Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок биологической оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

Методические указания
МУ 1.2.2968—11

Издание официальное

Москва • 2012

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок биологической оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

Методические указания
МУ 1.2.2968—11

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** биологической оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—39 с.

ISBN 978—5—7508—1116—8

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, И. В. Брагина, О. И. Аксенова, Т. Ю. Зависгяева); Учреждением Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт питания» РАМН (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, М. М. Гаппаров, В. В. Бессонов, О. И. Передеряев, И. В. Аксенов, Е. А. Арианова, Р. В. Распопов, В. В. Смирнова, А. А. Шумакова, О. Н. Тананова, В. А. Шипелин, А. А. Казак); Учреждением Российской академии наук «Институт биохимии им. А. Н. Баха» (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, О. Д. Гендриксон, И. В. Сафенкова); Государственным учебно-научным учреждением «Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова» (М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан, А. П. Бонарцев, А. В. Феофанов, С. Н. Еланский, В. И. Гмошинский); Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (С. А. Кононогов, С. С. Голубев); Учреждением Российской академии наук «Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб).

2. Рекомендованы Государственной Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 17 октября 2011 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

ISBN 978—5—7508—1116—8

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

I. Область применения 5
II. Нормативные ссылки 6
III. Общие положения 8
3.1. Цель биологического тестирования наноматериалов 8
3.2. Требования к лабораториям, проводящим оценку действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам 9
3.3. Квалификация специалистов, проводящих исследования 10
3.4. Мероприятия по обеспечению качества проводимых исследований 10
3.5. Соблюдение мер конфиденциальности 11
3.6. Ответственность организации, проводящей исследование 11
3.7. Меры предосторожности при введении наноматериалов в растения, препарировании биоматериала, отборе и консервации проб, проведении исследований 11
3.8. Нештатные ситуации и меры по их устранению 12
IV. Порядок оценки действия наноматериалов на высшие растения по морфологическим признакам в лабораторных условиях 13
4.1. Составление плана (дизайна) исследования 13
4.2. Определение вида растительных организмов, пригодных для проведения исследований 14
4.3. Определение способа (метода) введения наноматериалов 15
4.4. Подготовка проб наноматериалов для введения в растения 16
4.5. Определение численности экспериментальных групп 16
4.6. Расчёт доз вводимых наноматериалов 17
4.7. Получение токсикологической характеристики наноматериала 17
4.8. Составление отчёта о результатах работ по оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам 17
V. Порядок оценки действия наноматериалов на высшие растения по морфологическим признакам в естественных популяциях 18
5.1. Составление плана (дизайна) исследования 18
5.2. Определение видового состава популяции, подлежащего сбору (обследованию) 19
5.3. Контрольные группы 19
5.4. Определение периодичности обследования растений в естественных популяциях на повреждающее действие наноматериалов 19
5.5. Порядок обследования флоры в чрезвычайных ситуациях (аварийные промышленные выбросы) 20
5.6. Составление отчёта о результатах работ по оценке действия наноматериалов на природную флору по морфологическим признакам 20

VI. Методы оценки действия наноматериалов на высшие растения по морфологическим признакам..... 21
6.1. Перечень реактивов и оборудования, применяемых при оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам 21
6.2. Характеристика органов и систем, подлежащих обследованию (на примере цветковых растений) 22
6.3. Оценка действия наноматериалов по качественным показателям 23
6.4. Оценка действия наноматериалов на растения с использованием методов морфометрии 24
6.5. Форма представления результатов по оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим показателям 26
VII. Критерии оценки состояния низших растений – биоиндикаторов, применяемых в мониторинге наноматериалов..... 28
7.1. Метод оценки безопасности наноматериалов на модельной системе грибов и грибоподобных организмов в условиях in vitro..... 28
7.2. Метод оценки безопасности наноматериалов по прорастаемости конидий и ветвлению проростков гриба Alternaria alternata в условиях in vitro 33
Приложение 1. Типовой протокол эксперимента по оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам 37
Приложение 2. Обозначения и сокращения 38
Приложение 3. Рекомендуемая литература по оценке морфологических признаков высших растении и грибов 39

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
17 октября 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок биологической оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

Методические указания МУ 1.2.2968—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам в ходе тестирования безопасности новых видов наноматериалов и нанотехнологий, а также мониторинга состояния окружающей среды.

1.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях, применяются в ходе проведения исследований безопасности наноматериалов и нанотехнологий в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с воздействием наночастиц и наноматериалов, а также при мониторинге загрязнения окружающей среды нанотехнологической продукцией.

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единства измерений и адаптации имеющихся методов и средств измерений в ходе оценки безопасности наноматериалов и нанотехнологий для состояния окружающей среды, компонентов естественных биоценозов.

1.4. Методические указания предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Федеральной службы по надзору в сфере природопользования, а также могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля,

медицинскими учебными заведениями и иными организациями и учреждениями, проводящими исследования по оценке безопасности наноматериалов.

II. Нормативные ссылки

1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

3. Федеральный закон от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

4. Федеральный закон от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

5. Федеральный закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

6. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов».

7. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий».

8. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

9. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 г. № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».

10. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

11. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19 июля 2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

12. СанПиН 2.1.7.1322—03 «Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления».

13. ГН 1.2.2633—10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды».

14. СП 2.2.2.1327—03. «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту».

15. «Методические указания по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях», от 28 февраля 1995 г. № 11-16/63-60.

16. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание биологического материала и объектов внешней среды, зараженных бактериями I—IV групп патогенности, при исследованиях методом ПЦР».

17. МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

18. МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

19. МУ 1.2.2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов».

20. МУ 1.2.2742—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях».

21. МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

22. МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов in vitro и в модельных системах *in vivo*».

23. МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии и в контролирующих организациях».

24. МР 1.2.2640—10 «Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалов».

25. МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах».

26. ГОСТ 6709—72 «Вода дистиллированная. Технические условия».

27. ГОСТ 1770—74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия».

28. ГОСТ 8.207—76 «Государственная система обеспечения единства измерений. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения».

29. ГОСТ 12.1.007—76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования».

30. ГОСТ 12.0.004—79 «ССБТ. Организация обучения работающих безопасности труда. Общие положения».

31. ГОСТ 25336—82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

32. ГОСТ 26678—85 «Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия».

33. ГОСТ 3—88 «Перчатки хирургические резиновые. Технические условия».

34. ГОСТ 28498—90 «Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний».

35. ГОСТ 29227—91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования».

36. ГОСТ Р 51232—98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества».

37. ГОСТ 24104—2001 «Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия».

38. ГОСТ 7.32—2001 «Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

39. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

40. ГОСТ 30333—2007 «Паспорт безопасности химической продукции. Общие требования».

III. Общие положения

3.1. Цель биологического тестирования наноматериалов

Оценка действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам осуществляется в следующих целях:

- определение безопасных для растений концентраций наноматериалов;
- определение критических органов – мишеней воздействия наноматериалов;
- выявление природы и механизмов влияния наноматериалов на растения;
- мониторинг загрязнения окружающей среды наночастицами и другой нанотехнологической продукцией;
- разработка мер по охране окружающей среды от вредного воздействия наночастиц и наноматериалов;

• санитарно-гигиеническое нормирование промышленных выбросов наночастиц и наноматериалов в окружающую среду.

3.2. Требования к лабораториям, проводящим оценку действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

3.2.1. Наличие аккредитации в установленном порядке. Организации, проводящие исследования, должны иметь аккредитацию в соответствии со стандартом ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 согласно Федеральному закону от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

3.2.2. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708 н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

3.2.3. Оснащение необходимым оборудованием и средствами измерений, прошедшими поверку (калибровку) в установленном порядке; эксплуатация оборудования и средств измерений проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению; результаты проведения поверки (калибровки) и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание; применяются средства измерений, имеющие сертификат Ростехрегулирования и зарегистрированные в Государственном реестре средств измерений.

3.2.4. Наличие выделенных оборудованных помещений для работы с биологическими объектами, содержащими наноматериалы (препарирование, пробоподготовка, исследование); материал, поступивший в лабораторию, должен быть обработан в комнате пробоподготовки; для обработки материала должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие горизонтальный поток воздуха, а также возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом; перемещение пробирок, штативов и прочих должно производиться только в одном направлении; работы с биологическими материалами и образцами, содержащими наночастицы, следует проводить в резиновых одноразовых перчатках; обеззараживание проб, содержащих биогенные наноматериалы, проводят в соответствии с МУ 3.5.5.1034—01; биологические образцы, подвергнутые воздействию наноматериалов, инактивируют автоклавированием; помещение регулярно облучают бактерицидными лампами в соответствии с «Методическими указаниями по применению бактери-

цидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях» (№ 11-16/03-06 от 28 февраля 1995 г.); технологические операции проводят в соответствии с зональностью помещений; в отдельных помещениях осуществляют переодевание и хранение верхней одежды, прием пищи; выделяют отдельное складское помещение для хранения материалов и обработанных ими биологических образцов.

3.3. Квалификация специалистов, проводящих исследования

Сотрудники лаборатории, проводящие оценку действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам, должны иметь специальное образование и практический опыт работы с веществами 1—2 класса опасности в форме традиционной дисперсности не менее 0,5 года.

Персонал обязан:

- знать свойства наночастиц и наноматериалов, применяемых при проведении исследований, включая возможные последствия от их воздействия на организм человека;
- ознакомиться с мерами по снижению рисков, имеющих место при работе с наноматериалами;
- быть ознакомлен с практикой и общими рекомендациями, касающимися работы в данной лаборатории;
- пройти инструктаж по технике безопасности и стандартным операционным процедурам работы с наноматериалами;
- пройти обучение по технике безопасности проведения исследований с использованием наноматериалов.

3.4. Мероприятия по обеспечению качества проводимых исследований

3.4.1. Контроль за качеством работ включает в себя: оформление перечня исследований, проводимых в организации, с указанием для каждого исследования руководителя и заказчика, названия исследуемого наноматериала; перечня исследуемых биологических образцов, даты начала и состояния каждого исследования на текущий момент времени; оценку протоколов и методов исследования на соответствие правилам лабораторной практики; мониторинг текущих исследований; отчет о проведенных проверках и рекомендации по устранению недостатков.

3.4.2. Для осуществления программы по обеспечению качества исследований все производственные операции проводятся в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП). Соблюдение СОП осуществляется в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

3.5. Соблюдение мер конфиденциальности

Организация, проводящая исследования действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации. Сотрудники, принимающие участие в проведении исследований действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.6. Ответственность организации, проводящей исследование

Организация, осуществляющая исследование действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам, должна являться самостоятельной правовой единицей, несущей юридическую ответственность.

Основным документом, подтверждающим результаты определения наноматериалов, является отчёт о проведённом исследовании. Отчет должен удовлетворять требованиям, изложенным в пунктах 4.8 и 5.5.

3.7. Меры предосторожности при введении наноматериалов в растения, препарировании биоматериала, отборе и консервации проб, проведении исследований

3.7.1. Наночастицы и наноматериалы, используемые в биологических экспериментах, следует во всех случаях рассматривать как потенциально опасные вещества, если иное не установлено. Уровень потенциальной опасности наноматериалов для человека и окружающей среды может быть предварительно оценен с применением МР 1.2.2522—09.

3.7.2. Каждый наноматериал, используемый в исследовании, должен быть снабжён паспортом безопасности, составленным в соответствии с ГОСТ 30333—2007.

3.7.3. Органы и ткани растений, подвергнутых воздействию наноматериалов, следует рассматривать как источники потенциальной биологической опасности.

3.7.4. В ходе проведения исследований необходимо соблюдать правила безопасного обращения с наноматериалами, установленные в утверждённых руководителем лаборатории инструкциях по технике безопасности и действующих СОП.

3.8. Нештатные ситуации и меры по их устранению

3.8.1. При розливе дисперсии наноматериала внутри бокса биологической безопасности:

- подождать не менее 5 мин для очистки воздуха от аэрозоля;
- обязательно надеть одноразовый халат, очки и перчатки;
- во время проведения уборки оставить бокс включенным;
- собрать пролитую дисперсию (раствор) наноматериала специальной абсорбирующей губкой или одноразовыми впитывающими салфетками, замоченными в дезинфицирующем растворе (для биогенных наноматериалов) или в растворе лабораторного детергента (для абиогенных наноматериалов);
- салфетками, смоченными дезинфицирующим раствором (для биогенных наноматериалов) или раствором лабораторного детергента (для абиогенных наноматериалов) протереть все поверхности внутри бокса, включая стены, рабочую поверхность и размещенное внутри бокса оборудование;
- уничтожить после обезвреживания все загрязненные одноразовые материалы согласно правилам лаборатории по уничтожению биологически опасных материалов;
- предметы многократного использования перед процедурами очистки и автоклавирования поместить в контейнеры с крышками или завернуть в бумагу;
- загрязненные биогенными наноматериалами предметы, которые нельзя автоклавировать, перед удалением из рабочей зоны бокса биологической безопасности замочить на 20 мин в дезинфицирующем растворе, в случае загрязнения абиогенными наноматериалами – замочить на 1 ч в растворе лабораторного детергента;
- одноразовую одежду, в которой проводилась уборка бокса биологической безопасности, запечатать в пакеты и уничтожить после обезвреживания;
- перед возобновлением работы (или перед выключением бокса) оставить бокс биологической безопасности работающим еще на 10 мин.

3.8.2. При розливе дисперсии (раствора) наноматериала в лаборатории, вне бокса биологической безопасности:

- вызвать специальную службу, если пролитый наноматериал представляет серьезную биологическую опасность, относится к уровню биологической опасности второго уровня или выше;
- удалить из лаборатории весь персонал; в зону пролитой жидкости вернуться после осаждения аэрозоля не ранее, чем через 15 мин;

• всю загрязненную одежду запечатать в специальные пакеты для биологических отходов и уничтожить после обезвреживания;

• при проведении уборки надеть одноразовый халат, обязательно использовать очки и перчатки из латекса или полимерного материала;

• положить на пролитую жидкость несколько бумажных полотенец для ее абсорбции, сверху положить второй слой полотенец или салфеток, пропитанных дезинфицирующим средством (если пролит биогенный наноматериал) или лабораторным детергентом (для абиогенного наноматериала);

• через 20 мин собрать и уничтожить после обезвреживания все загрязненные одноразовые материалы согласно правилам лаборатории по уничтожению и дезинфицированию биологически опасных материалов;

• предметы многократного использования подвергнуть обеззараживанию;

• протереть поверхности всего оборудования в зоне розлива наноматериала соответствующим обеззараживающим средством;

• одноразовую одежду, в которой проводилась уборка, собрать в пакеты и уничтожить после обезвреживания.

3.8.3. При транспортировании наноматериала вне лаборатории:

• вызвать представителей специальных служб и оказывать им содействие по устранению пролитой жидкости и рассыпанных порошков, представляющих биологическую опасность;

• материал, представляющий биологическую опасность, собрать и запечатать в промаркированный контейнер, размещенный внутри специальной тары для транспортирования; эта тара должна иметь крышку, быть небьющейся и иметь маркировку биологически опасного материала;

• из зоны, загрязнённой наноматериалом, удалить посторонних людей;

• при обеззараживании загрязнённой территории следовать инструкциям представителей специальных служб.

IV. Порядок оценки действия наноматериалов на высшие растения по морфологическим признакам в лабораторных условиях

4.1. Составление плана (дизайна) исследования

Перед проведением исследования сотрудником, ответственным за проведение исследования, составляется его подробный план. План подписывается всеми исполнителями работ и утверждается руководителем

организации (лаборатории, испытательного центра), проводящей исследование.

План исследования включает:

- наименование и адрес заявителя (заказчика) исследования;
- наименование и адрес организации, которая производила отбор проб (образцов);
- информацию, представленную заявителем (заказчиком) исследования;
- сведения о свойствах наноматериала;
- сведения о традиционном аналоге наноматериала;
- применяемый носитель наноматериала (растворитель, разбавитель, эмульгатор и т. д.);
- используемые растения: вид, число растений в группе, перечень опытных групп и контролей;
- характеристику вводимого наноматериала и его традиционного аналога: дозу введения, способ введения, схему введения, время между введениями;
- наименование исследуемых материалов (проб), количество (число, объем, масса) проб, метод отбора проб, способ консервации проб;
- метод статистической обработки результатов;
- перечень определяемых показателей.

При составлении плана исследований следует использовать методы отбора проб и биологического тестирования наноматериалов на растительных объектах, утверждённые в установленном порядке (МУ 1.2.2635—10, МУ 1.2.2742—10 и другие).

Вносимые в план исследования изменения утверждаются руководителем исследования, а отклонения от утверждённого плана (незапланированные события, непредвиденные обстоятельства и т. д.) записываются, пронумеровываются, подписываются руководителем исследования, датируются и прилагаются к отчёту, составляемому по результатам исследования.

4.2. Определение вида растительных организмов, пригодных для проведения исследований

Для оценки действия наноматериалов на цветковые растения по морфологическим признакам в лабораторных условиях целесообразно использовать проростки семян цветковых растений – пшеницы, ржи, ячменя, овса, кукурузы, редиса красного круглого, белой горчицы, лука, фасоли обыкновенной, картофеля. Семена тест-культур должны принад-

лежать к одному виду и сорту, соответствовать 1-му классу, быть одного года урожая, не обработанными протравителями и удостоверенными соответствующими документами.

Наиболее удобной моделью для оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам являются проростки семян кресс-салата. Кресс-салат как биоиндикатор отличается быстрым прорастанием семян и почти стопроцентной всхожестью, которая заметно уменьшается в присутствии загрязнителей. Кроме того побеги и корни этого растения под действием загрязнителей подвергаются заметным морфологическим изменениям (задержка роста, искривление побегов, уменьшение длины и массы корней). Кресс-салат как биоиндикатор удобен еще и тем, что действие стрессоров можно изучать одновременно на большом числе растений при небольшой площади рабочего места. Привлекательны и весьма короткие сроки эксперимента. Семена кресс-салата прорастают уже на 3—4-й день.

Для предварительной оценки повреждающего действия наноматериалов на проростки семян может быть использована следующая шкала:

1. (–) Повреждающее действие отсутствует.

Всхожесть семян достигает 90—100 %, всходы дружные, проростки крепкие, ровные. Эти признаки характерны для контроля, с которым следует сравнивать опытные образцы;

2. (+) Слабое повреждающее действие.

Всхожесть 60—90 %. Проростки почти нормальной длины, крепкие, ровные;

3. (++) Среднее повреждающее действие.

Всхожесть 20—60 %. Проростки по сравнению с контролем короче и тоньше. Некоторые проростки имеют уродства;

4. (+++) Сильное повреждающее действие.

Всхожесть семян очень низкая (менее 20 %). Проростки мелкие и уродливые.

4.3. Определение способа (метода) введения наноматериалов

Наноматериалы вводят в цветковые растения путем проращивания семян в субстратах, содержащих наноматериалы в виде водных дисперсий, или путем нанесения наноматериалов на поверхность семян. Процедура введения наноматериалов в растения путем проращивания семян в кварцевых субстратах, содержащих наноматериалы, включая описание условий проведения эксперимента, подготовку лабораторной посуды, субстрата для проращивания семян, подготовку семян, процедуру про-

ращивания семян или нанесения на них наноматериалов, представлена в МУ 1.2.2635—10.

4.4. Подготовка проб наноматериалов для введения в растения

Введение нерастворимых наноматериалов допускается в виде водных дисперсий (суспензий, взвесей). При приготовлении дисперсии наноматериалов необходимо применять физические методы диспергирования (перемешивание, встряхивание, ультразвуковая обработка). Применение детергентов и минеральных веществ, способных оказать повреждающее действие на организм растений, не допускается. В отдельных случаях возможно применение специальных носителей, стабилизирующих дисперсии наноматериалов (электролиты, полимеры, растворы ПАВ), которые не должны в рабочих концентрациях оказывать повреждающее воздействие на растения, что подтверждается данными литературы или исследованиями с использованием дополнительных контрольных групп растений, обрабатываемых этими носителями наноматериалов в эквивалентных опытным группам количествах.

4.5. Определение численности экспериментальных групп

При проведении стандартного эксперимента формируется 4 группы проростков растений. Семена для проращивания разделяют на следующие группы:

- 1-я группа, контрольная, не обрабатываемая наноматериалом;
- 2-я группа подвергается воздействию изучаемыми наноматериалами не менее чем в трёх возрастающих концентрациях;
- 3-я группа подвергается воздействию традиционного аналога наноматериала (если таковой имеется) не менее чем в трёх возрастающих концентрациях;
- 4-я группа подвергается воздействию носителя (дисперсионной среды), если используется иная, чем дисперсия в деионизованной воде форма введения наноматериала.

Численность семян в каждой группе, подвергаемой воздействию одной концентрации каждого тестируемого образца, должна быть не менее 10 экземпляров.

Растения группы 1 подвергают экспозиции деионизованной водой по той же схеме, что и тестируемый наноматериал и его традиционный аналог.

4.6. Расчёт доз вводимых наноматериалов

Доза вводимых в растения наноматериалов рассчитывается как массовая концентрация в единице массы (объёма) субстрата для проращивания семян. Для наноматериалов, предварительно охарактеризованных по величине удельной поверхности в расчёте на единицу массы, дополнительно рассчитывают дозу в единицах площади поверхности межфазной границы наноматериала на единицу массы/объёма указанных сред. Для монодисперсных наноматериалов дозу выражают через число частиц в единице массы/объёма сред, применяемых при тестировании.

4.7. Получение токсикологической характеристики наноматериала

Токсикологическая характеристика наноматериала должна включать изучение зависимости доза–эффект:

а) относительно дозы, выраженной через массу наноматериала;

б) относительно дозы, выраженной через площадь поверхности частиц;

в) относительно дозы, выраженной через число частиц (в случае монодисперсных наноматериалов).

4.8. Составление отчёта о результатах работ по оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

По завершении исследований оформляют отчет, в котором должны быть представлены:

- название, адрес организации-исполнителя;
- даты начала и завершения исследований;
- цель и задачи исследования;
- описание исследуемого наноматериала, включая имеющиеся сведения о физических, химических, биологических, токсикологических свойствах;
- вид, количество растений в каждой группе;
- форма, дозы, кратность и путь введения исследуемого наноматериала в растения;
- методы оценки повреждающего действия наноматериалов на растения;
- методы статистической обработки результатов;
- результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков, с соответствующей статистической обработкой, и комментариев к ним;

• обсуждение результатов;

• выводы;

• список использованной литературы.

Отчет о результатах проведенного исследования составляется ответственным исполнителем, утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

Обязательным требованием к отчёту является оформление в соответствии с ГОСТ 7.32—2001.

V. Порядок оценки действия наноматериалов на высшие растения по морфологическим признакам в естественных популяциях

5.1. Составление плана (дизайна) исследования

План оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам в естественных популяциях включает:

• наименование и адрес заявителя (заказчика) исследования;

• наименование и адрес организации, которая производила отбор проб (образцов);

• информацию, представленную заявителем (заказчиком) исследования;

• обоснование выбора сроков (сезона) обследования растений в естественных популяциях;

• характеристику территории, на которой производится обследование растений (местоположение, наличие антропогенных факторов загрязнения, близость к предприятиям наноиндустрии, наличие пылевых или жидких выбросов этих предприятий), мест сбора образцов;

• характеристику обследуемой флоры: вид растений, число растений в группе, перечень опытных групп;

• наименование исследуемых материалов (проб): единица измерений проб (объем, масса), метод отбора пробы, способ консервации пробы;

• количество отбираемых проб;

• сведения о свойствах наноматериала, присутствующего в окружающей среде (если он известен);

• перечень определяемых показателей;

• метод статистической обработки результатов.

5.2. Определение видового состава популяции, подлежащего сбору (обследованию)

С целью исследования влияния наноматериалов на растения отбирают пробы травянистых растений. Для этого определяют доминантные виды, представленные в фитоценозе очень большим количеством экземпляров, зарегистрированных на определенной площади. Оценку действия наноматериалов производят на основе морфометрического анализа доминантных видов.

Методики отбора проб растительного сырья для исследования представлены в МУ 1.2.2742—10 и МР 1.2.2640—10.

5.3. Контрольные группы

В целях достоверного выявления морфологических изменений в растениях, подвергшихся воздействию наноматериалов в природных условиях целесообразно проводить сопоставление полученных данных с результатами обследования аналогичных по видовому составу и условиям произрастания растительных популяций, не подвергавшихся воздействию наноматериалов (на чистых, не зараженных наноматериалами территориях). При невозможности отбора образцов растений из таких популяций следует ориентироваться на референтные данные о морфологических параметрах растений данной таксономической принадлежности, представленные в специализированной литературе (определителях растений). Перечень рекомендуемых для этого литературных источников приведён в прилож. 3 (ссылки 1—4).

5.4. Определение периодичности обследования растений в естественных популяциях на повреждающее действие наноматериалов

В зависимости от цели и задач мониторинга выделяют следующие виды наблюдений за повреждающим действием наноматериалов на флору:

- исходные наблюдения, фиксирующие уровни повреждающего действия наноматериалов на растения в естественных популяциях на момент начала проведения мониторинга;
- плановые (периодические или сезонные) наблюдения в соответствии с графиком мониторинга;
- внеплановые (оперативные) наблюдения в случае возникновения чрезвычайных ситуаций (промышленных аварийных выбросов);
- сплошное обследование с целью определения зоны поражения в случае промышленных аварийных выбросов.

Плановое наблюдение за состоянием дикорастущей флоры в зонах промышленного загрязнения наноматериалами проводится один раз в год – в начале вегетационного периода (май—июнь для средней полосы России).

5.5. Порядок обследования флоры в чрезвычайных ситуациях (аварийные промышленные выбросы)

Сплошное обследование проводится после аварии с целью оценки действия наноматериалов на растения. Сплошное обследование флоры проводится на всей территории, расположенной на прогнозируемом следе выпадений осадков, содержащих наночастицы, в соответствии с данными метеорологических наблюдений на момент выброса и в течение последующих суток.

5.6. Составление отчёта о результатах работ по оценке действия наноматериалов на природную флору по морфологическим признакам

По завершении исследований оформляют отчет, в котором должны быть представлены:

- название, адрес организации-исполнителя;
- даты начала и завершения исследований;
- цель и задачи исследования;
- описание наноматериала, являющегося контаминантом объектов окружающей среды (если он известен), включая имеющиеся сведения о физических, химических, биологических, токсикологических свойствах;
- видовой состав обследованных растений;
- объём обследования (число отобранных образцов растений на каждой территории);
- контрольные точки для отбора проб растений (в привязке к расположению предприятий наноиндустрии – потенциальных источников загрязнения, сельхозугодий, населённых пунктов);
- схема отбора биологических образцов;
- критерии оценки повреждающего действия наноматериалов на растения;
- методы статистической обработки результатов;
- результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков, с соответствующей статистической обработкой, и комментариев к ним;
- обсуждение результатов;
- выводы;

• список использованной литературы.

Отчет о результатах проведенного исследования составляется ответственным исполнителем, утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

Обязательным требованием к отчёту является оформление в соответствии с ГОСТ 7.32—2001

VI. Методы оценки действия наноматериалов на высшие растения по морфологическим признакам

6.1. Перечень реактивов и оборудования, применяемых при оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

Весы лабораторные общего назначения, 4-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—2001
Весы лабораторные общего назначения, 4-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 1 000 г	ГОСТ 24104—2001
Термостат ТС-1/80 СПУ	ТУ 9452-02-00141798—97
Ультразвуковой дезинтегратор, модель MSS 150 производства фирмы «Sanyo» или аналогичный	
Термометр лабораторный шкальный с диапазоном измерения от 0 до 50 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С	ГОСТ 28498—90
Холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (–20 ± 1) °С и хранение проб (от 2 до 4 °С)	ГОСТ 26678—85 с изм. от 87 года
Чашки Петри	ТУ 9443-004-16548645—00
Лабораторные автоматические дозаторы на объемы 0,1 и 0,2 $см^3$	ТУ 9452-002-33189998—2002
Колбы мерные 2-25-2; 2-50-2; 2-100-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Ножницы или секатор	
Линейка	
Лупа	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Вода питьевая	ГОСТ Р 51232—98

6.2. Характеристика органов и систем, подлежащих обследованию (на примере цветковых растений)

Для оценки действия наноматериалов на цветковые растения должны быть охарактеризованы следующие органы и системы растений:

6.2.1. Корневая система. Для оценки действия наноматериалов на рост и развитие корней целесообразно проводить наблюдения за растениями в процессе проращивания семян в субстратах, содержащих наноматериалы. Для оценки действия необходимо проводить измерения длины колеоптиля, зародышевого корня, зоны элонгации главного корня, длины корневых волосков и подсчет их числа.

6.2.2. Стебель. Целесообразно охарактеризовать изменения в результате действия наноматериалов высоты и толщины стеблей растений, направления роста, толщины сечения стебля, количества боковых побегов, а также провести расчет процентного соотношения генеративных побегов от общего числа побегов.

6.2.3. Почки. Для оценки действия наноматериалов на почки целесообразно охарактеризовать растения по следующим параметрам: изменения в результате действия наноматериалов количества, размеров и формы почек; соотношение генеративных и вегетативных почек.

6.2.4. Листья. В целях оценки действия наноматериалов на процессы роста и анатомическое строение листьев целесообразно охарактеризовать растения по следующим параметрам: изменение в результате действия наноматериалов количества листьев у растения, формы и величины листовой поверхности (процент живой части листа, процент некроза листа), пигментации листьев, толщины пластинки листа, наличия опушения и воскового налета, длины черешка и размера прилистников.

6.2.5. Репродуктивные органы (цветок). Для оценки действия наноматериалов на процессы роста и анатомическое строение цветка целесообразно охарактеризовать растения по следующим параметрам: изменения в результате действия наноматериалов количества цветков, количества цветков в соцветии, длины цветоножки, развития околоцветника (чашечки и лепестков) и генеративных органов (андроцея и гинецея), окраски лепестков.

6.2.6. Семена. Для оценки действия наноматериалов на семена целесообразно охарактеризовать растения по следующим параметрам: изменения в результате действия наноматериалов размера семян, их количества и формы.

6.2.7. Плод. Для оценки действия наноматериалов на плод целесообразно охарактеризовать растения по следующим параметрам: изменение-

ния в результате действия наноматериалов размера плодов, их количества и формы.

При наличии у растения метаморфизированных органов анализируются их параметры для оценки действия наноматериалов.

Кроме того целесообразно проводить наблюдения за растениями в процессе проращивания семян в субстратах, содержащих наноматериалы, для характеристики изменений в результате воздействия наноматериалов всхожести семян, условий их прорастания, изменения в развитии проростков.

Целесообразно на каждой стадии онтогенеза отмечать наличие и типы морфозов для всех органов растений.

6.3. Оценка действия наноматериалов по качественным показателям

На организменном уровне живого воздействие наноматериалов различимо по качественным показателям благодаря появлению внешних симптомов повреждения.

6.3.1. При серьезных повреждениях появляются визуально фиксируемые признаки повреждения растений (характерны для высоких концентраций повреждающего фактора): изменение цвета, структуры побега и корневой системы, ингибирование образования корневых клубеньков, хлорозы, некрозы, ослизнение и загнивание, ингибирование образования корневых клубеньков, падение тургора зеленой части растения. При хроническом типе повреждения растительности, обусловленном длительным воздействием низких концентраций повреждающего фактора, также может наблюдаться преждевременная дефолиация, уменьшение облиственности, отмирание отдельных побегов и даже гибель растения.

6.3.2. Появление общих ксероморфных признаков у растения (уменьшение их размеров и числа на побегах, утолщение листовой пластинки, увеличение числа устьиц на единицу площади и уменьшение толщины кутикулы) также может свидетельствовать о повреждающем воздействии наноматериалов.

6.3.3. При малых уровнях загрязнения среды наноматериалами видимые морфологические изменения могут не наблюдаться, и в течение длительного времени создается обманчивое впечатление здоровых растений. Процессы ослабления и отмирания значительно растянуты во времени, что затрудняет диагностику. Целесообразно проводить комплексное морфологическое обследование растений, для которых возможно загрязнение наночастицами, с использованием методов морфометрии.

6.4. Оценка действия наноматериалов на растения с использованием методов морфометрии

6.4.1. Характеристика морфометрических методов

Работа по оценке действия наноматериалов на растения с использованием методов морфометрии сопряжена с рядом особенностей.

6.4.1.1 При использовании морфометрических методов для оценки действия наноматериалов на растения необходимо учитывать, что метамерные признаки растений изменяются в ходе онтогенеза и неодинаково реагируют на загрязнение среды наноматериалами. Растения разных онтогенетических состояний существенно различаются длительностью ростовых процессов и характером накопления биомассы в ходе сезонного развития Следовательно, на уровень выраженности признака оказывают влияние как наличие наноматериалов, так и онтогенетическое состояние растений. В процессе онтогенеза, а также в условиях загрязнения среды происходит изменение многих морфометрических показателей (длина побега, линейные размеры листьев, площадь листовой пластинки, биомасса и т. д.)

В характере изменчивости морфологических параметров проявляются некоторые общие закономерности. Одни параметры в ходе индивидуального развития увеличивают размер листовой поверхности и биомассу листьев, другие – снижают площадь отдельного листа, а третьи сохраняют в онтогенезе неопределенную изменчивость, например число листьев, ширина листовой пластинки.

Возрастную принадлежность особей определяют по признакам-маркерам надземной части, которые для каждого вида свои (рекомендуется использование методики периодизации онтогенеза согласно прилож 3, ссылки 5—7).

6.4.1.2. Признаками, указывающими на воздействие наночастиц, могут являться 1—2 морфометрических параметра. Отмечается различная реакция органов растений, иногда даже полярно противоположная.

Проводя морфологический мониторинг необходимо определить те признаки, которые обнаруживают наибольшую изменчивость при переходе из одних условий в другие. В большинстве случаев наблюдаемые признаки лишь косвенно характеризуют изучаемое явление.

6.4.1.3. Основная задача обработки – выделение ключевых признаков, что позволяет «сжать» информацию, содержащуюся в большом количестве измеряемых признаков.

Растения одной онтогенетической стадии описывают по нескольким морфометрическим признакам (от 3 до 40), включая признаки как вегетативной, так генеративной сфер. Измерения листьев и цветков про-

водят в период массового цветения: определяют параметры всех листьев особи и первого цветка в соцветии. Для определения параметров плодолистика зрелого плода после созревания семян берут первый плод каждой особи. Размеры луковиц и количество «деток» определяют в период ростового покоя.

6.4.1.4. Для сопоставления изменчивости морфологических признаков в качестве меры изменчивости рекомендуется применять коэффициент вариации, оценка которого может быть проведена по эмпирической шкале уровней изменчивости (прилож. 3, ссылка 8).

6.4.2. Статистическая обработка результатов измерений

После проведения морфометрических измерений в группе растений результаты оценки каждого признака представляют в виде вариационного ряда, ранжируя их в порядке возрастания от наименьшего (min) к наибольшему (max) значению.

Для определения статистической достоверности различий между результатами морфометрических исследований в двух вариационных рядах для опытной и контрольной групп (выборок) растений следует использовать стандартное отклонение, вычисляемое по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}\ , \text{ где}$$

s – стандартное отклонение;

n – объём выборки;

x_i – i-й элемент выборки;

$\bar{x}$ – среднее арифметическое выборки.

При необходимости для определения статистической достоверности полученных данных подсчитывают величину критерия Стьюдента для двух выборок и сравнивают с табличным значением при уровне значимости $P = 0{,}05$.

Амплитуду изменчивости признаков характеризуют коэффициентом вариации (CV):

$$CV = \bar{x} / (s\sqrt{n}) \times 100\ \%$$

Выделяют группы признаков с очень низким значением CV (до 7 %), низким (7—12 %), средним (13—20 %), высоким (21—40 %) и очень высоким (40 % и выше). По характеру и степени варьирования морфологических признаков делают выводы о пластичности вегетативных и генеративных признаков при действии наноматериалов на растения.

Как правило, более пластичной является вегетативная сфера (корень, стебель, листья).

Проявление адаптивной фенотипической пластичности в наибольшей степени характерно в вегетативной сфере.

В генеративной сфере наиболее стабильные признаки. Параметры генеративной сферы более жестко детерминированы генетически по сравнению со сферой вегетативной.

Для оценки общего состояния растений на определенной территории, подвергающейся повышенному воздействию наноматериалов рекомендуется использовать индекс фитотоксичности (Ф), который представляет собой отношение показателей роста и развития растений в контрольной и опытной группах. При невозможности установления контрольной группы растений при натурных обследованиях флоры в природных условиях используют референтные показатели для данного вида, представленные в литературе (прилож. 3 ссылки 1—4). Расчет индекса фитотоксичности проводился по показателям морфологической угнетенности, например длина корня (Ф1), высота стебля (Ф2) и площадь листовой пластинки (Ф3).

При проведении статистической обработки результатов исследования рекомендуется использовать специализированное профессиональное программное обеспечение (пакеты программ STATICTICA, SPSS, PASW и аналогичные).

6.5. Форма представления результатов по оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим показателям

Отчёт о результатах исследования биологического действия наноматериалов на высшие растения должен содержать результаты проведенных тестов, представленные стандартным, доступным для последующего анализа и представления способом. Наилучшим вариантом представления данных является их занесение в таблицы морфометрических признаков. Пример таблицы по некоторым признакам п. 6.1 приведен ниже.

Таблицы морфометрических признаков составляются для каждой контрольной и опытной (подвергнутой воздействию определённой дозы наноматериала или его носителя) группы растений, а в случае обследования в природных популяциях – для каждой группы растительных образцов, отобранной в данной контрольной точке.

Таблица

Форма представления результатов учёта морфометрических признаков (на примере цветковых растений)

Орган		Признак	Показатели*			
			min	max	$\bar{x} \pm s$	CV, %
Стебель		количество побегов, шт.				
		длина, см				
		ширина, см				
Корень		количество корней, шт.				
		длина, см				
		ширина, см				
Лист		количество, шт.				
		длина, см				
		ширина, см				
		площадь, $см^2$				
Цветок	Цветок	количество, шт.				
	Соцветие	количество, шт.				
	Околоцветник	количество листочков, шт.				
		высота, см				
		ширина, см				
	Андроцей	количество тычинок, шт.				
		высота, см				
		ширина, см				
	Гинеций	количество завязей, шт.				
		высота, см				
		ширина, см				
Плод		количество, шт.				
		высота, см				
		ширина, см				
		масса, г				
Семя		количество, шт.				
		высота, см				
		ширина, см				
		масса, г				
* Обозначения согласно пункту 6.4.2						

VII. Критерии оценки состояния низших растений – биоиндикаторов, применяемых в мониторинге наноматериалов

7.1. Метод оценки безопасности наноматериалов на модельной системе грибов и грибоподобных организмов в условиях in vitro

7.1.1. Принцип метода

Воздействие наноматериалов оценивается по влиянию наночастиц на скорость роста и морфологию колонии грибов и грибоподобных организмов на питательной среде в лабораторных условиях. В качестве тестовых изолятов при исследовании используют изоляты грибов видов *Alternaria alternata* и *Pleurotus ostreatus,* а также оомицета *Phytophthora infestans*.

7.1.2. Характеристика используемых организмов и тест-систем

В качестве модельной системы используют культуры грибов, видовая принадлежность которых доказана проведенными морфологическими и молекулярно-генетическими исследованиями. Морфология колоний, размер и форма конидиеносцев и конидий, структура фрагментов ДНК используемых изолятов должны быть типичными для вида.

Для исследования используются изоляты грибов из разных таксономических и эколого-трофических групп. *A. alternata* – несовершенный гриб, по молекулярным данным близкий к аскомицетам. В природе развивается на отмершем растительном субстрате как сапротроф, либо на живых тканях растений как некротрофный паразит. *Pl. ostreatus* – базидиомицет, развивается на мертвой древесине или ослабленных деревьях. *Ph. infestans* – оомицет, паразитирует на растениях семейства паслёновых, в т. ч. на картофеле, томате и баклажане.

7.1.3. Оборудование и материалы

Термостат, поддерживающий рабочую температуру от 18 до 24 °С с отклонением от заданной ± 1 °С или аналогичный	ТУ 64-1-1382—72
Ламинарный шкаф марки ЛШ-1 производства фирмы «Biokom» или аналогичный, либо оборудованный бокс для работы с чистыми культурами	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин	
Холодильник бытовой электрический или аналогичный для хранения культур	ГОСТ 26678—85

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности или аналогичные	ГОСТ 24104—2001
Дистиллятор ДЭ 4 или аналогичный	
Микроскоп «Ломо Микмед-1» или аналогичный	
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или аналогичный	ТУ 954-001-0492102—01
Дозаторы с переменным объёмом дозирования фирмы «Gilson»: 2—20 мкл, 20—200 мкл и 100—1 000 мкл с точностью ± 0,5 % или аналогичные	
Пробирки полипропиленовые стерильные с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 $см^3$	
Наконечники пластиковые объемом 1—200 $мм^3$	
Наконечники пластиковые объемом 200—1 000 $мм^3$	
Перчатки резиновые	ГОСТ 3—88
Колбы плоскодонные конические на 1 $дм^3$	ГОСТ 1770—74
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Чашки Петри пластиковые диаметром 100 мм	
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Стальное или латунное микробиологическое сверло для нарезки агаровых блоков диаметром 7 мм	
Игла посевная микологическая из нихромовой проволоки диаметром 0,6 мм, длиной 60 мм с загнутым концом длиной 5 мм, укрепленная на проволочной ручке длиной 25 см из стальной проволоки диаметром 3 мм	
Пленка парафиновая «Parafilm»	

7.1.4. Реактивы

1. Неохмеленный солодовый экстракт «MALTAX 10» (60 барингов) производства фирмы «SENSON OY» (Финляндия) или аналогичный и овсяные хлопья «Геркулес» для приготовления питательных сред
2. Bacto-agar производства фирмы «Difco»
3. Вода дистиллированная

Допускаются к использованию реагенты и материалы аналогичного назначения других изготовителей, разрешенные к применению в уста-

новленном порядке и с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с данным документом.

7.1.5. Методика введения тестируемого образца наноматериала

Образцы наноматериалов в исследуемых концентрациях вносят в виде водной дисперсии дозатором в колбы с расплавленной питательной средой при температуре последней не более 65 °С. После внесения образцов среду в колбе перемешивают, дают настояться в течение 3 мин, после чего разливают по чашкам Петри слоем 4—5 мм (около 25 см³ среды на 1 чашку). Тестерные штаммы сажают агаровым блоком с мицелием в центр чашки со средой.

Для тестирования используют концентрацию наноматериалов в среде 0,1; 1; 10; 100; 1 000 и 10 000 мг/дм³. Для этого на 0,5 дм³ среды необходимо добавить соответственно 50; 500; 5 000; 50 000 и 500 000 мкг препарата (по действующему веществу). Для удобства внесения малых доз наноматериала можно приготовить маточный раствор концентрации 5 мг/см³ (по действующему веществу) в полипропиленовых пробирках на 15 см³ с завинчивающейся крышкой. В контрольные чашки наноматериал не добавляется. Для теста необходимо подготовить по 5 чашек для каждой концентрации и контроля.

При диспергировании наноматериалов перед внесением в питательную среду применяют физические методы (встряхивание, перемешивание, ультразвук). Применение детергентов не допускается. В случае внесения наноматериала в питательную среду на носителе, ином чем дистиллированная вода, необходимо проведение контрольного тестирования с этим носителем в эквивалентной концентрации.

7.1.6. Методика проведения анализа

7.1.6.1 Приготовление сред

1. Агаризованная среда на основе пивного сусла используется для оценки скорости роста изолятов грибов *A. alternata* и *Pl ostreatus*. Для ее приготовления неохмеленный солодовый экстракт «MALTAX 10» (60 барингов) разбавляется в 6 раз; для приготовления питательной среды берется 0,2 дм³ разбавленного «MALTAX 10» и 0,8 дм³ дистиллированной воды. Приготовленная жидкая среда разливается по 0,5 дм³ в колбы объемом 1 дм³, после чего в них добавляется Bacto-agar из расчета 12 г/дм³. Колбы закупориваются ватно-марлевыми пробками и автоклавируются 30 мин при 1 атм.

2. Агаризованная овсяная среда используется для работы с оомицетом *P. infestans*. Для ее приготовления берется 120 г овсяных хлопьев, которые доводятся до кипения в 1 дм³ дистиллированной воды. Раствор

процеживается через 2 слоя марли и доводится до 1 дм³ Далее – как в предыдущем подпункте.

7.1.6.2. Условия инкубации

Инкубация грибов *A alternata* и *Pl ostreatus* проводится при температуре 24 °С, а оомицета *Ph infestans* – при температуре 18 °С.

7.1.6.3. Наращивание тестерных штаммов

За 1 неделю до проведения эксперимента готовятся чашки с инокулюмом тестерного штамма. Для этого из пробирки, в которой хранится тестерный штамм, вырезается агаровый блок с мицелием диаметром 5—7 мм и помещается в центр чашки Петри с соответствующей питательной средой. Инкубация проводится в течение 7 дней в соответствии с п. 7.1.6.2.

7.1.6.4. Подготовка тестерных изолятов к посадке

Непосредственно перед началом эксперимента простерилизованным в пламени газовой горелки или спиртовки и охлажденным в 96 %-м этиловом спирте микробиологическим сверлом поверхность чашки с инокулюмом разрезается на круги диаметром 7 мм. После работы с каждой чашкой с инокулюмом сверло необходимо простерилизовать в пламени и охладить в спирте.

7.1.6.5. Проведение эксперимента

В центр каждой чашки со средой, содержащей наноматериал, и в центр контрольной чашки (без наноматериала) с помощью посевной микологической иглы помещается мицелием вверх агаровый блок, вырезанный микробиологическим сверлом. Все тесты и контроль проводятся в 5 повторностях. После посева чашки заклеиваются пленкой Parafilm и помещаются на инкубацию.

7.1.6.6. Учет результатов

Учет результатов проводится на 3-и, 5-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки инкубации путем замера двух взаимно перпендикулярных диаметров колонии на чашке Петри.

Примечание Открывать чашку при проведении замеров до окончания инкубации категорически запрещается!

Морфологию колоний оценивают методом светооптической микроскопии на 11-е сутки инкубации. Проводят сопоставление результатов наблюдений с референтными морфометрическими характеристиками колоний лабораторных культур грибов *A. alternata* и *Pl. ostreatus,* представленными в источниках (прилож. 3, ссылки 9—10)

7.1.7. Учет полученных данных

Для оценки используют данные измерений на тот день, когда диаметр контроля составлял от 70 до 80 % диаметра чашки. Обработку полученных данных проводят подсчетом среднего арифметического для 5 повторов каждого измерения и контроля. Результаты измерений двух взаимно-перпендикулярных диаметров также усредняются. После этого находят относительную скорость роста для каждой концентрации по формуле:

$$CP = \frac{X_{ср}}{K_{ср}} \times 100\ \%\ ,\ \text{где}$$

CP – скорость роста относительно контроля;

$X_{ср}$ – среднее арифметическое диаметров колоний на среде с добавлением наноматериала,

$K_{ср}$ – среднее арифметическое диаметров контроля.

По результатам измерений (используя, например, графическое отображение или компьютерные программы) рассчитывают показатель EC_{50}, т. е. концентрацию наноматериала, замедляющую скорость роста колонии в 2 раза относительно контроля.

Если показатель EC_{50} более 5 000 – то токсичность наноматериала по отношению к тестовой группе организмов находится в пределах фоновых значений. От 1 000 до 5 000 – слаботоксичен, от 100 до 1 000 – токсичен, менее 100 – высокотоксичен.

7.1.8. Статистическая обработка данных

Для определения статистической достоверности различий между результатами анализов роста мицелия исследуемых организмов на разных концентрациях наноматериалов и на контроле следует использовать стандартное отклонение, вычисляемое как указано в пункте 6.4.2.

При необходимости для определения статистической достоверности полученных данных подсчитывают величину критерия Стьюдента для двух выборок и сравнивают с табличным значением при уровне значимости $P = 0{,}05$.

7.2. Метод оценки безопасности наноматериалов по прорастаемости конидий и ветвлению проростков гриба Alternaria alternata в условиях in vitro

7.2.1. Принцип метода

Воздействие наноматериалов оценивается по влиянию наночастиц на прорастание конидий и ветвление проростков гриба *Alternaria alternata* в лабораторных условиях.

7.2.2. Характеристика используемых организмов и тест-систем

В качестве модельной системы используют изоляты гриба *A alternata*, видовая принадлежность которых доказана проведенными морфологическими и молекулярно-генетическими исследованиями Морфология колоний, размер и форма конидиеносцев и конидий, структура фрагментов ДНК используемых изолятов должны быть типичными для вида.

A. alternata – несовершенный гриб, по молекулярным данным близкий к аскомицетам В природе развивается на отмершем растительном субстрате как сапротроф, либо на живых тканях растений как паразит – некротроф.

7.2.3. Приборы и оборудование

Термостат, поддерживающий рабочую температуру 24 °С с отклонением от заданной ± 1 °С или аналогичный	ТУ 64-1-1382—72
Ламинарный шкаф марки ЛШ-1 производства фирмы «Biokom» или аналогичный, либо оборудованный бокс для работы с чистыми культурами	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин	
Микроскоп «Ломо Микмед-1» или аналогичный	
Стекла предметные размером 76 × 26 × 2 мм и покровные размером 24 × 24 × 0,1 мм	
Холодильник бытовой электрический для хранения изолятов или аналогичный	ГОСТ 26678—85
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности или аналогичные	ГОСТ 24104—2001
Дистиллятор ДЭ 4 или аналогичный	
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или аналогичный	ТУ 954-001-0492102—01

Дозаторы с переменным объёмом дозирования фирмы «Gilson»: 2—20 мкл, 20—200 мкл и 100—1 000 мкл с точностью ± 0,5 % или аналогичные	
Пробирки полипропиленовые стерильные с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 $см^3$	
Наконечники пластиковые объемом 1—200 $мм^3$	
Наконечники пластиковые объемом 200—1 000 $мм^3$	
Перчатки резиновые	ГОСТ 3—88
Колбы плоскодонные конические на 0,5 $дм^3$	ГОСТ 1770—74
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Чашки Петри пластиковые диаметром 100 мм	
Игла посевная микологическая из нихромовой проволоки диаметром 0,6 мм, длиной 60 мм с загнутым концом длиной 5 мм, укрепленная на проволочной ручке длиной 25 см из стальной проволоки диаметром 3 мм.	
Пленка парафиновая типа «Parafilm»	

7.2.4. Материалы и реактивы

1. Картофель – 1 шт., морковь – 1 шт.
2. Bacto-agar производства фирмы «Difco» или аналогичный
3. Вода дистиллированная

Допускаются к использованию реагенты и материалы аналогичного назначения других изготовителей, разрешенные к применению в установленном порядке и с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с данным документом.

7.2.5. Методика введения тестируемого образца

Образцы наноматериалов в исследуемых концентрациях вносят дозатором в колбы с расплавленным сусло-агаром при температуре последнего не более 65 °С. После внесения образцов среду в колбе перемешивают, дают настояться в течение 3 мин, после чего разливают по чашкам Петри слоем 2—3 мм (около 15 $см^3$ среды на 1 чашку). Суспензию конидий ресуспендируют с помощью стерильного шпателя по поверхности среды.

Для тестирования используют концентрацию наноматериалов в среде 0,1; 1; 10; 100; 1 000 и 10 000 мг/$дм^3$. Для этого на 0,2 $дм^3$ среды необходимо добавить соответственно 20; 200; 2 000; 20 000 и

200 000 мкг препарата (по действующему веществу). Для удобства внесения малых доз наноматериала можно приготовить дисперсию наноматериала в концентрации 5 мг/см³ (по действующему веществу) в полипропиленовых пробирках на 15 см³ с завинчивающейся крышкой. В контрольные чашки наноматериал не добавляется. Для теста необходимо подготовить по 3 чашки для каждой концентрации и контроля.

Дисперсию наноматериала в питательной среде получают, как указано в пункте 7.1.5.

7.2.6. Методика проведения анализа

7.2.6.1. Приготовление сред.

Для приготовления агаризованной картофельно-морковной среды 20 г очищенного нарезанного кубиками картофеля и 20 г очищенной нарезанной кубиками моркови помещаются в колбу с 0,5 дм³ дистиллированной воды, доводятся до кипения. После кипения огонь отключить и выдержать 10 мин для лучшей экстракции, после чего процедить через 2 слоя марли. Объем среды довести дистиллированной водой до 1 л. Приготовленная жидкая среда разливается по 0,2 дм³ в колбы объемом 0,5 дм³, после чего в них добавляется Bacto-agar из расчета 12 г/дм³ Колбы закупориваются ватно-марлевыми пробками и автоклавируются 30 мин при 1 атм.

Для приготовления голодного агара в колбу объемом 0,5 дм³ разливается по 0,2 дм³ дистиллированной воды и в нее добавляется Bacto-agar из расчета 6 г/дм³. Колбы закупориваются ватно-марлевыми пробками и автоклавируются 30 мин при 1 атм.

7.2.6.2. Наращивание тестерных штаммов.

За 1 неделю до проведения эксперимента готовятся чашки с инокулюмом тестерного штамма. Для этого из пробирки, в которой хранится тестерный штамм, вырезается агаровый блок с мицелием диаметром 5—7 мм и помещается в центр чашки Петри с картофельно-морковной средой. Инкубация проводится в течение 7 дней в темноте при 24 °С.

7.2.6.3. Проведение эксперимента.

Из чашки с инокулюмом вырезается полоса агара с мицелием гриба и помещается в пробирку на 15 см³ с завинчивающейся крышкой, в которую предварительно налито 7 см³ стерильной (автоклавирование 30 мин при 1 атм.) дистиллированной воды. Пробирка взбалтывается на встряхивателе, после чего из нее берется проба в 50 мкл, помещается на предметное стекло и закрывается покровным стеклом. Просмотр ведется под микроскопом на увеличении 150Х. В одном поле зрения должно быть не менее 2 и не более 10 конидий (в среднем при просмотре 10 по-

лей зрения). Если число конидий меньше 2, то суспензия не подходит для дальнейшего использования; если больше 10 – то концентрацию надо уменьшить, разбавив стерильной дистиллированной водой.

В случае если в пробирке содержится необходимое число конидий, то 250 мкл суспензии конидий с помощью дозатора помещаются на поверхность голодного агара и ресуспендируются стерильным шпателем по его поверхности, после чего чашка заклеивается лентой Parafilm.

7.2.7. Учет результатов

Учет результатов проводится через 12 ч инкубации в темноте при 24 °С. Чашка помещается под микроскоп донышком вверх и просмотр ведется через слой агара. Допускается также открыть чашку и поместить ее под микроскоп. В каждой чашке случайным образом на увеличении 150Х выбирается 30 полей зрения, в которых учитываются все обнаруженные конидии. Конидия считается проросшей, если длина проростка превышает ширину конидии.

Учет ветвления проростков проводится через 20 ч инкубации. Учитываются все точки ветвления главной и боковых ветвей проростка.

7.2.8. Обработка полученных данных

Для каждой чашки число проросших и непроросших конидий суммируют, после чего вычисляют процент проросших конидий относительно числа проросших конидий в контроле. Для 3 повторностей результаты измерений усредняют.

По результатам измерений (используя, например, графическое отображение или компьютерные программы) рассчитывают показатель EC_{50}, т. е. концентрацию наноматериала, препятствующую прорастанию 50 % конидий (относительно контроля).

Если показатель EC_{50} более 5 000 – то токсичность наноматериала по отношению к тестовой группе организмов находится в пределах фоновых значений. От 1 000 до 5 000 – слаботоксичен, от 100 до 1 000 – токсичен, менее 100 – высокотоксичен.

Аналогично для каждой чашки суммируют число точек ветвления, после чего вычисляют процент числа точек ветвления относительно контроля. Для 3 повторностей результаты измерений усредняют. По результатам измерений точек ветвления (возможно использование компьютерных программ распознавания образов) рассчитывают концентрацию наноматериала, препятствующую образованию 50 % узлов ветвления (относительно контроля).

Приложение 1

Типовой протокол эксперимента по оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель лаборатории
(испытательного центра)

_____Фамилия И. О.
«___»_____20____ г.

Наименование лаборатории, проводящей исследования, сведения об аккредитации

ПРОТОКОЛ
лабораторного эксперимента по оценке действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам от «__» _____20__ г.

Название, адрес организации-исполнителя _____
Даты начала и завершения исследований _____
Цель и задачи исследования _____
Характеристика вводимого наноматериала:
– наименование _____
– доза введения _____
– способ введения _____
– схема введения _____
– время между введениями _____
Характеристика традиционного аналога наноматериала:
– доза введения _____
– способ введения _____
– схема введения _____
– время между введениями _____
Наличие растворителя, разбавителя, эмульгатора и т. д.
– концентрация_____
– стабильность _____
– объем _____
Информация об исследуемых растениях:
– вид _____
– количество растений в каждой группе _____
– перечень контрольных и опытных групп растений _____
Методы оценки повреждающего действия наноматериалов на растения_____
Перечень определяемых качественных показателей _____
Методы статистической обработки результатов_____
Результаты исследования, представленные в виде обобщающей таблицы (табл., п. 6.5):
Обсуждение результатов_____
Выводы _____
Список использованной литературы _____
Подписи:
Руководитель лаборатории (подразделения) _____
Ответственный исполнитель _____
Исполнители _____

Приложение 2

Обозначения и сокращения

ПАВ	Поверхностно-активное вещество
СОП	Стандартная операционная процедура
Ф	Индекс фитотоксичности
CV	Коэффициент вариации

Приложение 3

Рекомендуемая литература по оценке морфологических признаков высших растений и грибов

1. Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е изд. М: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 600 с.

2. Губанов И. А., Кисилева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. Иллюстрированный определитель растений средней России. Том 1. Папоротники, хвощи, плауны, голосеменные, покрытосеменные (однодольные). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2002. 528 с.

3. Губанов И. А., Кисилева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. Иллюстрированный определитель растений средней России. Том 2 покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2003. 672 с.

4. Губанов И. А., Кисилева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. Иллюстрированный определитель растений средней России. Том 3. Покрытосеменные (Двудольные. Раздельнолепестные). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 520 с.

5. Работнов Т. А. Вопросы изучения состава популяций для целей фитоценологии //Проблемы ботаники. 1950. Вып. 1. С. 465—483.

6. Уранов А. А. Возрастной спектр ценопопуляций как функция времени и энергетических волновых процессов //Научные доклады высш. школы. Биолог. науки. 1975. № 2. С. 7—34.

7. Уранов А. А. Классификация и основные черты развития популяций многолетних растений //Бюл. МОИП. Отд. биол. 1969. Т. 74. С. 119—134.

8. Мамаев С. А. Основные принципы методики исследования внутривидовой изменчивости древесных растений /С. А. Мамаев //Индивидуальная и эколого-географическая изменчивость растений. Свердловск: Изд-во УНЦ АН СССР, 1975. С. 3—14.

9. Высшие съедобные базидомицеты в поверхностной и глубинной культуре /Бисько Н. А., Бухало А. С., Вассер С. П. и др.; под общ. ред. Дудки И. А. Киев: Наукова Думка, 1983. 312 с.

10. Дудка И. А., Бурдюкова Л. И. Флора грибов Украины: Оомицеты. Фитофторовые и альбуговые грибы. Киев: Наукова Думка, 1996. 208 с.

Порядок биологической оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам

Методические указания
МУ 1.2.2968—11

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 16.03.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,5
Тираж 200 экз. Заказ 16

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

МУ 1.2.2968-11