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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32367– 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Угнетение репродуктивной способности Дафнии магна

(OECD, Test № 211:2008, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и 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»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 60-П от 18 октября 2013 г.)

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test No. 211: «*Daphnia* magna Reproduction Test» (ОЭСР Тест №. 211 «Угнетение репродуктивной способности Дафнии магна»).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 772-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32367–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2013 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменений к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и правок 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, уведомления и тексты размещаются в информационной системе общего пользования — на информационном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет.

© Стандартинформ, 2014

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 метрологи

Введение

Настоящий стандарт разработан в рамках комплекса стандартов, посвященных методам испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Настоящий стандарт идентичен Руководству OECD по испытаниям химической продукции (OECD Guideline For The Testing of Chemicals. Test № 211: *Daphnia* magna Reproduction Test. Adopted by the Council on 3th October 2008).

Руководство ОЭСР по тестированию химических веществ периодически пересматривается в свете научно-технического прогресса. Что касается Руководства 202, часть II, *Daphnia* sp. Тест на репродуктивную способность (принятый в апреле 1984 года), в целом было признано, что данные испытания, проведенные в соответствии с этим руководством, могут изменяться. В последние годы были приложены значительные усилия, посвященные выявлению причин этой изменчивости, в целях выявления лучшего метода испытания. Обновленное руководство основывается на результатах исследований и межлабораторных испытаний, проведенных в 1992 (1) и 1994 (2) годах.

Основными различиями первоначальной версии (1984г.) и второй редакции (1998 г.) руководства являются:

a) используемым видом является *Daphnia magna*;

b) продолжительность теста 21 день;

c) для полустатического теста число животных, которое будет использоваться для каждой тестируемой концентрации, было уменьшено до 40, их предпочтительно разделить на четыре группы по 10 животных, по крайней мере 10 животных содержатся индивидуально (хотя возможно использование различных планов для проточных экспериментов);

d) более конкретные рекомендации были сделаны для контрольной среды и условий кормления.

Основное отличие второй версии (1998 г.) от этой версии:

e) в приложение 7 было добавлено описание процедуры для идентификации пола новорожденных особей, если требуется. Как и в предыдущих версиях, в этом руководстве соотношение полов является дополнительным параметром.

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

Угнетение репродуктивной способности Дафнии магна

Testing of chemicals of environmental hazard.
Daphnia magna Reproduction Test

Дата введения – 2014–08–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы испытаний для определения токсичности химических веществ путем угнетения репродуктивной способности Дафнии магна (далее – *Daphnia magna*).

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями:

2.1 **EC_x**: Концентрация тестируемого вещества, растворенного в воде, которая приводит к *x* проценту снижения воспроизводства *Daphnia magna* в пределах установленного периода экспозиции.

2.2 **естественный темп прироста** (Intrinsic rate of increase): Величина прироста популяции, который объединяет репродуктивную продукцию и возрастную смертность [4 – 6]. В устойчивых популяциях она

будет равна нулю, положительной в растущей и отрицательной в регрессивной. Эта последняя категория популяций не является устойчивой и в конечном счете обречена на вымирание.

2.3 **наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация** (Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)): Самая низкая концентрация, при которой наблюдают статистически значимый эффект на воспроизводство и смертность родительских особей ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, в пределах установленного периода экспозиции. Все концентрации выше LOEC должны иметь токсический эффект, равный или больший LOEC. Если эти два условия не соблюдаются, необходимо дать полное объяснение выбора именно этой LOEC (и соответственно NOEC).

2.4 **неэффективная наблюдаемая концентрация** (No Observed Effect Concentration (NOEC)): Тестовая концентрация, находящаяся сразу ниже LOEC, которая при сравнении с контролем не имеет никакого статистически значимого эффекта ($p < 0,05$) в пределах установленного периода экспозиции.

2.5 **потомство** (Offspring): Молодая *Daphnia*, произведенная родительской особью в ходе теста.

2.6 **предел обнаружения** (Limit of detection): Самая низкая концентрация, которая может быть обнаружена, но не определена количественно.

2.7 **предел определения** (Limit of determination): Самая низкая концентрация, которая может быть измерена количественно.

2.8 **родительские особи (животные)** (Parent Animals): Самки *Daphnia*, в начале теста репродуктивная способность которых является объектом исследования.

2.9 **смертность** (Mortality): Животное зарегистрировано как мертвое, когда оно неподвижно, то есть когда оно не в состоянии плавать, или если нет никакого видимого движения конечностей или постабдомена в течение 15 с после легкого взбалтывания тестируемой емкости. (Если используется другое определение, об этом нужно сообщить вместе со ссылкой на источник).

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальный стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяют в части, не затрагивающей эту ссылку.

Издание официальное

3 Основные положения

3.1 Введение

3.1.1 Целью теста является оценка воздействия химической продукции на репродуктивную функцию *Daphnia magna.* Для этого молодую женскую особь *Daphnia* (родительская особь), возрастом менее 24 ч в начале теста, подвергают воздействию тестируемого вещества, добавленного в воду в различных концентрациях. Продолжительность теста составляет 21 день. В конце теста оценивают общее количество выжившего потомства, произведенного родительской особью. Это означает, что ювенильные особи, рожденные взрослыми рачками, которые погибают во время теста, исключают из вычислений.

Репродуктивный выход родительских особей может быть выражен разными способами (например, число живого потомства, произведенного животным в день, начиная с первого дня наблюдения), но эти данные необходимо указывать дополнительно к общему количеству ювенильных особей, произведенных родителями к концу эксперимента.

Репродуктивная функция животных, подвергаемых воздействию тестируемого вещества по сравнению с контролем, позволяет определить самую низкую эффективную концентрацию (LOEC) и, следовательно, неэффективную концентрацию (NOEC). Кроме того, по мере возможности данные могут быть проанализированы с использованием регрессионной модели для оценки концентрации, которая вызвала бы *x* сокращений в % репродуктивной функции, то есть EC_x (например, EC_{50}, EC_{20} или EC_{10}).

3.1.2 Следует также указать выживаемость родительских особей и время первого помета. Другие связанные с веществом эффекты, такие, как рост (например, длина) и, возможно, коэффициент прироста, также могут быть исследованы.

3.2 Информация о тестируемом веществе

3.2.1 Результаты теста на острую токсичность [3] для *Daphnia magna* должны быть доступны. Результат может быть полезен при выборе соответствующего диапазона тестируемых концентраций в репродуктивном тесте. Растворимость в воде и давление пара тестируемого вещества должны быть известны. Также должна быть доступна надежная аналитическая методика количественного определения вещества в тестовых растворах.

3.2.2 Информация о свойствах тестируемого вещества, которая может быть необходима при планировании условий эксперимента, должна быть доступна, а также включать структурную формулу, чистоту вещества, стабильность на свету, стабильность при условиях теста, константу кислотной диссоциации (pK a), коэффициент распределения н-октанол/вода (Kow) и результаты теста на биоразлагаемость [28].

3.3 Применимость теста

Чтобы результаты теста были надежными, необходимо соблюдать следующие критерии в контроле:

- смертность родительских особей (самка *Daphnia*) не превышает 20 % к концу теста;
- минимальное количество выжившего потомства, произведенного родительской особью к концу теста, ≥ 60.

4 Описание метода

4.1 Оборудование

4.1.1 Экспериментальные емкости и другое оборудование, которое вступает в контакт с тестовыми растворами, должны быть полностью сделаны из стекла или другого химически инертного материала. Экспериментальными емкостями обычно являются стеклянные стаканы.

4.1.2 Кроме того, требуется некоторое или все перечисленное ниже оборудование:

- измеритель кислорода (с микроэлектродом или другим аналогичным оборудованием для измерения растворенного кислорода в небольших объемах);
- соответствующее оборудование для контроля температуры;
- pH-метр;
- аппаратура для определения жесткости воды;
- оборудование для определения концентрации общего органического углерода (ООУ) в воде или оборудование для определения химического потребления кислорода (ХПК);
- оборудование для контроля режима освещения и измерения световой интенсивности.

4.1.3 Видом, который используют в тесте, является *Daphnia magna* Straus. Можно использовать другие виды *Daphnia*, если они отвечают критериям пригодности (критерий пригодности касается ре-

продуктивной способности в контроле, важен для разных видов *Daphnia*). Если используют другие виды *Daphnia*, они должны быть идентифицированы и их применение должно быть обосновано.

4.1.4 Предпочтительно, чтобы у клона был идентифицирован генотип. Ряд исследований [5] показал, что способность к репродукции клона А (происхождением из IRCHA во Франции) [7] стабильно отвечает критерию ≥ 60 выживаемости потомства при условиях, описанных в настоящем стандарте. Однако можно использовать и другие клоны при условии, что культура *Daphnia* отвечает критериям теста.

4.1.5 В начале теста животные должны иметь возраст менее 24 ч и не должны относиться к первому поколению. Они должны быть получены из здоровой популяции (то есть не имеющей таких признаков стресса, как высокая смертность, присутствие самцов и эфиппий, задержки производства первого поколения, бесцветные животные, и.т.д.). Животных следует содержать в условиях культуры (свет, температура, среда, кормление и количество животных на единицу объема) аналогичной той, которую используют в тесте. Если среда культуры *Daphnia*, которую будут использовать в тесте, отличается от среды культивирования *Daphnia*, необходимо провести акклиматизацию в течение приблизительно трех недель (то есть одного поколения), чтобы избежать стресса родительских животных.

4.2 Среда для культивации

4.2.1 Рекомендуется использовать полностью синтетическую среду. Это позволит избежать попадания посторонних добавок (например водорослей, экстрактов из почвы и т.д.), которые трудно характеризовать, и, как следствие, улучшит возможности по стандартизации теста. Среды Элендт (Elendt) М4 [8] и М7 (см. приложение А) считают наиболее подходящими для этих целей. Однако другие среды также можно применять при условии, если культуры *Daphnia* отвечают критериям надежности теста.

4.2.2 Если используют среду, включающую неидентифицированные добавки, то эти добавки должны быть указаны и информация о них должна быть предоставлена в отчете об испытаниях. Особенно это касается содержания углерода, поскольку он может влиять на режим питания. Рекомендуется определить величину ООУ и/или ХПК для оценки вклада ООУ/ХПК в питательную среду. Также рекомендуется установить уровень ООУ в среде (то есть перед внесением водорослей) ниже 2 мг/л [11].

4.2.3 В случае тестирования веществ, содержащих металлы, важно понимать, что свойства среды (например, жесткость, хелатная способность) могут влиять на токсичность тестируемого вещества, поэтому желательна среда с полностью определенным составом. Однако в настоящее время единственными полностью определенными средами, которые подходят для длительного содержания *Daphnia magna,* являются Elendt M4 и M7. Обе среды содержат комплексообразователь ЭДТА. Исследования [2] показали, что «очевидная токсичность» кадмия, как правило, ниже, когда тест выполняется в средах М4 и М7, чем в средах, не содержащих ЭДТА. Поэтому М4 и М7 и другие среды, содержащие известные хелатные агенты, не рекомендуют для тестирования веществ, содержащих металлы. Для металлсодержащих веществ желательно использовать альтернативную среду, такую, как, например, ASTM, восстановленную жесткую пресную воду [11], которая не содержит комплексообразователь ЭДТА, с добавкой экстракта морских водорослей [12]. Эта комбинация среды ASTM и экстракта морских водорослей также подходит для длительного содержания культуры и тестирования *Daphnia magna* [2], хотя все же проявляет умеренное хелатирующее действие из-за органического компонента в добавленном экстракте морских водорослей.

4.2.4 Концентрация растворенного кислорода должна быть выше 3 мг/л в начале и в течение всего теста. pH должен быть в диапазоне 6 – 9 и не должен меняться больше чем 1,5 единицы в течение теста. Жесткость рекомендуется выше 140 мг/л (по $CaCO_3$). Тесты на этом уровне и выше демонстрируют репродукцию, соответствующую критериям пригодности [13], [14].

4.3 Тестовый раствор

4.3.1 Тестовый раствор, как правило, доводят до необходимых концентраций путем разбавления исходного раствора. Исходные растворы желательно получить путем растворения вещества в питательной среде.

4.3.2 В некоторых случаях для получения необходимой концентрации основного раствора тестируемого вещества может потребоваться использование органических растворителей или диспергаторов, однако необходимо предпринять все меры для того, чтобы избежать использования таких веществ. Примеры подходящих растворителей: ацетон, этанол, метанол, диметилформамид и триэтиленгликоль. Примеры подходящих диспергаторов: Cremophor RH40, метилцеллюлоза 0,01 % и HCO-40. В любом случае тестируемое вещество в тестовом растворе не должно превышать предел растворимости в тестовой среде.

4.3.3 Для получения основного раствора, который можно точно дозировать в воду, используют растворители. При применении рекомендуемой концентрации растворителя в окончательной тестовой среде (то есть ≤ 0,1 мг/л) упомянутые выше растворители не будут ядовиты и не будут увеличивать водную растворимость вещества.

4.3.4 Диспергаторы могут помочь в точном дозировании и дисперсии. При рекомендуемой концентрации в конечной испытательной среде (≤ 0,1 мл/л) упомянутые выше диспергаторы не будут ядовиты и не будут увеличивать водную растворимость вещества.

5 Процедура эксперимента

5.1 Условия экспозиции

5.1.1 Продолжительность

Продолжительность теста – 21 день.

5.1.2 Отсадка

5.1.2.1 Родительских животных отсаживают индивидуально по одному в экспериментальные емкости объемом 50 – 100 мл среды каждый.

5.1.2.2 Иногда для соответствия требованиям аналитической процедуры, используемой для определения концентрации тестируемого вещества, требуются большие объемы. Если используют объемы больше чем 100 мл, необходимо увеличить рацион питания *Daphnia*, чтобы гарантировать доступность пищи в соответствии с критериями применимости. Для динамического (проточного) теста могут быть использованы другие технические процедуры тестирования (например, отсадка четырех групп по 10 животных в большом аквариуме), но любые изменения в тесте должны быть отмечены.

5.1.3 Тестируемые животные

5.1.3.1. Для полустатических тестов используют по крайней мере 10 животных, содержащихся индивидуально при каждой тестируемой концентрации, и, как минимум, 10 животных индивидуально отсаживают для контроля.

5.1.3.2 Для динамических (проточных) тестов более подходящим является использование 40 животных, разделенных на четыре группы по 10 животных в каждой тестируемой концентрации [1]. Можно использовать и меньшее число подопытных животных, но рекомендуется использовать не менее 20 животных для каждой концентрации, разделенных по меньшей мере на две или более групп с равным числом животных (например, четыре емкости с пятью *Daphnia*). Для тестов, где животные содержатся в группах, не представляется возможным определить репродуктивную способность как общее число выжившего потомства, произведенного материнскими особями в конце теста, если материнские особи погибают. В этих случаях репродуктивная способность должна быть выражена как общее количество выжившего потомства, произведенного родительскими особями с начала теста.

5.1.3.3 Отсадка в тестовые сосуды должна происходить случайным образом, так же как и вся последующая обработка. В противном случае это может привести к неточным результатам, которые могут быть восприняты как влияние концентрации. В частности, если экспериментальные емкости обрабатываются при отсадке или изменении концентрации, то некоторые связанные со временем эффекты, такие, как усталость оператора или другие ошибки, могут иметь большое влияние при более высоких концентрациях. Кроме того, если результаты испытаний затронут начальные условия или условия окружающей среды теста, такие, как условия в лаборатории, это может привести к остановке теста.

5.1.4 Кормление

5.1.4.1 Для полустатических тестов кормить животных желательно ежедневно, по крайней мере три раза в неделю (то есть в соответствии с обновлением среды). О любых отклонениях от этого правила (например, для динамического теста) необходимо делать отметку в отчете.

5.1.4.2 Во время теста рацион питания материнских особей должен состоять из живых одноклеточных водорослей (одной или более) нижеследующих видов: *Chlorellasp*, *Selenastrum capricornutum* [синоним *Pseudokirchneriella subcapitata*] [15] и *Scenedesmus subspicatus*. Питание должно быть основано на количестве органического углерода (С), предоставляемого каждой родительской особи. Для *Daphnia magna* [16] размер порции, находящийся между 0,1 и 0,2 мг С/*Daphnia* /день, достаточен для получения необходимого количества потомства, отвечающего критериям применимости. Корм следует подавать или равными порциями в течение всего теста, или, что более желательно, меньшими порциями в начале эксперимента, затем увеличивая порцию во время теста, принимая во внимание рост материнских особей. В этом случае рацион все время должен оставаться в пределах рекомендуемого диапазона 0,1 – 0,2 мг С/*Daphnia*/день.

5.1.4.3 Если для расчета количества необходимого углерода в рационе используют косвенные методы, такие, как количество клеток водорослей или степень поглощения света (что имеет смысл из соображений удобства, так как измерение концентрации углерода является трудоемким), каждая ла-

боратория должна сделать собственные номограммы связи между косвенным методом и содержанием углерода в культуре водорослей (см. приложение В с советами по созданию номограмм). Номограммы должны поверяться по крайней мере ежегодно или чаще, если меняются условия культивирования водорослей. Данные по абсорбции света являются более предпочтительным способом косвенного определения углерода по сравнению с численностью клеток [17].

5.1.4.4 Кормление *Daphnia* осуществляют концентрированной суспензией водорослей для минимизации объема культуры водорослей, вносимых в тестовую емкость. Концентрация водорослей может быть достигнута центрифугированием с последующим разведением дистиллированной или деионизированной водой или средой для содержания *Daphnia*.

5.1.5 Свет

Требования к освещению: 16 ч в сутки с интенсивностью не более 15 – 20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

5.1.6 Температура

Температура среды в аквариуме должна быть в пределах 18 °С – 22 °С. Однако во время теста температура не должна изменятся более чем на 2 °С в указанных пределах, например: 18 °С – 20 °С, 19 °С – 21 °С или 20 °С - 22 °С. Возможно использование дополнительной тестовой емкости для контроля температуры.

5.1.7 Аэрация

Тестовые емкости не следует аэрировать во время теста.

5.1.8 Тестовые концентрации

5.1.8.1 Полученная ранее информация о токсичности тестируемого вещества (например, результаты теста на острую токсичность и/или исследований по определению диапазона токсичности) должна помочь в выборе соответствующих тестовых концентраций.

5.1.8.2 Обычно должно быть по крайней мере пять тестовых концентраций, возрастающих в геометрической прогрессии с фактором разделения, равным 3,2. Соответственно следует соблюдать число повторов (репликаций) для каждой тестируемой концентрации (см. 5.1.3.1, 5.1.3.2). Использование менее пяти концентраций должно быть объяснено. Вещество не испытывают выше предела растворимости в тестовой среде.

5.1.8.3 При установлении диапазона концентраций должно быть принято во внимание следующее:

- если цель исследования состоит в получении LOEC/NOEC, то плодовитость при самой низкой тестовой концентрации не должна статистически отличаться от контроля. Если этого не произошло, тест должен быть повторен с еще более низкой концентрацией;
- если цель состоит в том, чтобы получить LOEC/NOEC, самая высокая тестовая концентрация должна быть достаточно высокой, чтобы плодовитость при этой концентрации была значительно ниже, чем в контроле. Если этого не произошло, тест должен быть повторен с более высокой концентрацией;
- если необходимо провести оценку EC_x на эффекты воспроизводства для использования концентраций, достаточных для определения EC_x с соответствующим уровнем достоверности. Если EC_{50} на эффекты воспроизводства оценены, желательно, чтобы самая высокая тестовая концентрация была больше чем EC_{50}. Иначе, хотя оценить EC_{50} в этом случае будет возможно, доверительный интервал для EC_{50} будет очень широк и удовлетворительно оценить адекватность полученной модели будет невозможно;
- диапазон испытываемых концентраций не должен включать концентрации, которые имеют статистически значимый эффект на выживание взрослых особей, так как это меняет природу теста от просто теста воспроизводства до объединенного теста на воспроизводство и смертность, требующего более сложного статистического анализа.

5.1.8.4 Если при приготовлении тестовых растворов используют растворитель или диспергатор (см. 5.3.2 – 5.3.4), их финальная концентрация в тестовых сосудах не должна быть более 0,1 мл/л и должна быть той же самой во всех тестовых сосудах.

5.1.9 Контроль

Необходимо поставить ряд контрольных тестов и при необходимости несколько рядов контрольных опытов, содержащих растворитель или диспергатор в дополнение к опытному ряду. При использовании растворителя или диспергатора концентрация должна быть той же самой, что и в тестовых емкостях. Соответствующим должно быть и число повторов (см. 5.1.3.1, 5.1.3.2.).

В корректно поставленном тесте коэффициент вариации вокруг среднего числа выжившего потомства, произведенного родительскими особями в контроле(ях), должен быть равным или менее 25 %, и эти данные нужно указывать для экспериментов с индивидуально содержащимися животными.

5.1.10 Обновление среды

5.1.10.1 Частота обновления среды зависит от стабильности тестируемого вещества, но его

следует проводить по крайней мере три раза в неделю. Если по результатам предварительных тестов на стабильность (см. 3.2.2) тестируемое вещество в используемых концентрациях неустойчиво (то есть вне диапазона 80 % – 120 % номинальной концентрации или падает ниже 80 % начальной концентрации) за максимальный период обновления среды (то есть три дня), обновление необходимо проводить чаще или использовать проточный тест.

5.1.10.2 Если обновление среды проводят в полустатических тестах, готовят вторую серию тестовых емкостей и родительские особи пересаживают туда с помощью, например, стеклянной пипетки подходящего диаметра. Объем среды, переданной с *Daphnia,* должен быть минимизирован.

5.2 Наблюдения

Результаты наблюдений, сделанных во время теста, следует регистрировать по соответствующей форме (см. примеры в приложениях C и D). Если необходимы другие измерения (см. 3.1.2 и 5.5), могут потребоваться дополнительные наблюдения.

5.3 Потомство

Потомство, произведенное каждой родительской особью, следует удалять и подсчитывать ежедневно от момента появления первого помета, чтобы предотвратить потребление ими пищи, предназначенной для взрослых. Для целей настоящего стандарта подсчитывают только число выживших животных в помете, но также регистрируют присутствие несозревших яиц или мертвого потомства.

5.4 Смертность

Смертность среди родительских особей следует регистрировать, желательно ежедневно, в то же самое время, что и подсчет потомства.

5.5 Другие параметры

Хотя настоящий стандарт разработан преимущественно для оценки воздействия вещества на воспроизводство, можно также количественно определить и другие эффекты, которые позволяют провести статистический анализ. Нужными данными являются изменения роста, так как они дают информацию о возможных сублетальных эффектах, которые могут быть более полезными, чем одни только данные по воспроизводству. Рекомендуется проведение измерения длины родительских особей (длина тела без анальных члеников в конце теста). Другие параметры также могут быть измерены или вычислены. Они включают время появления первого помета (и последующих), число и размер пометов на особь, число нежизнеспособного потомства, наличие в помете самцов или эфиппий и, возможно, величину увеличения популяции (см. п.2 и процедуру определения пола в приложении F).

5.6 Частота количественных анализов и измерений

5.6.1 Концентрация кислорода, температура, жесткость и pH следует измерять по крайней мере один раз в неделю, в новых и старых средах, в контроле(ях) и при самой высокой тестируемой концентрации вещества.

5.6.2 Во время теста концентрации тестируемого вещества определяют через равномерные интервалы.

5.6.3 В полустатических тестах, где концентрацию тестируемого вещества считают остающейся в пределах ± 20 % номинальной (то есть в пределах диапазона 80 % – 120 % – см. 3.2 и 5.1.10.1), рекомендуется проводить измерение содержания вещества, как минимум, в самой высокой и самой низкой тестируемых концентрациях перед обновлением среды (анализ следует проводить сразу после приготовления раствора).

5.6.4 В тех тестах, где, как ожидают, концентрация вещества не будет оставаться в пределах ± 20 % номинального значения, необходимо провести определение всех концентраций, если образец свежий или его обновили. В тех ситуациях, когда установленная первоначальная концентрация опытного вещества не находится в пределах ± 20 % от номинального значения, но существуют весомые доказательства, подтверждающие повторяемость и стабильность первоначальных концентраций (то есть концентрация опытного вещества составляет 80 – 120 % первоначальной концентрации), химические определения наивысших и наименьших уровней концентраций могут не проводиться во вторую и третью неделю опыта. Во всех случаях определение концентраций образца до его обновления следует выполнять только с использованием повторов в сосуде для каждой концентрации.

5.6.5 Если выполняют динамический (проточный) тест, рекомендуется использовать выборку, описанную для полустатического теста (но анализ старых растворов здесь не применяют). Однако было бы желательно увеличить количество отобранных образцов в течение первой недели (например, серии измерений) для проверки стабильности тестовых концентраций. В этих типах тестов поступление разбавителя и тестируемого вещества необходимо проверять ежедневно.

5.6.6 Если есть свидетельства того, что концентрация тестируемого вещества поддерживалась

в пределах ± 20 % номинальной, то результаты могут быть основаны на номинальной или измеренной концентрации. Если отклонение от номинальной или измеренной начальной концентрации больше ± 20 %, результаты должны быть выражены по отношению к средневзвешенной по времени концентрации (см. руководство для расчета в приложении Е).

6 Результаты и подготовка отчета

6.1 Обработка результатов

6.1.1 Цель этого теста состоит в том, чтобы определить эффект исследуемого вещества на общее количество выжившего потомства, произведенного родительской особью, оставшейся в живых к концу теста. Общее количество потомства от родительской особи должно быть подсчитано для каждой тестовой емкости (иначе говоря, для каждой емкости каждой концентрации). Если в одной из емкостей родительская особь погибает во время теста или оказывается самцом, эта емкость исключается из анализа. Тогда анализ будут проводить на меньшем количестве репликаций одной и той же концентрации.

6.1.2 Для оценки LOEC и, следовательно, NOEC эффекта вещества на репродуктивную функцию необходимо вычислить среднюю репродуктивную способность для каждой концентрации всех репликаций, так же как и остаточное среднеквадратичное отклонение с помощью дисперсионного анализа (анализа вариантов или ANOVA). Среднее значение для каждой концентрации следует сравнить с контролем с помощью метода множественных сравнений, для чего могут быть использованы тесты Даннетта или Уильямса [18] – [21]. Это необходимо для проверки гипотезы (дисперсионного анализа) об однородности различия. Рекомендуется делать эту верификацию графически, которая более информативна, чем обычный текст [22]; также для данных целей подходит тест Батлера. Если гипотеза недостоверна, необходимо преобразовать данные для получения однородной массы отклонений до выполнения дисперсионного анализа или проводить взвешенный дисперсионный анализ. Величина эффекта, обнаруживаемого с помощью дисперсионного анализа (то есть наименьшие значимые различия), должна быть рассчитана и включена в отчет.

6.1.3 Для оценки концентрации, вызывающей 50 %-ное снижение репродуктивной функции (то есть EC_{50}), соответствующая кривая, такая, как логистическая кривая, должна быть построена на данных с использованием статистических методов, таких, как метод наименьших квадратов. Кривая строится таким образом, чтобы EC_{50} и его стандартное отклонение можно было бы оценить. Это значительно облегчит расчет доверительного интервала EC_{50}. Если есть основание выбирать разные уровни достоверности, необходимо выбрать 95 %-ный доверительный интервал. Процедуру подгонки желательно подкрепить оценкой отсутствия неадекватности. Это может быть сделано графически или делением остаточной суммы на «отсутствие неадекватности» и «чистой ошибки компонентов» и выполнением теста на отсутствие неадекватности. Обработка данных в случае повышения плодовитости скорее всего приведет к большей вариативности в количестве ювенильных особей, чем в случае со снижением плодовитости. Необходимо уделить внимание весу наблюдаемых значений с учетом различных отклонений в различных обрабатываемых группах. Полезную информацию можно найти в [22].

6.1.4 При анализе данных заключительного межлабораторного теста была использована логистическая кривая с применением нижеприведенной модели, хотя можно использовать и другие подходящие модели.

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b},$$

где Y – общее количество ювенильных особей на родительское животное выжившее к концу теста (рассчитаны для каждой емкости);

c – ожидаемое число ювенильных особей, когда x=0 ;

x – концентрация;

x_0 – EC_{50} для популяции;

b – угол наклона.

6.1.5 Эта модель, вероятно, будет адекватна в большом количестве случаев, но не во всех. Должна быть проведена проверка пригодности модели, как это предложено в 6.1.4. В некоторых случаях может быть более целесообразно применять модель гормезиса, в которой низкие концентрации дают эффект стимуляции [23].

6.1.6 Другие эффекты, связанные с концентрацией, такие, как EC_{10} или EC_{20}, также могут быть оценены, хотя это может быть сделано скорее всего с помощью других моделей, чем при оценке EC_{50}.

6.2 Отчет об испытании

Отчет об испытании должен включать следующую информацию.

Тестируемое вещество:

- физическое состояние и соответствующие физико-химические свойства;
- данные по идентификации, включая чистоту.

Тестируемый вид:

- клон (определен ли генотип), поставщик или источник (если известно) и условия культивирования. Если используют другой вид, а не *Daphnia magna*, то это необходимо указать и объяснить.

Условия эксперимента:

- тип теста (например, полустатический или динамический, объем, количество *Daphnia* на литр);
- длительность и интенсивность освещения;
- план эксперимента (например, число репликаций для каждой концентрации, количество родительских особей на репликацию);
- детали используемой культивационной среды;
- если необходимо, добавленный органический материал, в том числе состав, источник, метод приготовления, ООУ/ХПК основного раствора, оценка получающегося в итоге ООУ/ХПК в тестируемой среде;
- подробная информация относительно кормления, включая количество (в мг С/*Daphnia* /день) и расписание (например, тип пищи, включая для водорослей название вида и, если известно, напряжение, условия культивирования);
- метод приготовления маточного раствора и частота обновления (должны быть даны концентрации растворителя или диспергатора в случае их использования).

Результаты:

- результаты любых предварительных испытаний стабильности тестируемого вещества;
- номинальные тестовые концентрации и результаты всех исследований по определению концентрации тестируемого вещества в тестовых сосудах (см. примеры данных в приложении D);
- эффективность применяемого метода и предел измерения;
- качество воды в тестовых емкостях (то есть pH, температура, концентрация растворенного кислорода, ООУ и/или ХПК и жесткость, если применимо) (см. пример в приложении С);
- полный отчет о жизнеспособном потомстве от каждой родительской особи (см. пример в приложении С);
- число и дата случаев гибели родительских особей (см. примеры в приложении С);
- коэффициент вариации для контроля фертильности (основанный на общем количестве жизнеспособного потомства на родительскую особь, дожившего до конца теста);
- график, представляющий общее количество выжившего потомства на родительскую особь (для каждого повтора одинаковой концентрации) по отношению к концентрации тестируемого вещества;
- наблюдаемая наименьшая эффективная концентрация (LOEC) на воспроизводство, включая описание используемых статистических процедур и индикаторы с указанием величины обнаруженного эффекта, и неэффективная наблюдаемая концентрация (NOEC) на воспроизводство, если применимо LOEC/NOEC для смертности родительских особей;
- при необходимости EC_x для воспроизводства и доверительные интервалы, так же как и график подогнанной модели, используемой для расчетов, наклон кривой доза – ответ и ее стандартное отклонение;
- другие наблюдаемые или измеряемые биологические эффекты, которые наблюдались или имели место (например, рост родительских животных), включая любое соответствующее объяснение;
- объяснение любого отклонения от настоящего стандарта.

Приложение А
(обязательное)

Подготовка среды Элендт (Elendt) М7 и М4

А.1 Акклиматизация к средам Элендт М7 и М4

Некоторые лаборатории испытывают трудность в адаптации *Daphnia* magna к средам М4 [1] и М7. Более успешным будет постепенная акклиматизация к среде, то есть переход от собственной среды к 30 %-ному Элендту, затем к 60 %-ному и только потом к 100 %-ному Элендту. Длительность акклиматизации приблизительно должна составлять один месяц.

А.2 Подготовка

А.2.1 Следовые элементы

Отдельные маточные растворы (I), содержащие каждое индивидуальное следовое вещество, должны быть приготовлены на воде соответствующей чистоты, например деионизированной, дистиллированной или очищенной с помощью обратного осмоса. Из этих различных маточных растворов (I) готовят вторичный маточный раствор (II), содержащий все необходимые следовые элементы (комбинированный раствор), то есть:

Таблица А.1

	Количество добавляемой воды, мг/л	Концентрация (по сравнению со средой М4)	Количество раствора I, мл/л, необходимого для добавления в воду для приготовления раствора II	
			М4	М7
H_3BO_3	57190	20 000 раз	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7210	20 000 раз	1,0	0,25
LiCl	6120	20 000 раз	1,0	0,25
RbCl	1420	20 000 раз	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3040	20 000 раз	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 раз	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1260	20 000 раз	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000 раз	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 раз	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000 раз	1,0	1,0
KI	65	20 000 раз	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 раз	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 раз	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5000	2 000 раз	–	–
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1991	2 000 раз	–	–
Растворы Na_2ЭДТА и $FeSO_4$ готовят отдельно, затем смешивают и немедленно автоклавируют. Таким образом				
Раствор 21 Fe-EDTA		1 000 раз	20,0	5,0

А.2.2 Среды М4 и М7

Среды М4 и М7 готовят из маточного раствора II макроэлементов и витаминов следующим образом:

Таблица А.2

	Количество добавляемой воды мг/л	Концентрация (по сравнению со средой М4)	Количество маточного раствора, необходимого для добавления в готовую смесь, мл/л	
			М4	М7
Маточный раствор II (смесь следовых элементов)		20 раз	50	50
Маточный раствор содержащий макроэлементы (одно вещество в растворе)				
$CaCl_2$•2 H_2O	293 800	1 000 раз	1,0	1,0
$MgSO_4$•7 H_2O	246 600	2 000 раз	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 раз	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 раз	1, 0	1, 0
Na_2SiO_3•9 H_2O	50 000	5 000 раз	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 раз	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 раз	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 раз	0,1	0,1
Маточный раствор витаминов		10 000 раз	0,1	0,1
Маточный раствор витаминов готовят с добавлением 3 витаминов на 1 л воды (см. ниже)				
	мг/л			
Хлоргидрат тиамина	750	10 000 раз		
Цианкоболамин (B_{12})	10	10 000 раз		
Биотин	7,5	10 000 раз		

Маточный раствор витаминов хранят замороженным в маленьких аликвотных количествах. Витамины добавляют к среде незадолго до применения.

P.S. Отдельно следует обратить внимание: для того чтобы избежать образования осадка, аликвоты растворов солей добавляют в 500 – 800 мл деионизированной воды, а затем доливают до 1 л.

P.P.S. Первая публикация по среде М4 в [8]. Дефицит селена у ракообразных вызывает ультраструктурные повреждения усиков *Daphnia magna* Straus, как отмечается в Photoplasma, 154, 25–33.

Приложение В
(справочное)

Анализ содержания общего органического углерода (ООУ) и построение номограммы для содержания ООУ в корме на основе водорослей

Установлено, что содержание углерода в водорослях, подаваемых в качестве корма, необязательно измерять непосредственно, а можно построить корреляцию (то есть номограмму) зависимости содержания углерода от численности клеток водорослей или способности к поглощению света.

ООУ может быть измерен высокотемпературным окислением более точно, чем УФ, или персульфатными методами [29].

Для построения номограммы необходимо изолировать водоросли от культивационной среды с помощью центрифугирования и последующего ресуспензирования в дистиллированной воде. Измеряют величину замещения и кjнцентрацию ООУ в каждом образце в трех повторностях. Контроль, содержащий только дистиллированную воду, должен быть проанализирован, и концентрацию ООУ рассчитывают из количества клеток водорослей, содержащихся в пробе.

Номограмма должна быть линейной, с необходимым диапазоном концентраций углерода. Пример приведен ниже.

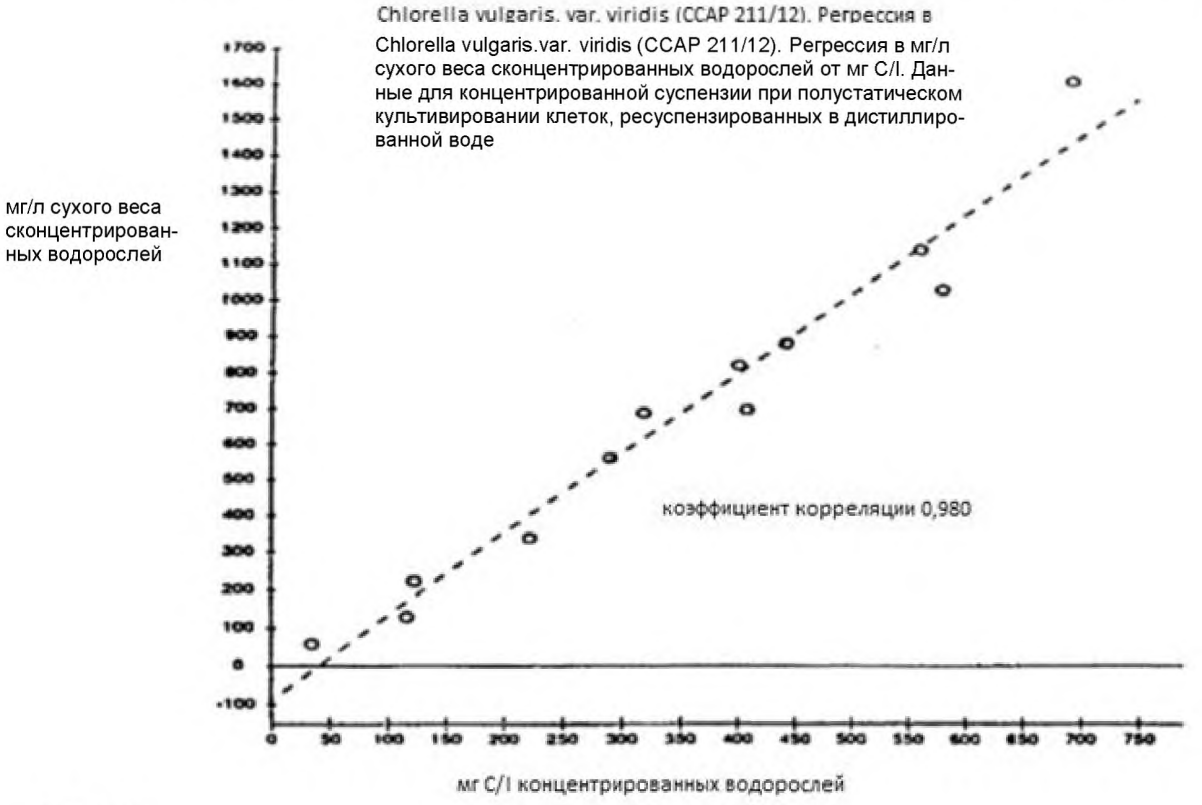


Рисунок В.1 Номограмма зависимости содержания углерода. Регрессия мг/л сухого веса сконцентрированных водорослей от мг С/l

Примечание – *рисунки В.1, В.2, В.3 не предназначены для пересчета, важно, чтобы лаборатории готовили свои собственные номограммы.*

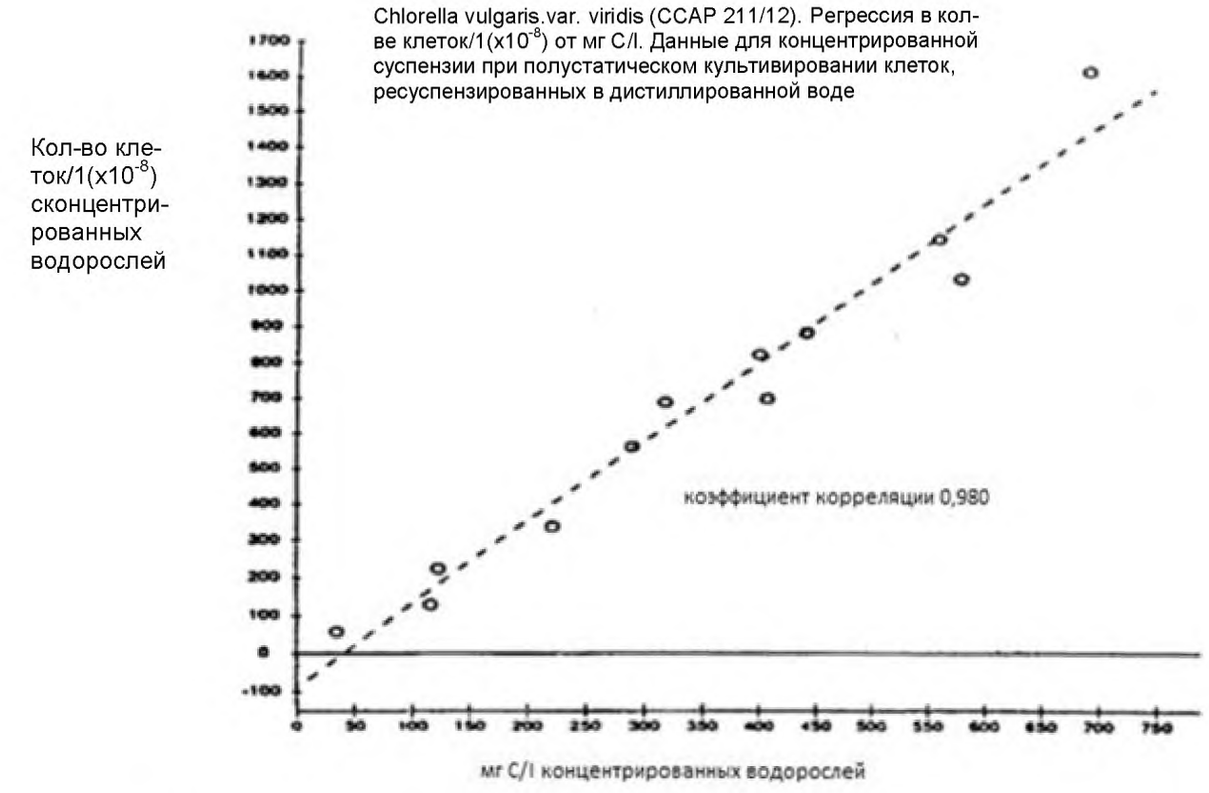


Рисунок В.2 Номограмма зависимости содержания углерода. Регрессия в кол-ве клеток/1(x10^{-8}) от мг С/l

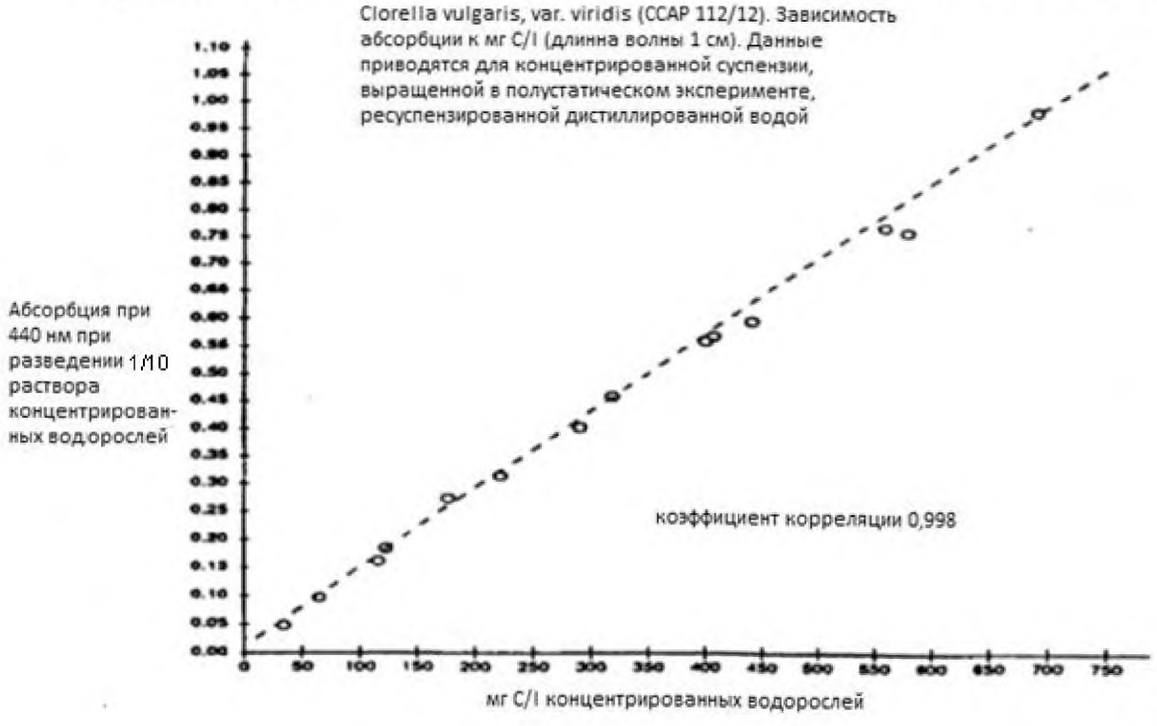


Рисунок В.3 Номограмма зависимости содержания углерода. Зависимость абсорбции от мг С/l

Приложение С
(рекомендуемое)

Пример записи данных по обновлению среды, результатов физико-химического мониторинга среды, кормления, воспроизводства и смертности *Daphnia*

№ эксперимента Дата старта: Клон: Среда: Тип пищи: Тестируемое вещество: Номинальная конц.:

День	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Обновление среды (отметки)																								
pH*																							Новая	
																							Старая	
O_2 мг/л*																							Новая	
																							Старая	
T, ^{0}C*																							Новая	
																							Старая	
Кормление (отметки)																								
Число отсаженных особей**																								Всего
Сосуд 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Всего	
Общая смертность взрослых***																								

*Укажите номер тестируемого сосуда

** Отметьте прерванный выводок АВ

*** Отметьте смерть взрослых особей буквой М в соответствующей клетке в соответствующей клетке

Приложение D
(рекомендуемое)

Пример записи результатов химического анализа

D.1 Измеренная концентрация

Номинальная концентрация	Проба в течение 1 недели		Проба в течение 2 недели		Проба в течение 3 недели	
	после обновления	до обновления	после обновления	до обновления	после обновления	до обновления

D.2 Измеренная концентрация в процентах к номинальной

Номинальная концентрация	Проба в течение 1 недели		Проба в течение 2 недели		Проба в течение 3 недели	
	после обновления	до обновления	после обновления	до обновления	после обновления	до обновления

Приложение Е
(обязательное)

Расчет средневзвешенных во времени значений

Е.1 Средневзвешенные значения

Поскольку концентрация тестируемого вещества может снижаться в период между обновлением среды, необходимо рассчитать концентрацию, которая может рассматриваться как репрезентативная в диапазоне концентраций, в которых содержатся родительские особи *Daphnia*. Выбор должен быть основан как на биологических, так и на статистических основаниях. Если, например, на воспроизводство воздействуют максимальные концентрации, необходимо использовать максимальные концентрации. Если, напротив, полагают, что преобладает кумулятивный или долговременный эффект токсичного вещества, следует брать в расчет среднюю концентрацию. В этом случае лучше всего подходит средневзвешенная во времени концентрация, так как она учитывает вариации концентраций во времени.

На рисунке Е.1 показан пример (упрощенный) теста, длящегося семь дней с обновлением среды на 0, 2 и 4 дня:

- тонкая зигзагообразная линия представляет концентрацию в течение эксперимента. Падение концентрации, как предполагается, происходит по причине разложения;
- шесть квадратиков в конце линий представляют наблюдаемые концентрации, измеренные в начале и конце каждого периода обновления;
- жирная линия показывает положение средневзвешенной во времени концентрации.

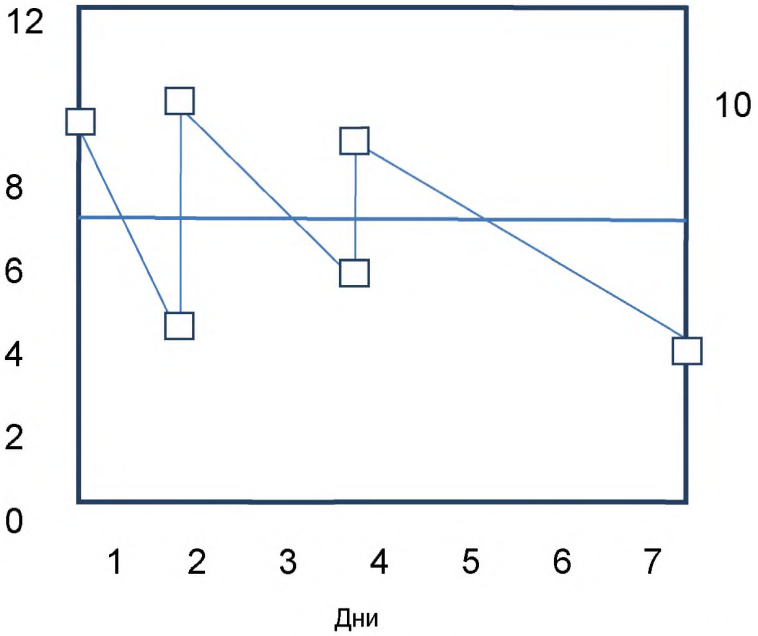


Рисунок Е.1 Пример кривой, средневзвешенной во времени

Среднее значение рассчитывают так, чтобы область над линией и область под линией средневзвешенной концентрации были равны. Пример расчета приведен в таблице Е.1.

Таблица Е.1 Вычисление средневзвешенного значения

Обновление №	День	Конц. 0	Конц.1	Ln (Конц. 0)	Ln (Конц. 1)	Площадь
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Общее количество дней: 7					Общая площадь: 50,092	
					Среднее: 7,156	

Дни - число дней между обновлением;

Конц. 0 – измеренная концентрация в начале каждого периода обновления;

Конц. 1 – измеренная концентрация в конце каждого периода обновления;

Ln (Конц. 0) – натуральный логарифм концентрации 0;

Ln (Конц. 1) – натуральный логарифм концентрации 1;

Площадь - область под экспоненциальной кривой каждого периода обновления. Ее рассчитывают следующим образом:

Средневзвешенной во времени *(TW-mean)* является *общая площадь, деленная на количество дней.*

Нужно иметь в виду, что для теста на репродуктивную функцию с *Daphnia* таблица должна быть расширена до 21 дня.

Очевидно, что, когда наблюдения взяты только в начале и конце каждого периода обновления, не представляется возможным с уверенностью утверждать, что разложение проходит экспоненциально. Другая кривая может привести к иным результатам. Тем не менее экспоненциальное падение концентрации наиболее вероятно и является более подходящим в случае отсутствия другой информации.

Однако следует соблюдать осторожность, если химический анализ не обнаружил вещество в конце периода обновления. Пока невозможно оценить скорость разложения вещества в растворе, невозможно получить правдоподобную площадь под кривой и, следовательно, разумную средневзвешенную во времени.

Приложение F
(справочное)

Руководство по определению пола новорожденных *Daphnia*

Проявление самцов в потомстве может произойти при изменении условий окружающей среды, таких, как сокращение светового дня, колебания температуры, снижение концентрации пищи, возрастание плотности популяции [24].

Появление самцов также известно как ответ на определенные регуляторы роста насекомых [25]. В условиях, когда химический стрессор вызывает снижение женского потомства от партеногенеза, следует ожидать увеличения числа самцов [26].

На сегодняшний день невозможно предсказать пол потомства или эффекты на репродукцию, которые могут оказаться наиболее чувствительными, но есть свидетельства, показывающие, что индукция самцов в потомстве может быть менее чувствительна, чем количество потомства. Поскольку основная цель настоящего стандарта состоит в оценке числа потомства, подсчет количества появляющихся самцов не является обязательным. Если этот параметр оценивается в исследовании, то целесообразно применять дополнительные критерии достоверности анализа испытания: в потомстве не должно быть более 5 % самцов.

Наиболее удобным и простым способом различать пол *Daphnia* является использование их фенотипических характеристик; как самцы, так и самки генетически идентичны и их пол определяется условиями окружающей среды. Самцы и самки отличаются по своей длине и морфологии первых антенн (антенул), которые больше у самцов, чем у самок (рисунок F.1). Эти различия хорошо заметны в момент выхода из выводковой камеры, хотя и другие вторичные половые признаки становятся различимы по мере роста животных.

Для определения пола новорожденные рачки от каждой родительской особи должны быть пересажены с помощью пипетки в чашку Петри с культивационной средой. Количество среды должно быть сведено к минимуму, чтобы ограничить перемещение животных. Рассмотреть первые антенны можно под бинокулярным микроскопом (x10-60).



Рисунок F.1 Самец (слева) и самка (справа) *Daphnia magna* в возрасте 24 часов. Самца можно отличить от самки по длине и морфологии первых антенн, обведены кружком на рисунке [25].

Библиография

[1] OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993

[2] OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris 1997

[3] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test . Paris 2004

[4] Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers

[5] Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532

[6] Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166

[7] Baird, D.J.; Barber, I.; Bradley, M.C.; Soares, A.M.V.M. and Calow, P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257 – 265

[8] Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25 - 33

[9] EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C.I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio

[10] Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775 – 782

[11] ASTM. (1988) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 20 pp

[12] Baird, D.J.; Soares, A.M.V.M.; Girling, A; Barber, I; Bradley, M.C. and Calow, P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp. 144 – 148

[13] Parkhurst, B.R., Forte, J.L. and Wright, G.P. (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1 – 8

[14] Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185 – 196

[15] Korshikov (1990) *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209

[16] Sims, I.R., Watson, S. and Holmes, D. (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053 – 2058

[17] Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459 – 466

[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: 510 – 531

[22] Draper, N.R. and Smith, H (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New-York

[23] 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

[24] Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268; Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206

[25] Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174

[26] OECD Series on Testing and Assessment, Number 86. Organisation for Economic Co-operation

and Development, Paris)

[27] Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113

[28] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Test No. 301: Ready Biodegradability, Paris, 1992

[29] The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB

УДК 502.3/504.03:615/615.9:006.34 МКС 13.020 Т58

Ключевые слова: химическое вещество, окружающая среда, водная среда, метод испытаний, *Daphnia* magna, репродукция

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. Л 2,79. Тираж 31 экз. Зак. 978

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