МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32293— 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Испытание водорослей и цианобактерий на задержку роста

(OECD, Test No. 201, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Украина	UA	Госпотребстандарт Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 777-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32293–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту OECD Test No. 201:2011 «Alga, Growth Inhibition Test» (Испытание водорослей на задержку роста).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, 2015

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Испытание водорослей и цианобактерий на задержку роста

Testing of chemicals of environmental hazard
Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

Дата введения – 2014–08–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения воздействия исследуемого вещества на рост водорослей и (или) цианобактерий.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ИСО 14442:2006 Качество воды. Руководящие указания по испытанию на торможение малорастворимыми веществами, летучими соединениями, металлами и сточными водами роста водорослей (Water quality - Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water);

ИСО 5667-16:1998 Качество воды. Отбор проб. Часть 16. Руководство по биотестированию проб (Water quality - Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples);

ИСО 8692:2012 Качество воды. Испытание на подавление роста водорослей в пресной воде с использованием одноклеточных зеленых водорослей (Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae).

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями:

3.1 **Биомасса** (Biomass): Сухая масса живого материала, присутствующего в популяции, выраженная по отношению к данному объему, например, мг водорослей на 1 л тестируемого раствора. В стандарте используются показатели – заменители биомассы, такие, как количество клеток, флюоресценция и т.д. Использование термина «биомасса» также относится и к показателям-заменителям.

3.2 **наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация** (Lowest Observed Effect Concentration – LOEC): Минимальная концентрация исследуемого вещества, при которой наблюдается статистически значимое уменьшение роста водорослей и (или) цианобактерий (при $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой в пределах установленного периода экспозиции. Все тестируемые концентрации, превышающие LOEC, должны иметь токсический эффект, равный или больше наблюдаемого при LOEC. Если данные условия не соблюдаются, то должно быть приведено достаточное обоснование того, как может быть выбрана LOEC.

3.3 **неэффективная наблюдаемая концентрация** (No Observed Effect Concentration – NOEC): Концентрация исследуемого вещества, находящаяся сразу под LOEC, которая не оказывает никакого статистически значимого воздействия на рост тестируемой группы водорослей и (или) цианобактерий по сравнению с контрольной группой в пределах установленного периода экспозиции.

3.4 **коэффициент изменчивости (КИ)** (Coefficient of variation): Безразмерная величина изменчивости показателя, определяемая как отношение стандартного отклонения к среднему. Данный коэффициент также может быть выражен в процентах. Средний коэффициент изменчивости средней специфической скорости роста водорослей и (или) цианобактерий в параллельных контрольных тестах вычисляют как среднее значение коэффициента изменчивости средней специфической скорости роста водорослей и (или) цианобактерий для суток или группы в соответствующем параллельном контрольном тесте.

Издание официальное

3.5 **EC_x:** Концентрация исследуемого вещества, которая приводит к x%-ному (например, 50%-ному) сокращению роста водорослей и (или) цианобактерий в течение установленного периода воздействия (период воздействия должен быть указан отдельно, если он отличается от стандартного или полного периода тестирования). Для однозначного обозначения величины EC, полученной из скорости роста, используется обозначение E_rC, из прироста – обозначение E_yC.

3.6 **переменная отклика** (Response variable): Переменная для оценки токсичности, полученная на основании любых измеряемых параметров описания биомассы с помощью различных расчетных методов. Для данного тестирования скорость роста и прирост являются переменными отклика, полученными при измерении непосредственно биомассы или любого из показателей-заменителей.

3.7 **питательная среда (**Growth medium): Синтетическая питательная среда, в которой развиваются тестируемые водоросли и (или) цианобактерии. Как правило, исследуемое вещество растворяют в питательной среде.

3.8 **прирост** (Yield): Измеренная величина переменной в конце тестирования за минусом измеренной величины переменной в начале тестирования, используемая для выражения увеличения биомассы во время тестирования.

3.9 **скорость роста (средняя специфическая скорость роста)** (Growth rate): Логарифмическое увеличение биомассы во время воздействия исследуемого вещества.

3.10 **специфическая скорость роста** (Specific growth rate): Переменная отклика, определяемая как соотношение разности натуральных логарифмов параметра наблюдения (биомассы) и соответствующего периода.

4 Общие сведения

Тестирование позволяет оценить воздействие более чем на несколько поколений водорослей и (или) цианобактерий.

Экспоненциально растущие водоросли и (или) цианобактерии подвергаются воздействию исследуемого вещества в течение 72 ч.

Отклик водорослей и (или) цианобактерий заключается в сокращении их роста при воздействии различных концентраций исследуемого вещества.

Отклик оценивают как функцию концентрации исследуемого вещества по сравнению со средним ростом водорослей и (или) цианобактерий в параллельных, не подверженных воздействию исследуемого вещества, контрольных пробах.

Для полного выражения системного отклика на токсическое воздействие (оптимальной чувствительности) водоросли и (или) цианобактерии неограниченно экспоненциально растут при соблюдении соответствующих питательных условий и параметров освещения в течение определенного периода, достаточного для измерения снижения специфической скорости роста.

5 Принцип тестирования

5.1 Рост и ингибирование роста водорослей и (или) цианобактерий могут быть определены количественно на основании измерений водорослевой биомассы в зависимости от времени.

Водорослевую биомассу определяют как сухую массу водорослей на 1 л тестируемого раствора.

Поскольку сухую массу трудно измерить, используют показатели – заменители биомассы, например количество клеток (объем клеток, флюоресценция, оптическая плотность).

5.2 Результатом тестирования является ингибирование роста, выраженное как логарифмическое увеличение биомассы (средней специфической скорости роста) в течение периода воздействия.

Из средних специфических скоростей роста, зарегистрированных в серии тестируемых растворов, концентрация, вызывающая определенное x%-ное ингибирование роста (например, 50%-ное) определяется и выражается как E_rC_x (например, E_rC_{50}).

5.3 В качестве дополнительного параметра отклика рекомендуется использовать прирост, который определяется как изменение биомассы в конце тестирования по отношению к ее значению в начале тестирования. От прироста, зарегистрированного в серии тестируемых растворов, концентрация, вызывающая определенное x%-ное ингибирование роста (например, 50%-ное), определяется и выражается как E_yC_x (например, E_yC_{50}).

5.4 В результате тестирования могут быть определены наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация (LOEC) и неэффективная наблюдаемая концентрация (NOEC).

6 Информация об исследуемом веществе

6.1 Информация об исследуемом веществе должна содержать сведения о растворимости исследуемого вещества в воде, коэффициенте распределения н-октанол – вода P_{ow} и давлении пара. Количественное определение исследуемого вещества в тестируемых растворах необходимо проводить с помощью достоверного аналитического метода с известной точностью и пределом обнаружения.

6.2 Полезной может быть также информация:

- о структурной формуле исследуемого вещества;
- о чистоте исследуемого вещества;
- об устойчивости на свету;
- о стабильности в условиях тестирования;
- о способности поглощать свет;
- о константе диссоциации pK_a;
- о способности к трансформациям в окружающей среде, включая результат тестирования на потенциальную способность исследуемого вещества к биоразложению.

7 Достоверность тестирования

Устанавливаются следующие критерии достоверности:

- биомасса в контрольных пробах должна увеличиваться экспоненциально с минимальным коэффициентом 16 в течение 72 ч, что соответствует специфической скорости роста, равной 0,92 за 24 ч (день$^{-1}$). Для часто используемых видов водорослей скорость роста существенно выше (приложение А). Данный критерий может не устанавливаться, если используются виды, растущие медленнее, чем виды, указанные в приложении А. В таком случае период тестирования должен быть продлен для того, чтобы получить 16-кратный рост контрольной группы водорослей и (или) цианобактерий. В то же время рост контрольной группы водорослей и (или) цианобактерий должен быть экспоненциальным в течение тестирования. Период тестирования может быть сокращен до 48 ч для поддержания неограниченного экспоненциального роста контрольной группы водорослей и (или) цианобактерий до тех пор, пока коэффициент роста не достигнет 16;
- средний коэффициент изменчивости для специфической скорости роста (дни 0 – 1, 1 – 2 и 2 – 3-й для 72 ч) в контрольных группах не должен превышать 35%. Данный критерий относится к средним значениям КИ, вычисленным в параллельных контрольных пробах;
- коэффициент изменчивости средней специфической скорости роста в параллельных контрольных пробах не должен превышать 7% при тестировании *Pseudokirchneriella subcapitata* и *Desmodesmus subspicatus*. Для остальных видов водорослей данная величина не должна превышать 10%.

8 Стандартные вещества

Для оценки правильности проведения тестирования рекомендуется использовать стандартное вещество, например 3,5-дихлорфенол. Для зеленых водорослей в качестве стандартного вещества может быть использован дихромат калия. Необходимо проводить тестирование со стандартным веществом как минимум два раза в год.

9 Применимость тестирования

Тестирование, как правило, проводят для растворимых в воде веществ. Для исследования летучих веществ, сильных адсорбентов, окрашенных веществ, имеющих низкую растворимость, или веществ, которые могут повлиять на доступность питательных веществ или минералов в питательной среде, могут понадобиться изменения процедуры тестирования (например, использование закрытой системы, кондиционирование тестовых сосудов) [1] – [3].

10 Описание тестирования

10.1 Оборудование

10.1.1 При тестировании используются сосуды, изготовленные из стекла или другого химически инертного материала. Оборудование необходимо тщательно промыть. Никакие органические или неорганические загрязнители не должны влиять на рост водорослей и (или) цианобактерий или на состав питательной среды.

10.1.2 В качестве тестовых сосудов, как правило, используются стеклянные колбы объемом, достаточным для проведения измерений и обеспечивающим необходимый массовый перенос углекислого газа (CO_2) из атмосферы. Объем жидкости должен быть достаточным для аналитических определений.

10.1.3 Может потребоваться:

- аппарат для культивирования: рекомендуется использовать емкости, в которых может поддерживаться выбранная температура инкубации ± 2°С;
- оборудование для измерения освещенности: метод измерения интенсивности света, и в частности тип рецептора (коллектора), может оказать существенное влияние на измеряемую величину. Рекомендуется проводить измерения с использованием сферического 4π рецептора, который реагирует на прямой или отраженный свет от всех углов выше и ниже уровня измерения, или 2π рецептора, который реагирует на свет от всех углов выше уровня измерения;
- оборудование для измерения водорослевой биомассы: количество клеток водорослей является наиболее часто используемым показателем–заменителем биомассы. Подсчет клеток проводится с использованием электронного счетчика частиц или микроскопа.

Другие показатели-заменители могут быть измерены с помощью проточного цитометра, флуориметра, спектрофотометра или колориметра. Необходимо вычислить коэффициент перевода количества клеток в сухой вес биомассы. Для проведения значимых измерений для низких концентраций биомассы с помощью спектрофотометра необходимо использовать кюветы со световым путем ≥ 4 см.

10.2 Выбор видов

10.2.1 Возможно использование нескольких видов неприкрепленных водорослей и (или) цианобактерий. Водорослевые штаммы, подходящие для проведения тестирования, перечислены в приложении А.

10.2.2 Если используются другие виды водорослей и (или) цианобактерий, то в отчете о проведении тестирования необходимо указать штаммы и (или) их происхождение. Необходимо убедиться в том, что экспоненциальный рост выбранного вида водорослей может поддерживаться на протяжении всего тестирования при преобладающих условиях.

10.3 Питательная среда

10.3.1 При проведении тестирования рекомендуется использовать две аналогичные питательные среды – AAP и OECD. Составы питательных сред приведены в приложении В.

Начальное значение pH и буферная емкость (регулирующая увеличение pH) у данных сред различны.

Результаты тестирования могут отличаться в зависимости от используемой питательной среды, особенно при тестировании диссоциирующих веществ.

10.3.2 Модификация питательной среды может быть необходима при исследовании металлов и комплексообразующих веществ, а также при исследовании различных значений pH.

Использование модифицированной среды должно быть обосновано в отчете о проведении тестирования.

10.4 Начальная концентрация биомассы

Количество биомассы в начале тестирования должно быть одинаковым для всех тестируемых видов и достаточно низким для того, чтобы наблюдался экспоненциальный рост в течение инкубационного периода без риска питательного истощения. Начальное количество биомассы не должно превышать 0,5 мг/л в пересчете на сухой вес. Рекомендуется использовать следующее начальное количество биомассы:

- *Pseudokirchneriella subcapitata*: $5 \times 10^3 – 10^4$ клеток/мл;
- *Desmodesmus subspicatus*: $2 – 5 \times 10^3$ клеток/мл;
- *Navicula pelliculosa*: 10^4 клеток/мл;
- *Anabaena flos-aquae*: 10^4 клеток/мл;
- *Synechococcus leopoliensis*: $5 \times 10^4 – 10^5$ клеток/мл.

10.5 Концентрации исследуемого вещества

Диапазон концентраций, в котором, вероятно, будет наблюдаться воздействие, может быть определен на основе результатов исследования по подбору диапазона концентраций. Для заключительного определяющего исследования необходимо выбрать по крайней мере, пять концентраций, составляющих геометрическую прогрессию со знаменателем, не превышающим 3,2. Для исследуемых веществ, показывающих пологие кривые отклика, может быть выбран более высокий коэффициент. Необходимо, чтобы тестируемые концентрации находились в диапазоне, вызывающем ингибирование скорости роста водорослей в диапазоне от 5 до 75%.

10.6 Параллельные и контрольные пробы

10.6.1 Предусмотрено использование трех параллельных проб для каждой тестируемой концентрации. Если не требуется определять NOEC, то количество тестируемых концентраций может быть увеличено, а количество параллельных проб для каждой концентрации уменьшено. Количество контрольных проб должно в два раза превышать количество параллельных проб для каждой тестируемой концентрации.

10.6.2 Отдельный набор тестируемых растворов готовят для аналитического определения концентраций исследуемого вещества.

10.6.3 Если для подготовки тестируемого раствора используется растворитель, то готовят дополнительную контрольную пробу с растворителем в используемой концентрации.

11 Проведение тестирования

11.1 Подготовка прививочной культуры

11.1.1 Для адаптации исследуемых водорослей к условиям тестирования и гарантии того, что водоросли находятся в фазе экспоненциального роста при прививании тестируемых растворов, прививочная культура в питательной среде готовится за 2 – 4 дня до начала тестирования.

11.1.2 Водорослевая биомасса должна быть приспособлена к условиям тестирования так, чтобы экспоненциальный рост преобладал в прививочном материале до начала тестирования.

11.1.3 Прививочную культуру выдерживают при тех же условиях, что и тестируемые виды. Измеряют увеличение биомассы в прививочной культуре для проверки того, что скорость роста находится в пределах нормального диапазона для тестируемого вида в условиях культивирования. Пример процедуры культивирования морских водорослей описан в приложении С. Для того чтобы избежать синхронного деления клеток во время тестирования, может потребоваться второй этап культивирования прививочной культуры.

11.2 Подготовка тестируемых растворов

11.2.1 Все тестируемые растворы должны содержать одинаковое количество питательной среды и начальной биомассы. Тестируемые растворы с выбранными концентрациями обычно готовятся путем перемешивания основного исследуемого вещества с питательной средой и прививочной культурой. Основные растворы обычно готовятся путем растворения исследуемого вещества в питательной среде.

11.2.2 Растворители, например ацетон, трет-бутиловый спирт и диметилформамид, могут использоваться в качестве носителей для добавления плохо растворимых веществ к питательной среде. Концентрация растворителя не должна превышать 100 мл/л, такая же концентрация растворителя должна быть добавлена ко всем пробам, включая контрольные пробы.

11.3 Инкубация

11.3.1 Тестовые сосуды укупоривают водонепроницаемыми заглушками. Тестовые сосуды встряхивают и помещают в аппарат для культивирования. Во время тестирования необходимо поддерживать суспензию водорослей и стимулировать перенос углекислого газа (CO_2) за счет непрерывного встряхивания сосудов. Температуру тестовых сосудов необходимо поддерживать в диапазоне от 21 до 24 ± 2°С.

11.3.2 Для культивирования видов, отличных от перечисленных в приложении А, например тропических видов, могут быть необходимы более высокие температуры при условии, что выполняются критерии достоверности тестирования.

11.3.3 Рекомендуется помещать тестовые сосуды в инкубатор в случайном порядке и ежедневно перемещать их.

11.3.4 Значение pH контрольной пробы во время тестирования не должно увеличиваться более чем на 1,5 единицы. Для металлов и соединений, которые частично ионизируются при pH в диапазоне тестового значения pH, необходимо ограничить отклонения значений pH, чтобы получить воспроизводимые и четкие результаты. Отклонение pH < 0,5 может быть технически обеспечено и достигается путем установления соответствующего уровня переноса углекислого газа (CO_2) из

окружающего воздуха к тестируемому раствору, например за счет увеличения скорости перемешивания или снижения потребления углекислого газа (CO_2) путем сокращения начальной биомассы или продолжительности тестирования.

11.3.5 Поверхность, на которой выдерживаются тестовые сосуды, должна получать непрерывное, однородное флуоресцентное освещение, например «холодный» белый или дневной свет.

Штаммы водорослей и (или) цианобактерий требуют различных условий освещенности.

Интенсивность света должна быть подобрана с учетом тестируемых видов.

Примеры

1 Для рекомендуемых видов зеленых водорослей выбирают интенсивность света на уровне тестируемых растворов в диапазоне от 60 до 120 мкЕ·м$^{-2}$·с$^{-1}$ в фотосинтетически эффективном диапазоне длин волн 400 – 700 нм при измерении с использованием соответствующего рецептора.

2 Anabaena flos-aquae хорошо растут при более низкой интенсивности света и могут быть повреждены при высокой интенсивности света. Для таких видов должна быть подобрана средняя интенсивность света в диапазоне от 40 до 60 мкЕ·м$^{-2}$·с$^{-1}$. Для измерительных приборов, откалиброванных в люксах, эквивалентный диапазон от 4440 до 8880 люксов для «холодного» белого света приблизительно соответствует рекомендуемой интенсивности света в диапазоне от 60 до 120 мкЕ·м$^{-2}$·с$^{-1}$.

Интенсивность света поддерживают в пределах ± 15% от средней интенсивности света в зоне инкубации.

11.4 Продолжительность тестирования

Продолжительность тестирования обычно составляет 72 ч. Она может быть уменьшена или увеличена при условии, что все критерии достоверности выполняются.

11.5 Измерения и аналитические определения

11.5.1 Водорослевая биомасса в каждом тестовом сосуде измеряется как минимум ежедневно.

11.5.2 Измерение биомассы выполняется с помощью микроскопа или электронного счетчика частиц (количество клеток и (или) биообъем). Альтернативные методы, например поточная цитометрия, *in vitro* или *in vivo,* флюоресценция или оптическая плотность могут использоваться, если в тестовом диапазоне биомассы может быть продемонстрирована удовлетворительная корреляция с биомассой.

11.5.3 Величины pH тестируемых растворов измеряют в начале и в конце тестирования.

11.5.4 Концентрацию исследуемого вещества в тестируемых растворах необходимо проанализировать для проверки начальных значений и поддержания необходимых значений во время тестирования.

11.5.5 Если в течение тестирования с низкой и высокой тестируемой концентрацией и концентрацией, близкой к ожидаемой величине EC_{50}, начальная концентрация исследуемого вещества изменяется менее чем на 20% от номинального значения, то достаточно проводить определение концентрации в начале и в конце тестирования.

11.5.6 Определение всех тестируемых концентраций в начале и в конце тестирования рекомендуется проводить, если маловероятно, что тестируемые концентрации сохранятся в диапазоне от 80 до 120% от номинальных значений.

11.5.7 Для летучих, нестабильных или сильно адсорбирующихся исследуемых веществ рекомендуется дополнительный отбор проб для анализа в 24-часовые интервалы во время периода воздействия в целях более точного описания потребления исследуемого вещества. Для таких веществ необходимо использовать дополнительные параллельные пробы.

11.5.8 Во всех случаях определение концентраций вещества должно только выполняться в одной из параллельных проб для каждой тестируемой концентрации.

11.5.9 Питательная среда, приготовленная специально для анализа концентраций во время тестирования, должна подвергаться такой же обработке, что и среда, используемая для тестирования, например, она должна быть инокулирована водорослями и культивироваться в аналогичных условиях. Если требуется проводить анализ концентрации исследуемого вещества, то необходимо отделять водоросли от питательной среды. Осаждение водорослей предпочтительно проводить центрифугированием с низкой центробежной силой.

11.5.10 Если концентрация исследуемого вещества сохраняется в пределах ± 20% от номинальной или начальной концентрации во время тестирования, то анализ результатов тестирования проводится с использованием номинальных или начальных величин. Если отклонение от номинальной или начальной величины превышает ± 20%, то анализ результатов должен основываться на средней геометрической концентрации исследуемого вещества, наблюдаемой во

время тестирования, или на моделях, описывающих снижение концентрации исследуемого вещества.

11.5.11 Вследствие динамичного роста водорослей трудно определить фактические концентрации исследуемого вещества, особенно для адсорбирующихся веществ в низких концентрациях. В подобных случаях снижение концентрации исследуемого вещества в тестируемом растворе вследствие адсорбции на увеличивающейся водорослевой биомассе не означает, что вещество удаляется из тестовой системы.

11.5.12 При проведении анализа результатов тестирования необходимо проверить, сопровождается ли снижение концентрации исследуемого вещества во время тестирования замедлением ингибирования роста водорослей. В этом случае необходимо использовать модель, описывающую снижение концентрации исследуемого вещества. В ином случае необходимо проводить анализ результатов на основании начальной (номинальной или измеренной) концентрации исследуемого вещества.

11.6 Прочие наблюдения

Для проверки нормального и здорового развития прививочного материала и наблюдения за любыми отклонениями в развитии водорослей (вследствие воздействия исследуемого вещества) в конце тестирования должны проводиться микроскопические наблюдения.

11.7 Определение диапазона предельных концентраций исследуемого вещества

11.7.1 В некоторых случаях, например когда предварительное тестирование показывает, что исследуемое вещество не оказывает токсичного воздействия в концентрациях ниже 100 мг/л или ниже своего предела растворимости в питательной среде (по наименьшему показателю), может быть проведено определение диапазона предельных концентраций исследуемого вещества, направленное на сравнение откликов в контрольной пробе и одной из тестовых проб (100 мг/л или концентрация, равная пределу растворимости).

11.7.2 Все указанные ранее условия проведения тестирования и критерии достоверности применимы к определению диапазона предельных концентраций исследуемого вещества, за исключением того, что количество параллельных проб должно быть не менее шести. Анализ переменных отклика в контрольной пробе и тестовых пробах может быть проведен с использованием статистического теста, например t-теста Стьюдента. Если расхождения в этих пробах неравны, то должен быть проведен t-тест, приспособленный для неравных расхождений.

12 Данные и отчет о проведении тестирования

12.1 Кривые роста

12.1.1 Биомасса в тестовых сосудах может быть выражена в единицах показателя-заменителя, используемого для измерения (например, число клеток, флюоресценция).

12.1.2 В таблицу сводят следующие показатели: измеренную концентрацию биомассы в тестовых и контрольных пробах, концентрации исследуемого вещества и время их измерения, зарегистрированное с интервалом в 1 ч. Для построения графиков могут использоваться как логарифмическая, так и линейная шкалы, но использование логарифмической шкалы является обязательным и дает лучшее представление об изменениях в тестовой пробе во время тестирования. Следует отметить, что экспоненциальный рост дает прямую линию при использовании логарифмической шкалы и наклон линии указывает на определенную скорость роста водорослей и (или) цианобактерий.

12.1.3 Используя графики, выясняют, происходит ли рост водорослей и (или) цианобактерий экспоненциально с ожидаемой скоростью во время тестирования. Изучают все значения показателей, внешний вид графиков и проводят анализ возможных ошибок. В частности, проверяют любые значения, которые отклоняются за счет систематических ошибок. Если очевидно, что могут быть идентифицированы ошибки, допущенные в процедурах, или их появление возможно с большей вероятностью, то соответствующие значения расцениваются как отклоняющиеся и не включаются в последующий статистический анализ. Нулевая концентрация водорослей в одной из параллельных проб может указывать на то, что инокулирование было проведено неправильно или сосуд был промыт ненадлежащим образом. В отчете о проведении тестирования необходимо указать на причины рассмотрения того или иного значения в качестве отклоняющегося. Статистический анализ для идентификации отклоняющихся значений имеет ограниченное использование для данного вида задач и не может заменить оценки эксперта. Отклоняющиеся значения (отмеченные как таковые) должны быть сохранены среди остальных значений, указанных на графике или представленных в таблице.

12.2 Переменные отклика

12.2.1 В настоящем стандарте рассматриваются две переменные отклика, с использованием которых должно быть оценено воздействие на:

а) среднюю специфическую скорость роста: данная переменная отклика вычисляется на основе логарифмического увеличения биомассы во время тестирования из расчета на один день;

б) прирост: данная переменная отклика равна биомассе в конце тестирования за минусом биомассы в начале тестирования.

12.2.2 Необходимо отметить, что показатели токсичности, вычисленные с использованием данных переменных отклика, не сопоставимы друг с другом, и данное различие должно учитываться при использовании результатов тестирования. Значения EC_x, основанные на средней специфической скорости роста (E_rC_x), как правило, будут выше результатов, основанных на приросте (E_yC_x), если изложенные в настоящем стандарте условия соблюдаются. Это не должно интерпретироваться как различие в чувствительности между данными переменными отклика, величины отличаются только математически. Понятие «средняя специфическая скорость роста» дается на общем образце экспоненциального роста водорослей в неограниченных культурах, где токсичность оценивается на основании воздействия на скорость роста и не зависит от абсолютного уровня специфической скорости роста в контрольной пробе, наклона кривой тестируемая концентрация – отклик или на продолжительности тестирования.

12.2.3 Результаты, основанные на переменной прироста, зависят от всех переменных. E_yC_x зависит от специфической скорости роста водорослей, используемых в каждом тестировании, и от максимальной специфической скорости роста, которая может измениться в зависимости от вида или штамма водорослей. Переменная прироста не должна использоваться для сравнения чувствительности к токсичным веществам среди видов или различных штаммов водорослей.

12.3 Средняя специфическая скорость роста

12.3.1 Средняя специфическая скорость роста вычисляется как логарифмическое увеличение биомассы для каждой тестовой и контрольной пробы по соотношению:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \left(\partial н^{-1}\right), \quad (1)$$

где μ_{i-j} – средняя специфическая скорость роста от момента времени i до момента времени j;

X_i – биомасса в момент времени i;

X_j – биомасса в момент времени j.

Для каждой тестовой и контрольной пробы вычисляют среднее значение для скорости роста наряду с оценкой различий.

12.3.2 Вычисляют среднюю специфическую скорость роста (обычно 0 – 3 дня), в качестве начального значения используя номинально привитую биомассу, а не измеренное начальное значение, поскольку в подобном случае достигается большая точность.

12.3.3 Оценивают поэтапные скорости роста, вычисляемые как специфические скорости роста в течение каждого дня проведения тестирования (0 – 1, 1 – 2 и 2 – 3-го дня), и определяют, остается ли скорость роста в контрольных пробах постоянной. Если значение специфической скорости роста в 1-й день тестирования значительно ниже, чем полная средняя специфическая скорость роста, то это может указывать на лаг-фазу. В то время как лаг-фаза может быть минимизирована или фактически устранена в контрольных пробах путем продления периода предварительной подготовки, наличие лаг-фазы в тестовых пробах может указывать на восстановление после начального воздействия или снижение экспозиции за счет потребления исследуемого вещества (включая адсорбцию на водорослевой биомассе) после начального воздействия.

12.3.4 Поэтапные скорости роста могут быть оценены в целях определения воздействия исследуемого вещества на рост водорослей и (или) цианобактерий во время тестирования. Существенные различия между поэтапной и средней скоростью роста указывают на отклонение от постоянного экспоненциального роста. В этом случае необходимо более тщательное рассмотрение кривых роста.

12.3.5 Рассчитывают замедление средней специфической скорости роста для каждого тестирования по соотношению:

$$I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_C} 100, \quad (2)$$

где I_r – ингибирование средней специфической скорости роста, %;

μ_C – среднее значение средней специфической скорости роста (μ) в контрольной пробе;

μ_T – средняя специфическая скорость роста в параллельной пробе.

12.3.6 При использовании растворителей для приготовления тестируемых растворов для расчета замедления скорости роста предпочтительнее использовать контрольные пробы с растворителем.

12.4 Прирост

Прирост рассчитывается как биомасса в конце тестирования за минусом биомассы в начале тестирования для каждой отдельной контрольной или тестовой пробы. Для каждой тестовой или контрольной пробы вычисляют среднюю величину прироста наряду с оценками различия. Замедление прироста (I_y) может быть вычислено для каждого тестирования по соотношению:

$$I_y = \frac{Y_C - Y_T}{Y_C} 100, \quad (3)$$

где I_y - ингибирование прироста, %;

Y_C - среднее значение прироста в контрольной пробе;

Y_T - прирост в параллельной пробе.

12.5 Графическое изображение кривой отклика

12.5.1 Графически изображают зависимость ингибирования от логарифма концентрации исследуемого вещества и тщательно анализируют получившийся график без учета частных показателей, которые были отобраны как отклоняющиеся.

12.5.2 Прямой линией соединяют частные значения для получения зависимости тестируемая концентрация – отклик, а затем для оценки результатов используют компьютерный статистический метод. В зависимости от планируемого использования данных, качества (точности) и объема данных, а также доступности инструментов для анализа данных может быть решено остановить анализ результатов на данном этапе и рассчитать основные величины EC_{50} и EC_{10} (и (или) EC_{20}) на основании построенной кривой.

12.6 Статистические процедуры

12.6.1 Целью статистических процедур является количественное описание зависимости тестируемая концентрация – отклик с помощью регрессионного анализа. Для этого возможно использовать метод взвешенного линейного регрессионного анализа, предварительно проделав линеаризующее преобразование данных отклика (например, в пробит-преобразование, логит-преобразование или преобразование Вейбулла), но нелинейные регрессионные методы являются более предпочтительными, поскольку позволяют обрабатывать данные с учетом неизбежных неточностей и отклонений от гладкого распределения. При достижении полного ингибирования роста такие неточности могут быть увеличены за счет преобразований, влияющих на анализ. Необходимо отметить, что стандартные методы анализа, использующие пробит-преобразование, логит-преобразование или преобразование Вейбулла, предназначены для работы с дискретными данными (например, смертность или выживаемость) и должны быть модифицированы для обработки данных о росте и биомассе.

12.6.2 Для каждой переменной отклика, которая будет проанализирована, используют соотношение тестируемая концентрация – отклик для расчета частных значений EC_x. Для каждой величины должны быть определены 95%-ные доверительные интервалы. Пригодность данных отклика к регрессионной модели должна быть оценена или графически, или статистически. Регрессионный анализ должен быть проведен на основании откликов для отдельных проб. Если нелинейная кривая с трудом вписывается в регрессионную модель из-за большого разброса в данных, то проблема может быть решена путем выполнения регрессионного анализа средних значений для группы проб, таким образом можно уменьшить влияние возможных отклоняющихся значений. Использование такого варианта должно быть отмечено в отчете о проведении тестирования как отклонение от стандартной процедуры, поскольку кривая для индивидуальных значений не дает хороших результатов.

12.6.3 Величина EC_{50} и доверительные интервалы также могут быть получены с использованием линейной интерполяции с регулированием данных, если доступные модели регрессионного анализа не подходят для обработки данных.

12.6.4 Для оценки LOEC и NOEC необходимо сравнить средства обработки с использованием дисперсионного анализа лабораторных техник (ANOVA). Метод для каждой концентрации необходимо сравнить с контрольным методом, используя соответствующее кратное сравнение или основной тестовый метод. Могут использоваться тесты Даннета или Уильямса. Это необходимо для оценки допущения ANOVA об однородности различия. Подобная оценка может быть выполнена графически или с помощью теста. Подходящими являются тесты Левена или Бартлетта. Невозможность допущения об однородности различий иногда может быть скорректирована путем логарифмического преобразования данных. Если разнородность различий является чрезмерной и не может быть исправлена путем преобразования, то необходимо провести анализ методами, такими,

как тест Джонкхиера.

12.6.5 Научные разработки привели к тому, что было принято решение об отказе от понятия «NOEC» и замене его понятием «регресс», базирующимся на величине EC_x. В настоящем стандарте соответствующая величина для x не была установлена. В зависимости от выбранной переменной отклика используется диапазон от 10 до 20%. Обе величины EC_{10} и EC_{20} должны быть указаны в отчете о проведении тестирования.

12.7 Активирование роста

При низких тестируемых концентрациях иногда наблюдается активирование роста (отрицательное ингибирование). Это может быть как следствием гормезиса (токсического активирования), так и следствием добавления активирующих факторов роста с питательной средой. Следует отметить, что добавление неорганических питательных веществ к питательной среде не должно оказывать непосредственное влияние на рост водорослей и (или) цианобактерий, поскольку питательная среда должна поддерживать избыток питательных веществ в течение тестирования. Низкие активирующие дозы обычно можно не принимать во внимание при расчетах EC_{50}, если величины не являются экстремальными. Но если величины экстремальны или величина EC_x для низкого значения x может быть вычислена, то может понадобиться проведение специальных процедур. Если возможно, то необходимо избегать исключения откликов активирования из анализа данных. Если доступное программное обеспечение для создания кривой роста не может учитывать незначительное активирование, то используется линейная интерполяция с саморегулированием. При высокой интенсивности активирования необходимо рассмотреть возможность использования модели гормезиса.

12.8 Ингибирование роста без использования токсичных веществ

Легко абсорбирующие исследуемые вещества могут инициировать сокращение роста за счет определенного строения, уменьшающего количество доступного освещения. Подобные физические эффекты необходимо отличать от токсических эффектов путем модифицирования условий тестирования. Об изменении условий тестирования необходимо сообщать в отчете о проведении тестирования [1] и [2].

12.9 Отчет о проведении тестирования

Отчет о проведении тестирования должен содержать следующую информацию:

об исследуемом веществе:

- агрегатное состояние и соответствующие физико-химические свойства, включая предел растворимости в воде;
- данные о химической идентификации (например, номер CAS), включая чистоту (наличие примесей);

о тестируемых видах водорослей:

- штаммы, поставщик или используемый источник культурной коллекции;

об условиях проведения тестирования:

- дата начала тестирования и его продолжительность;
- описание организации тестирования: тестовые сосуды, объемы культур, плотность биомассы в начале тестирования;
- состав питательной среды;
- тестируемые концентрации и параллельные пробы (например, количество параллельных проб, тестируемые концентрации и используемая геометрическая прогрессия);
- описание приготовления тестируемых растворов, в том числе использование растворителей;
- аппаратура для культивирования;
- интенсивность освещения и его качество (источник, однородность);
- температура;
- проверенные концентрации: заданные тестируемые концентрации и любые результаты исследований по определению концентрации исследуемого вещества в тестовом сосуде. Предел обнаружения и точность аналитического метода должны быть указаны;
- любые отклонения от условий стандарта;
- метод определения биомассы и корреляция между измеряемыми показателями и сухим весом;

о результатах тестирования:

- значения pH в начале и в конце тестирования при всех обработках;
- биомасса в каждой пробе, в каждый момент измерения и метод определения биомассы;
- кривые роста (график зависимости роста биомассы от времени);
- расчетные показатели отклика для каждого параллельного измерения, средние значения и коэффициенты вариаций для каждого параллельного измерения;

- графическое представление соотношения тестируемая концентрация – отклик;
- оценки токсичности для показателей отклика, например EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} и соответствующие доверительные интервалы. Расчет LOEC и NOEC, описание статистических методов, используемых для их определения;
- если используется дисперсионный анализ, то диапазон отклика, который может быть определен (например, наименьшая значимая величина);
- любое возможное активирование роста при обработке тестовой пробы;
- другие наблюдаемые эффекты, например морфологические изменения водорослей;
- обсуждение результатов тестирования, в том числе любое влияние отклонений от данного стандарта на результаты тестирования.

Приложение А
(рекомендуемое)

Водорослевые штаммы, подходящие для проведения тестирования

А.1 Водорослевые штаммы

Зеленые водоросли:

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (ранее известная как *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG;
- *Desmodesmus subspicatus* (ранее известная как *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG.

Диатомовые водоросли:

- *Navicula pelliculosa,* UTEX 664.

Цианобактерии:

- *Anabaena flos-aquae,* UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A;
- *Synechococcus leopoliensis,* UTEX 625, CCAP 1405/1.

Рекомендуемые водорослевые штаммы доступны из альголически чистых культур следующих коллекций:

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 OLP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Gottingen
Nicholausberger Weg 18
D-3400 Gottingen
GERMANY

UTEX: Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
The University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

Таблица А.1 – Внешний вид и характеристики рекомендуемых водорослевых штаммов

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Внешний вид	Изогнутые, искривленные единичные клетки	Овальные, как правило, единичные клетки	Палочки	Цепочки овальных клеток	Палочки
Размер (длина × × ширина), мкм	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × × 3 –12	7,1×3,7	4,5×3	6×1
Объем клеток, (мкм^3/ клетка)	40 – 60[1)]	60 – 80[1)]	40 – 50[1)]	30 – 40[1)]	2,5[2)]

Окончание таблицы А.1

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Вес сухих клеток, (мг/клетка)	$2 – 3×10^{-8}$	$3 – 4×10^{-8}$	$3 – 4×10^{-8}$	$1 – 2×10^{-8}$	$2 – 3×10^{-9}$
Скорость роста[3] ($день^{-1}$)	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	2,0 – 2,4
[1] Измерено с помощью электронного счетчика частиц. [2] Рассчитано из размера. [3] Наиболее часто наблюдаемая скорость роста в среде OECD при интенсивности света приблизительно 70 мкЕ·$м^{-2}$·$с^{-1}$ при 21°С.					

А.2 Рекомендации по культивированию и обращению с рекомендуемыми видами

Pseudokirchneriella subcapitata и *Desmodesmus subspicatus*

Развитие данных зеленых водорослей легко поддерживать в различных питательных средах. Сведения о подходящих средах доступны в культурных коллекциях. Клетки, как правило, являются единичными, и измерения клеточной плотности могут легко выполняться с помощью электронного счетчика частиц или микроскопа.

Anabaena flos-aquae

Для содержания основной культуры могут использоваться разнообразные среды. Особенно важно не допускать роста культуры после лаг-фазы при обновлении, на данном этапе восстановление культуры затруднительно.

Anabaena flos-aquae развивает конгломераты уплотненных клеточных цепочек. Размер подобных конгломератов может меняться в зависимости от условий культивирования. Необходимо разделять конгломераты клеток для определения биомассы при подсчете клеток с помощью электронного счетчика частиц или микроскопа.

Разрушение образцов ультразвуком может использоваться для разделения цепочек в целях снижения изменчивости при подсчете. Интенсивность и продолжительность обработки ультразвуком должна быть одинаковой для каждой обработки.

Необходимо подсчитать достаточное количество клеток на гемоцитометре (по крайней мере 400 клеток) для компенсации изменчивости. Это увеличит достоверность микроскопических определений плотности.

Для определения общего объема клеток *Anabaena flos-aquae* после разрушения клеточных цепочек с помощью ультразвука может использоваться электронный счетчик частиц. Энергия ультразвука должна быть подобрана таким образом, чтобы избежать разрушения клеток.

Суспензия водорослей, используемая для прививания тестовых сосудов, должна быть хорошо перемешана и гомогенна. Для перемешивания используют вихревую мешалку.

Тестовые сосуды помещают в орбитальный встряхиватель или качалку со скоростью около 150 об/мин. Аналогично для уменьшения склонности *Anabaena flos-aquae* к образованию конгломератов можно использовать периодическое встряхивание. Если образование конгломератов происходит, то необходимо получить представительные образцы для измерения биомассы. Энергичное встряхивание перед отбором проб может быть необходимо для разделения клеточных конгломератов.

Synechococcus leopoliensis

Synechococcus leopoliensis развиваются как единичные клетки, имеющие форму палочек. Клетки очень мелкие, что затрудняет использование микроскопа для подсчета при измерении биомассы. Для подсчета также может использоваться электронный счетчик частиц, предназначенный для подсчета частиц размером до 1 мкм. Также могут использоваться флуориметрические измерения *in vitro*.

Для содержания данной культуры могут использоваться различные питательные среды.

Navicula pelliculosa

Navicula pelliculosa может формировать конгломераты при определенных условиях роста. За счет образования липидов водорослевые клетки имеют тенденцию к накоплению в поверхностной пленке. В подобных случаях для отбора образцов при подготовке представительной пробы для измерения биомассы требуются специальные условия. Может потребоваться энергичное перемешивание, например с использованием вихревой мешалки.

Для содержания данной культуры могут использоваться различные питательные среды, содержащие кремний.

Приложение В
(рекомендуемое)

Питательная среда

В.1 Для проведения тестирования используют следующие питательные среды:

В.1.1 AAP (EPA, США) в соответствии с ASTM;

В.1.2 OECD: Оригинальная среда OECD TG 201, а также в соответствии с ISO 8692.

Для приготовления питательной среды используют реагенты аналитической чистоты и деионизированную воду.

Т а б л и ц а В . 1 – Составы сред AAP (EPA, США) и OECD TG 201

Компонент	AAP		OECD	
	мг/л	ммоль	мг/л	ммоль
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300	-	-
NH_4Cl	-	-	15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599	-	-
KH_2PO_4	-	-	1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,300	0,000806	0,100	0,0002698[1)]
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

[1)] Молярное соотношение EDTA и Fe превышает 1. Таким образом, предотвращается осаждение Fe и в то же время минимизируется комплексообразование ионов тяжелых металлов.

При тестировании с диатомовой водорослью *Navicula pelliculosa* в обе среды необходимо ввести $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ для достижения концентрации 1,4 мг Si/л.

pH среды достигается при равновесии между углеродной системой среды и парциальным давлением CO_2 в атмосферном воздухе. Примерное соотношение между pH при температуре 25°C и концентрацией бикарбоната (моль):

$pH_{равн.} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$.

При содержании 15 мг $NaHCO_3$/л, $pH_{равн.} = 7{,}5$ (EPA, США), 50 мг $NaHCO_3$/л, $pH_{равн.} = 8{,}1$ (среда OECD).

Т а б л и ц а В . 2 – Элементный состав питательных сред

Элемент	AAP, мг/л	OECD, мг/л
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

В.2 Приготовление среды OECD

Т а б л и ц а В . 3 – Приготовление среды OECD

Питательный элемент	Концентрация в основном растворе
Основной раствор 1: макроэлементы	
NH_4Cl	1,5 г/л
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 г/л
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 г/л
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 г/л
KH_2PO_4	0,16 г/л
Основной раствор 2: Fe	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 мг/л
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 мг/л
Основной раствор 3: микроэлементы	
H_3BO_3	185 мг/л
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 мг/л
$ZnCl_2$	3 мг/л
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 мг/л
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 мг/л
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 мг/л

Окончание таблицы В.3

Питательный элемент	Концентрация в основном растворе
Основной раствор 4: бикарбонат	
$NaHCO_3$	50 г/л
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	

Основные растворы стерилизуют с помощью мембранной фильтрации (средний диаметр пор 0,2 мкм) или обрабатывают в автоклаве (15 мин при температуре 120°С). Основные растворы хранят в темноте при температуре 4°С.

Основные растворы 2 и 4 не обрабатывают в автоклаве, их стерилизуют с помощью мембранной фильтрации.

Питательную среду готовят, добавляя в деионизированную воду соответствующие объемы основных растворов 1 – 4:

К 500 мл деионизированной воды добавляют:

- 10 мл основного раствора 1;
- 1 мл основного раствора 2;
- 1 мл основного раствора 3;
- 1 мл основного раствора 4.

Объем раствора доводят до метки 1 л деионизированной водой.

Раствор питательной среды отстаивают в течение необходимого времени для достижения равновесия с углекислым газом (CO_2). В случае необходимости в течение нескольких часов через раствор пропускают стерильный отфильтрованный воздух.

В.3 Приготовление среды EPA, США

В.3.1 Добавляют 1 мл каждого основного раствора из реагентов 1.1 – 1.7 примерно к 900 мл дистиллированной или деионизированной воды и затем доводят до метки 1 л.

Б.3.2 Основные растворы питательных макроэлементов готовят путем растворения в 500 мл дистиллированной или деионизированной воды следующих реагентов:

1.1 – $NaNO_3$ – 12,750 г;
1.2 – $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 г;
1.3 – $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 г;
1.4 – Основной раствор микроэлементов (Б.3.3);
1.5 – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 г;
1.6 – K_2HPO_4 – 0,522 г;
1.7 – $NaHCO_3$ – 7,500 г;
1.8 – $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$.

Для реагентов 1.1 – 1.4 может быть приготовлен один общий раствор.

Примечание – Реагент 1.8 используют для тестирования с диатомовыми водорослями. Реагент можно добавлять непосредственно (202,4 мг) или в виде основного раствора таким образом, чтобы в среде достигалась окончательная концентрация кремния 20 мг/л.

В.3.3 Основной раствор питательных микроэлементов готовят путем растворения в 500 мл дистиллированной или деионизированной воды следующих реагентов:

2.1 – H_3BO_3 – 92,760 мг;
2.2 – $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 207,690 мг;
2.3 – $ZnCl_2$ – 1,635 мг;
2.4 – $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 79,880 мг;
2.5 – $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,714 мг;
2.6 – $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,630 мг;
2.7 – $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,006 мг;
2.8 – $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ – 150,000 мг;
2.9 – $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005 мг.

Примечание – Реагент 2.9 используется только для основных культур диатомовых водорослей.

В.3.4 Приводят pH раствора к 7,5 ± 0,1 путем добавления 0,1 н. или 1,0 н. NaOH или HCl.

В.3.5 Среду фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм в стерильный

контейнер, если будет использоваться электронный счетчик частиц, или с размером пор 0,45 мкм, если электронный счетчик частиц использоваться не будет.

В.3.6 Приготовленную среду до использования хранят в темноте при температуре 4°С.

Приложение С
(рекомендуемое)

Процедура культивирования морских водорослей

С.1 Общие положения

В соответствии с настоящей процедурой культивируются культуры, состоящие из одного вида морских водорослей. Необходимо использовать стерильные водорослевые культуры.

Все операции должны проводиться в стерильных условиях для исключения бактериального заражения или загрязнения другими водорослями.

С.2 Оборудование

См. пункт 10.1.

С.3 Процедуры получения водорослевых культур

С.3.1 Подготовка питательных растворов

Все соли для питательной среды готовят в виде концентрированных основных растворов и хранят в темноте при низкой температуре. Растворы стерилизуют с помощью фильтрации или обрабатывают в автоклаве.

Питательную среду готовят путем добавления необходимого количества основного раствора к стерильной дистиллированной воде, не допуская бактериального заражения. В твердые среды добавляют 0,8% агар-агара.

С.3.2 Основная культура

Основная культура – это культура водорослей, которая регулярно переносится в свежую питательную среду в качестве прививочного материала. При нерегулярном использовании водоросли полосами наносят на скошенные агаровые трубки. Водоросли помещают в новую питательную среду не менее чем один раз в два месяца.

Основную культуру водорослей выращивают в конических колбах, содержащих соответствующую питательную среду (объем около 100 мл). Если водоросли выращивают при температуре 20°С при постоянном освещении, то требуется их еженедельная пересадка.

Во время пересадки определенное количество водорослей переносится стерильной пипеткой в колбу со свежей питательной средой так, чтобы для быстрорастущих видов начальная концентрация была приблизительно в 100 раз меньше, чем в исходной культуре.

Скорость роста водорослей может быть определена по кривой роста. Если скорость известна, то возможно оценить плотность водорослей при пересадке на новую питательную среду. Это должно быть сделано прежде, чем культура достигнет фазы отмирания.

С.3.3 Предварительная культура

Предварительная культура предназначена для получения определенного количества водорослей, подходящих для инокуляции тестовых сосудов. Предварительную культуру выращивают в условиях тестирования и используют во время экспоненциального роста обычно на 2 – 4-й день после инкубационного периода. Водорослевые культуры, содержащие деформированные или аномальные клетки, не должны использоваться.

Приложение D
(справочное)

Регрессионный анализ данных (нелинейная регрессионная модель)

D.1 Общие положения

Отклик в тестах на водорослях и других тестах микробного роста – рост биомассы, по своей природе являющийся непрерывной или метрической переменной, выражается в виде скорости процесса, если оценивается скорость роста, и ее интеграла по времени, если оценивается биомасса. Обе величины относятся к соответствующему среднему отклику в повторном контрольном тесте без воздействия, в котором демонстрируется максимальный отклик в данных условиях, когда свет и температура являются основными определяющими факторами. Тестовая система является распределенной или однородной, и биомассу можно считать непрерывной, не учитывая индивидуальных клеток. Дисперсия распределения типа отклика для таких систем относится исключительно к тестовым факторам (как правило, с нормальным логарифмическим описанием или нормальным распределением ошибок), что является отличием от типичных откликов в биологических исследованиях с квантованными данными, для которых устойчивость (как правило, с биномиальным распределением) отдельных организмов часто рассматривается как основной компонент дисперсии. В данном случае контрольные значения равны 0 или фоновым значениям.

Нормализованный или относительный отклик r монотонно убывает от 1 (нулевое ингибирование) до 0 (100%-ное ингибирование). Следует обратить внимание на то, что все отклики содержат соответствующие ошибки и очевидное негативное ингибирование может быть вычислено только как результат случайной ошибки.

D.2 Регрессионный анализ

D.2.1 Модели

Регрессионный анализ направлен на получение количественного описания зависимости отклика от концентрации в виде математической регрессионной функции Y = f(C) или чаще f(Z), где Z = logC. Использование обратного соотношения $C = f^{-1}(Y)$ позволяет рассчитать величины EC_x, в том числе EC_{50}, EC_{20} и EC_{10} и 95%-ный доверительный интервал. Было доказано, что несколько простых математических функций успешно описывают зависимости тестируемая концентрация – отклик, полученные в тестах на ингибирование роста водорослей. Данные функции включают, например, логистические уравнения, несимметричные уравнения Вейбулла и функцию нормального логарифмического распределения, все представляющие собой сигмовидные кривые, асимптотически стремящиеся к 1 для $C \rightarrow 0$ и к 0 для $C \rightarrow$ бесконечность. В качестве альтернативы асимптотической модели было предложено использовать непрерывные модели пороговой функции (например, модель Куйжмана для ингибирования роста популяции). Данная модель предполагает отсутствие какого-либо отклика при концентрации ниже определенного порога EC_{0+}, который оценивается путем экстраполяции зависимости тестируемая концентрация – отклик до пересечения с осью концентрации с использованием простой непрерывной функции, недифференцируемой в исходной точке.

Следует обратить внимание на то, что анализ может представлять собой простую минимизацию сумм остаточных квадратов (с учетом постоянной дисперсии) или взвешенных квадратов, если дисперсия неоднородности компенсируется.

D.2.2 Процедура

Выбирают подходящее уравнение функции Y = f(C) и приводят его к соответствию данным путем нелинейной регрессии. Предпочтительно используются данные измерений для каждого отдельного теста, а не средние значения в целях получения как можно большей информации из имеющихся данных. Практический опыт показывает, что в случае значительной дисперсии средние значения (для параллельных проб) могут дать более надежные математические оценки, менее подверженные влиянию систематических ошибок, чем данные каждого индивидуального теста.

Совмещают полученные кривую и данные и оценивают соответствие кривой. Если выбранная функция для описания зависимости тестируемая концентрация – отклик недостаточно хорошо описывает всю кривую или некоторые важные ее части, такие, как отклик при низких концентрациях, то вместо симметричной кривой выбирают другой вариант кривой, например несимметричную кривую (функция Вейбулла). Отрицательное ингибирование может быть проблемным, например для логарифмического описания. Нормальная функция распределения также требует альтернативных функций регрессии. Не рекомендуется присваивать нулевые или положительные значения отрицательным значениям, поскольку это искажает распределение ошибок. Целесообразным может быть построение отдельных кривых, соответствующих частям основной кривой, например нижней части кривой ингибирования для оценки величины EC_{lowx}. Используя выбранное уравнение (обратное

уравнение $C = F^{-1}(Y)$), рассчитывают значения характерных точек EC_x – EC_{50} и одну или две величины EC_{lowx}. Опыт проведения тестирования показал, что 10%-ное ингибирование обычно можно оценить довольно точно, если данных достаточно и при низких концентрациях не происходит стимуляции роста. Точность оценки EC_{20} часто значительно лучше, чем EC_{10}, поскольку величина EC_{20}, как правило, расположена на линейной центральной части кривой тестируемая концентрация – отклик. Иногда EC_{10} бывает сложно интерпретировать из-за стимуляции роста. Таким образом, хотя EC_{10}, как правило, можно получить с достаточной точностью, рекомендуется всегда рассчитывать и EC_{20}.

D.2.3 Весовые коэффициенты

Как правило, экспериментальная дисперсия не является постоянной и обычно включает пропорциональный компонент, поэтому взвешенная регрессия вычисляется в установленном порядке. Предполагается, что весовые коэффициенты для такого анализа обратно пропорциональны дисперсии $W_i = 1/Var(r_i)$.

С помощью регрессионных программ проводят анализ взвешенной регрессии с весовыми коэффициентами. Для удобства весовые коэффициенты должны быть нормализованы путем умножения на $n / \Sigma w_i$ (n – число точек данных) так, чтобы их сумма была равна единице.

D.2.4 Нормализованные отклики

Нормализация по среднему контрольному отклику приводит к некоторым принципиальным проблемам и получению довольно сложной структуры дисперсии. При делении откликов на средний контрольный отклик для получения процента ингибирования вводится дополнительная погрешность, вызванная ошибкой в контрольном значении. Если этой ошибкой можно пренебречь, то весовые коэффициенты в регрессии и доверительные интервалы должны быть скорректированы для ковариации с контрольным значением. Следует обратить внимание на то, что высокая точность при оценке среднего контрольного отклика важна для минимизации общей дисперсии для соответствующего отклика. Данная дисперсия соответствует следующим расчетам (индекс i относится к концентрации i; индекс 0 используется для контрольного значения):

Y_i = относительный отклик = $r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$; с дисперсией $Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \approx (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \times Var(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \times Var(r_0)$ и так как $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$ и $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$; для нормального распределения данных и повторных тестов m_i и m_0; $Var(r_i) = \partial^2/m_i$; общая дисперсия относительного отклика Y_i принимает вид: $Var(Y_i) = \partial^2/(r_0^2 \times m_i) + r_i^2 \times \partial^2/r_0^4 \times m_0$.

Ошибка в контрольном среднем значении обратно пропорциональна квадратному корню из среднего из контрольных значений. Нормализация данных и выявление соответствия абсолютному отклику, включая значение контрольного отклика, не проводятся, а в качестве дополнительного параметра для нелинейной регрессии используется величина контрольного отклика. Для обычного уравнения регрессии с двумя параметрами данный метод требует задания трех параметров, и, следовательно, большего количества данных, чем при нелинейной регрессии данных, для которых проведена нормализация с использованием заданных контрольных откликов.

D.2.5 Обратные доверительные интервалы

Расчет доверительных интервалов нелинейной регрессии с помощью обратной оценки является достаточно сложным и не является стандартным в обычных программах для статистической обработки данных. Приблизительные границы доверительных интервалов могут быть получены с помощью стандартных программ для расчета нелинейной регрессии с повторной параметризацией, которая включает возможность переписать математические уравнения с величинами для желаемой точки, например для EC_{10} и EC_{50}, как для параметров, подлежащих оценке. Необходимо задать следующий вид функции: I = f(α, β, концентрация), а также использовать отношения $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ и $F(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ для замены функции f (α, β, концентрация) эквивалентной функцией g (EC_{10}, EC_{50}, концентрация).

Точный расчет проводится на основании исходного уравнения с использованием разложения Тейлора в окрестностях средних значений r_i и r_0.

В последнее время стали широко использоваться методы начальной загрузки данных, использующие данные измерений и генератор случайных чисел, учитывающих частоту повторного отбора проб для оценки эмпирического распределения дисперсии.

Библиография

[1] ИСО 14442:2006 (ISO 14442:2006) — Качество воды. Руководящие указания по испытанию на торможение малорастворимыми веществами, летучими соединениями, металлами и сточными водами роста водорослей (Water quality - Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water)

[2] ИСО 5667-16:1998 (ISO 5667-16:1998) — Качество воды. Отбор проб. Часть 16. Руководство по биотестированию проб (Water quality - Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples)

[3] ИСО 8692:2012 (ISO 8692:2012) — Качество воды. Испытание на подавление роста водорослей в пресной воде с использованием одноклеточных зеленых водорослей (Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae)

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, водоросли, цианобактерии

Подписано в печать 01.04.2015. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,79. Тираж 33 экз. Зак. 1559.

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