают маточный раствор тестируемого вещества для последующего разбавления).

4.11.5 Схему, предложенную для полустатического эксперимента, можно применять и для динамических тестов с анализом в начале, середине и в конце эксперимента, но без анализа старой среды. В этом типе тестов скорость потока разбавителя и тестируемого вещества или маточного раствора тестируемого вещества следует проверять ежедневно.

4.11.6 Если окажется, что концентрация тестируемого вещества остается в пределах ± 20 % номинальной концентрации, измеренной в начале теста, при анализе результатов можно учитывать номинальную или измеренную концентрацию в начале теста. Если отклонение от номинальной или первоначальной концентрации не больше чем ± 20 %, анализ результатов должен быть основан на средней геометрической концентрации во время экспозиции или на моделях, описывающих снижение концентрации тестируемого вещества.

4.12 Лимитирующий тест

В некоторых случаях (например, когда предварительный тест показывает, что тестируемое вещество не имеет токсического эффекта при концентрациях до 100 мг/л или в пределах его растворимости в тестируемой среде) можно продолжать тест в целях сравнения реакции контрольной группы с экспериментальной (100 мг/л или концентрация, равная пределу растворимости). Настоятельно рекомендуется подкреплять эти тесты анализом концентрации воздействия. Все ранее описанные условия эксперимента и критерии достоверности относятся к этому тесту, за исключением того, что количество тестовых емкостей должно быть удвоено. Рост ряски в контрольной и экспериментальной группах может быть проанализирован с помощью статистических методов, применяемых для сравнения средних, например t-тест Стьюдента.

5 Результаты и отчет

5.1 Время удвоения

Чтобы определить время удвоения T_d числа зеленых пластинок и проверить исследование на соответствие критерию достоверности, используют следующую формулу

$$T_d = \ln\frac{2}{\mu}, \quad (1)$$

где μ — средний темп роста, определяемый, как описано в 5.3.1 и 5.3.2.

5.2 Переменные

5.2.1 Цель теста состоит в том, чтобы определить действие тестируемого вещества на рост растений рода *Lemna*. Настоящий стандарт описывает две переменные отклика. Для результатов эксперимента приемлемы переменные отклика (a) и (b):

(a) средний темп роста: эту переменную рассчитывают в соответствии с полученным откликом и вычисляют на основе логарифма числа пластинок и изменений в логарифмах другого параметра измерения (площадь поверхности пластинок, сухой или живой вес) по отношению ко времени (выраженному в днях) в контроле и каждой экспериментальной группе. Этот параметр иногда также называют «относительная скорость роста» [12];

(b) урожайность: эту переменную рассчитывают на основе изменений в числе пластинок и другого параметра измерений (площадь поверхности пластинок, сухой или живой вес) в контроле и в каждой экспериментальной группе до конца теста.

5.2.2 Ценность расчетной токсичности с этими двумя переменными несопоставима, и следует учитывать эту разницу в результатах теста. Значения EC_x, основанные на среднем темпе роста (E_rC_x), будут выше, чем результаты, основанные на урожайности (E_yC_x), если выдерживаются испытательные условия настоящего стандарта из-за математических отличий каждого подхода. Эта разница связана только с математическими расчетами и не свидетельствует о чувствительности этих двух переменных.

Понятие среднего удельного темпа роста основано на экспоненциальном росте ряски в неограниченной культуре, где токсичность оценивается на основе эффектов на скорость роста, независимо от абсолютного уровня определенного темпа роста в контроле, наклона кривой реакции на концентрацию или на продолжительность теста.

Результаты, основанные на переменной урожайности, зависят от всех других переменных. E_yC_x зависит от видоспецифических темпов роста ряски, используемых в каждом тесте, и от максимальной скорости роста, который может варьироваться между разными видами и даже между разными клонами. Эту переменную не следует использовать для сравнения чувствительности к ядам разных видов или даже разных клонов ряски.

5.2.3 Оценка токсичности должна быть основана на количестве зеленых пластинок и одной дополнительной переменной (площадь поверхности пластинок, сухой или живой вес), которые в большей степени отражают влияние на растение вещества, чем количество пластинок.

5.2.4 Количество пластинок, так же как любые другие измеряемые параметры (такие как общая площадь пластинок, сухой или живой вес), сводится в таблицу вместе с концентрациями тестируемого вещества для каждого измерения. Последующий анализ данных (например, для оценки LOEC, NOEC или EC_x) должен быть основан на весе каждой одинаковой переменной, а не усредненного значения для каждой группы обработки.

5.3 Средняя удельная скорость роста

5.3.1 Среднюю удельную скорость роста в течение определенного периода рассчитывают как логарифмическое увеличение темпа роста — количества пластинок и другой переменной (площадь поверхности пластинок, сухой или живой вес) — с помощью формулы (2) для каждой параллели опытных и контрольной групп

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}, \qquad (2)$$

где μ_{i-j} — средняя удельная скорость роста от времени i до j;

N_j — измеренная переменная в тесте или в контрольном сосуде во время j;

N_i — измеренная переменная в тесте или в контрольном сосуде во время i;

t — период времени от i до j.

Для каждой опытной группы и контроля рассчитывают величину удельной скорости роста наряду с расхождением оценок.

5.3.2 Среднюю удельную скорость роста следует рассчитывать для всего периода эксперимента (время i в вышеупомянутой формуле — начало теста, время j — конец теста). Для каждой тестовой и контрольной концентрации высчитывают среднюю скорость и расхождение. Кроме того, должен быть

рассчитан темп роста для оценки эффекта тестируемого вещества в период воздействия (например, анализ log-преобразованных кривых роста). Существенные различия между темпами роста разных групп и средним темпом роста показывают отклонение от экспоненциального роста. В этом случае консервативный подход позволяет сравнить отдельные темпы роста культур во время периода максимального ингибирования с контролем в то же самое время.

5.3.3 Процент ингибирования темпа роста I_r может быть вычислен для каждой тестируемой концентрации (опытная группа) согласно формуле

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \cdot 100, \quad (3)$$

где $\%I_r$ — процент ингибирования среднего темпа роста;
μ_c — среднее значение μ в экспериментальной группе;
μ_T — среднее значение μ в контрольной группе.

5.4 Урожайность

5.4.1 Эффекты на урожайность определяют на основе двух переменных: количества пластинок и дополнительной переменной (площадь поверхности пластинок, сухой или живой вес), измеренных в каждом тестовом сосуде в начале и конце эксперимента. Для сухого или живого веса начальную биомассу определяют на основе образца пластинок, взятых от той же самой партии, используемой для внесения в тестовые емкости. Для каждой тестируемой концентрации и контроля вычисляют среднее значение урожайности наряду с оценкой варианты. Средний процент ингибирования урожайности $\%I_y$ может быть вычислен для каждой экспериментальной группы следующим образом:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \cdot 100, \quad (4)$$

где $\%I_y$ — процент уменьшения урожайности;
b_c — финальная биомасса в контрольной группе;
b_T — финальная биомасса в опытной группе.

5.5 Кривая концентрация — эффект

Должны быть построены кривые концентрация — эффект, описывающие процент ингибирования в зависимости от концентрации с помощью переменных (I_y или I_r должны быть построены, как показано в 5.3.3 и 5.4.1) и log-концентраций.

5.6 Оценка EC_x

Оценка EC_x (например, EC_{50}) должна быть основана на среднем удельном темпе роста (E_rC_x) и на урожайности (E_yC_x), каждый из которых, в свою очередь, должен быть основан на количестве зеленых пластинок и одной дополнительной переменной (площадь поверхности пластинок, сухой или живой вес), так как некоторые вещества не оказывают заметного влияния на количество пластинок и другие переменные. Для расчета параметра токсичности для каждого уровня ингибирования x необходимы четыре значения EC_x: E_rC_x (количество пластинок), E_rC_x (площадь покрытия пластинок, сухой или живой вес), E_yC_x (количество пластинок) и E_yC_x (площадь покрытия пластинок, сухой или живой вес).

5.7 Статистические методы

5.7.1 Целью является установление количественных отношений концентрация — эффект с помощью регрессионного анализа. Возможно использование взвешенной линейной регрессии после проведения преобразований линеаризации значений наблюдаемого эффекта, например в пробит- или логит-анализе или анализе Вейбулла [13], но предпочтительно использование нелинейного регрессионного анализа, который обрабатывает неизбежные неточности данных и отклонения от прямого распределения. Эти отклонения могут быть сведены к нулю или к близким к нулю значениям с помощью преобразования и вмешательства в анализ [13]. Нужно отметить, что использование стандартных методов анализа, таких как пробит-, логит-анализ или преобразование Вейбулла, предназначено для количественных данных (например, смертность или выживание) и должно быть приспособлено для

переменных урожайность или скорость роста. Порядок определения значений EC_x от непрерывного ряда данных можно найти в [14]—[16].

5.7.2 Для каждой анализируемой переменной используют отношение концентрация — эффект для расчета оценки величины EC_x. По возможности должны быть определены 95%-ные пределы достоверности для каждой оценки. Критерии достоверности, описывающие данные модели регрессии, должны быть оценены статистически или графически. Регрессионный анализ должен быть основан на эффектах, выявленных в каждой емкости, а не на средних результатах группы.

5.7.3 Оценка EC_{50} и доверительные интервалы могут быть получены с помощью линейной интерполяции с помощью BOOTSTRP-программы [17], если доступные модели/методы регрессионного анализа дают некорректные данные.

5.7.4 Для оценки LOEC и, следовательно, NOEC необходимо сравнить средние значения экспериментальных групп с помощью метода анализа вариантов (ANOVA). Среднее значение для каждой концентрации должно быть сравнено со средней контроля с помощью тренда многократного сравнения или метода теста трендов. Могут быть полезны тесты Даннетта или Уильямса [18]—[21]. Необходимо проверить гипотезу дисперсионного анализа ANOVA на однородность различий. Эта оценка может быть выполнена графически или с помощью формального теста [22]. Подходящими являются тесты Левена (Levene) или Барлетта (Bartlett). Опровержение предположения об однородности дисперсии можно исправить путем логарифмического преобразования данных. Если неоднородность дисперсии экстремальна и не может быть исправлена преобразованием, рассматривают такие методы анализа, как регрессионная тенденция Джонкира (Jonkheere). Дополнительное руководство для определения NOEC можно найти в [16].

5.7.5 Недавние открытия привели к рекомендации отказаться от концепции NOEC и заменить ее EC_x, основанной на точечной регрессии оценки. Никакой ценности для x в этом тесте не было установлено для *Lemna*. Однако в диапазоне 10 % — 20 % целесообразнее (в зависимости от выбранной переменной ответа) и предпочтительнее установить EC_{10} и EC_{20}.

5.8 Отчет

Отчет об исследованиях должен включать следующее:

5.8.1 Тестируемое вещество:

- физическое состояние и физико-химические свойства, включая растворимость в воде;
- информация о химической идентификации (например, номер CAS), включая чистоту (примеси).

5.8.2 Тестируемый вид:

- научное название, клон (если известно) и источник.

5.8.3 Условия эксперимента:

- применяемая экспериментальная процедура (статический, полустатический или проточный тест);
- дата начала теста и его продолжительность;
- среда культивирования;
- описание экспериментального дизайна (тестовые емкости и покрытие, объемы растворов, число колоний и пластинок в эксперименте в начале теста);
- тестовые концентрации (номинальная и измеренная, если необходимо) и число повторов в каждой концентрации;
- методы приготовления маточного раствора и тестовых растворов, включая использование любых растворителей или диспергаторов;
- температура во время теста;
- источник света, интенсивность и однородность освещения;
- pH тестового раствора и контроля;
- концентрации тестируемого вещества и метод анализа с соответствующими качественными данными оценки (исследования достоверности, стандартные отклонения или пределы измерения);
- методы для определения числа зеленых пластинок и других измеряемых переменных (например, сухой вес, живой вес или площадь покрытия пластинок);
- все отклонения от настоящего стандарта.

5.8.4 Результаты:

- необработанные данные (количество пластинок и других переменных в каждом тестовом сосуде и в контроле в каждое наблюдение и каждый анализ);

- средства и стандартные отклонения для каждой измеряемой переменной;
- кривые роста для каждой концентрации (рекомендуется добавлять логарифмическое преобразование измеряемой величины, см. 5.3.2);
- время удвоения/темпа роста в контроле, основанном на количестве пластинок;
- расчетные переменные отклика для каждой одинаковой концентрации со средними значениями и коэффициент вариации для репликации;
- графическое представление отношений концентрация — эффект;
- оценка токсического эффекта для измеряемых переменных. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} и доверительные интервалы, связанные с ними. Если рассчитаны, LOEC и/или NOEC и статистические методы, используемые для их определения;
- если проведен анализ отклонений ANOVA, сила установленного воздействия (например, наименее существенное различие);
- любая обнаруженная стимуляция роста в любой тестовой концентрации;
- любые визуальные признаки фитотоксичности, а также наблюдения за тестовыми растворами;
- анализ результатов, включая любые влияния на результаты теста, вытекающие из отклонений от настоящего стандарта.

Приложение А
(справочное)

Описание *Lemna* spp.

Водное растение, обычно именуемое ряской (*Lemna* spp.), принадлежит к семейству рясковых, которое состоит из четырех родов. Их внешний вид и различные таксономии были описаны в [23], [24]. Виды *L. gibba* и *L. minor* представлены в областях с умеренным климатом и широко используются для тестов на токсичность. Оба вида имеют плавающую на поверхности или погруженную в воду дискообразную пластинку (стебель с листьями) и очень тонкий корень, исходящий из центра нижней поверхности каждого листа. *Lemna* spp. редко цветут и размножаются вегетативно, продуцируя новые пластинки [25]. По сравнению со взрослыми растениями молодые, как правило, светлее, имеют более короткие корни и состоят из двух-трех пластинок разных размеров. Маленький размер *Lemna* spp., ее простая структура, бесполое размножение и быстрая смена поколений делают данный вид очень подходящим для лабораторных испытаний [26], [27].

Из-за вероятного межвидового изменения в чувствительности только сравнения чувствительности в пределах вида являются действительными.

Примеры видов *Lemna*, которые использовались в испытаниях:

Lemna aequinoctialis: Eklund B. (1996). The use of the red alga Ceramium strictum and the duckweed Lemna aequinoctialis in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark N. A. (1925). The rate of reproduction of Lemna major as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935—941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp. Association Franзaise de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Dйtermination de l'inhibition de la croissance de Lemna minor. 10pp. Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) Lemna minor, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With Lemna gibba G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu Y., Kugimoto M. (1981). Lemna (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of Lemna paucicostata to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959—1969.

Lemna perpusilla: Clark J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (Lemna perpusilla). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert D. B., Shay J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481—483.

Lemna valdiviana: Hutchinson T.C., Czyrska H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Источники видов *Lemna*:

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel:+1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru oronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box\8002
Raleigh, NC\27695-8002
États-Unis
Tel: 001 (919) 515-7572
gost.e-ecolog.ru

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM

SUODE
Tel: +46 8 674 7240
Fax: +46 8 674 7636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
e-mail: gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru

Приложение В
(справочное)

Обслуживание маточной культуры

Маточная культура может содержаться при более низкой температуре (4 °С — 10 °С) в течение длительного времени. Среда культивирования *Lemna* может быть той же самой, но также могут быть использованы и другие более богатые питательными веществами среды.

Периодически многочисленные молодые светло-зеленые растения удаляют в стерильных условиях и переносят в новые емкости с культурой, содержащей новую среду. При содержании растений в более прохладных условиях, предложенных в настоящем стандарте, субкультивирование можно проводить с промежутками в три месяца.

Для выращивания растений следует использовать химически чистые (вымытые в кислоте) и стерильные стеклянные емкости, подготовленные с применением асептических методов обработки. Если маточная культура загрязнена водорослями или грибами, необходимо принять меры по ликвидации загрязнения. Что касается водорослей и большинства других загрязняющих организмов, может быть достаточно поверхностной стерилизации. Для этого берут образец загрязненного растения и отрезают корни. Затем энергично промывают растения в чистой воде, после чего погружают растения в 0,5%-ный раствор гипохлорита натрия на период от 30 с до 5 мин. Затем растения промывают стерильной водой и переносят в несколько различных емкостей, содержащих свежую питательную среду. Эта обработка убивает большую часть растений, особенно при длительной экспозиции, но немногие выжившие растения, как правило, оказываются свободными от загрязнения. В этом случае их можно использовать для посева новых культур.

Приложения С
(рекомендуемое)

Питательная (культивационная) среда

С.1 Рекомендуются различные среды для выращивания *L. minor* и *L. gibba*. Для *L. minor* можно применять измененную модифицированную среду Шведского института стандартизации (SIS), а для *L. gibba* — среду 20Х—ААР. Составы обеих сред даны ниже. При приготовлении этих сред используют реактивы или химические вещества аналитической степени чистоты и деионизированую воду.

С.2 Модифицированная культивационная среда (см. таблицу С.1) для выращивания ряски Шведского института стандартов (SIS):

- маточные растворы I—V стерилизуют автоклавированием (120 °С, 15 мин) или мембранной фильтрацией (размер пор 0,2 мкм);
- маточный раствор VI (и, если необходимо, дополнительный VII) стерилизуют только мембранной фильтрацией; он не должен быть автоклавирован;
- стерильные маточные растворы хранят в прохладном темном месте. Растворы I—V уничтожают через 6 мес, в то время как раствор VI (и дополнительный VII) имеет срок годности до 1 мес.

Таблица С.1 — Виды маточных растворов

№ маточного раствора	Вещество	Концентрация в маточном растворе, г/л	Концентрация в готовой среде, мг/л	Готовая среда	
				Элемент	Концентрация, мг/л
I	$NaNO_3$ KH_2PO_4	8,50 1,34	85 13,4	Na; N K; P	32; 14 6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	1,0 0,20 0,010 0,050 0,0050 0,010	1,0 0,20 0,010 0,050 0,0050 0,010	B Mn Mo Zn Cu Co	0,17 0,056 0,0040 0,011 0,0013 0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ Na_2-EDTA$\cdot 2H_2O$	0,17 0,28	0,84 1,4	Fe —	0,17 —
VII	MOPS (буфер)	490	490		

Для приготовления одного литра среды SIS добавляют следующие ингредиенты к 900 мл деионизированной воды:

- 10 мл маточного раствора I;
- 5 мл маточного раствора II;
- 5 мл маточного раствора III;
- 5 мл маточного раствора IV;
- 1 мл маточного раствора V;
- 5 мл маточного раствора VI;
- 1 мл (необязательно) маточного раствора VII.

Примечание — Маточный раствор VII (буфер MOPS) может быть необходим для некоторых тестируемых веществ (см. 3.2.3);

- pH должен равняться (6,5 ± 0,2) с 0,1 или с 1 М HCl или NaOH, и далее объем доводят до 1 л деионизированной водой.

С.3 Среда 20Х—ААР

Маточный раствор готовят в стерильной дистиллированной или деоинизированной воде.

Стерильный маточный раствор следует хранить в прохладном темном месте. В этих условиях маточный раствор хранят не более 6—8 нед.

Пять питательных маточных растворов (А1, А2, А3, В и С) (см. таблицу С.2) готовят для среды 20Х—ААР с использованием реактивов аналитической степени чистоты. Культивационная среда состоит из 20 мл каждого маточного раствора, добавленных примерно к 850 мл деионизированной воды. pH устанавливают (7,5 ± 0,1) с помощью 0,1 или 1 М растворов HCl или NaOH. Далее объем раствора доводят до 1 л деионизированной водой. Среду для достижения стерильности фильтруют через фильтр с ячейкой размером 0,2 мкм (приблизительно) в стерильный контейнер.

Питательную среду необходимо приготовить до использования за один-два дня для стабилизации pH. pH культивационной среды нужно проверить до использования и в случае необходимости довести до нужного значения 0,1 или 1 М растворами NaOH или HCl.

Таблица С.2 — Виды маточных растворов

№ маточного раствора	Вещество	Концентрация в маточном растворе, г/л	Концентрация в культивационной среде, мг/л	Готовая среда	
				Элемент	Концентрация, мг/л*
А1	$NaNO_3$ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	26 12 4,4	510 240 90	Na, N Mg Ca	190; 84 58,08 24,04
А2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
А3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K;P	9,4; 3,7
В	H_3BO_3 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ $ZnCl_2$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ $CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,19 0,42 0,16 0,30 3,3 мг/л 1,4 мг/л 7,3 мг/л 0,012 мг/л	3,7 8,3 3,2 6,0 66 мкг/л 29 мкг/л 145 мкг/л 0,24 мкг/л	B Mn Fe — Zn Co Mo Cu	0,65 2,3 0,66 — 31 мкг/л 7,1 мкг/л 58 мкг/л 0,080 мкг/л
С	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220;43
* Если не указано иное.					

Примечание — Конечная концентрация бикарбоната теоретически (чтобы избежать существенной коррекции pH) составляет 15 мг/л, а не 300 мг/л. Среда 20Х—ААР использует концентрацию 300 мг/л [28].

С.4 Среда Штейнберга (Steinberg)

С.4.1 Концентрации и маточный раствор:

- в соответствии с ИСО 20079 модифицированную среду Штейнберга используют только для *Lemna minor* (так как только *Lemna minor* введена в настоящий стандарт), но тесты показали, что можно получить хорошие результаты и при культивировании *Lemna gibba*;
- эту среду готовят из реактивов чистотой аналитической степени чистоты и деионизированной воды;
- подготовить питательную среду из маточных растворов или растворов, в 10 раз более концентрированных (для достижения максимальной концентрации, не допуская образования осадка);

Таблица С.3 — Среда Штейнберга pH стабилизированная [модифицированная Альтенбургером (Altenburger)]

Вещество		Питательная среда	
Макроэлементы	Молярный вес	мг/л	ммоль/л
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

Окончание таблицы С.3

Вещество		Питательная среда	
Макроэлементы	Молярный вес	мг/л	ммоль/л
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
ЭДТА дигидрат Na	372,24	1500,00	4,03

Таблица С.4 — Маточные растворы (макроэлементы)

Макроэлементы (сконцентрированные в 50 раз)	г/л
Маточный раствор 1 KNO_3 KH_2PO_4 K_2HPO_4	 17,50 4,5 0,63
Маточный раствор 2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	 5,00
Маточный раствор 3 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	 14,75

Таблица С.5 — Маточные растворы (микроэлементы)

Микроэлементы (сконцентрированные в 1000 раз)	мг/л
Маточный раствор 4 H_3BO_3	 120,0
Маточный раствор 5 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	 180,0
Маточный раствор 6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	 44,0
Маточный раствор 7 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	 180,0
Маточный раствор 8 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ EDTA дигидрат Na	 760,00 1500,00

- маточные растворы 2 и 3 могут быть объединены, так же как и маточные растворы 4—7 (учитывая требуемые концентрации);

- для увеличения длительности хранения маточных растворов их стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 20 мин или фильтрованием (0,2 μm). Для стерилизации раствора 8 строго рекомендуется использовать только фильтрацию (0,2 μm).

С.5 Подготовка модифицированной среды Штейнберга в конечных концентрациях:

- добавить по 20 мл растворов 1—3 (см. таблицу С.4) приблизительно к 900 мл деионизированной воды, чтобы избежать образования осадка;

- добавить по 1,0 мл растворов 4—8 (см. таблицу С.5);

- pH должен быть равен (5,5 ± 0,2) (добавить для доведения минимальное количество растворов NaOH или HCl);

- довести объем до 1000 мл;

- если маточный раствор стерилизован и приготовлен на воде соответствующего качества, никакой дальнейшей стерилизации не требуется. Если стерилизован финальный раствор, маточный раствор 8 добавляют после автоклавирования (при 121 °С в течение 20 мин).

С.6 Подготовка раствора Штейнберга, концентрированного в 10 раз, для промежуточного хранения:

- добавить по 20 мл растворов 1—3 (см. таблицу С.4) приблизительно к 30 мл воды для того, чтобы не допустить образования осадка;
- добавить по 1,0 мл растворов 4—8 (см. таблицу С.5), добавить воды до 100 мл;
- если маточный раствор стерилизован и приготовлен на воде соответствующего качества, никакой дальнейшей стерилизации не требуется. Если финальный раствор стерилизован, маточный раствор 8 добавить после автоклавирования (при 121 °С в течение 20 мин);
- pH среды (заключительная концентрация) должен быть равен (5,5 ± 0,2).

Библиография

[1] ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733—742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA

[2] US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

[3] AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

[4] SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish)

[5] Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.

[6] Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145

[7] Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environmental Agency

[8] OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

[9] International Organization for Standardization. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test

[10] Walbridge C.T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977

[11] Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353—359

[12] Huebert D.B. and Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481—483

[13] Christensen E.R., Nyholm N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713—718

[14] Nyholm N., Sorensen P.S., Kusk K.O. and Christensen E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157—167

[15] Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485—1494

[16] OECD. (2005). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

[17] Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN

[18] Dunnett C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096—1121

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

[20] 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

[21] Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519—531

[22] Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93—96

[23] Hillman W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221—287.

[24] Landolt E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zhrich, Switzerland

[25] Björndahl G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds *(Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo

[26] Wang W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1—14

[27] Wang W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7—22

[28] I. Sims P. Whitehouse and R. Lacey. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency

УДК 502.3/504.03:615/615.9:006.34 МКС 13.020

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на окружающую среду, окружающая среда, ряска, угнетение роста

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 14.05.2019. Подписано в печать 15.07.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,25.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

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

gost.e-ecolog.ru