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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32292— 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение токсичности для мальков рыб

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 августа 2013 г. № 58-П)

За принятие проголосовали:

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 августа 2013 г. № 801-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32292—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test No. 215:2000 «Рыба. Тест ювенального роста» («Fish, Juvenile Growth Test», IDT).

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

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2019 г.

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

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

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

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

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

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение токсичности для мальков рыб

Testing of chemicals of environmental hazard. Determination of toxicity for whitebaits of fishes

Дата введения — 2014—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы оценки эффектов длительного воздействия химических веществ на рост мальков рыб.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применимы термины с соответствующими определениями:

2.1 **наименьшая эффективная концентрация;** LOEC: Самая низкая установленная концентрация тестируемого вещества, при которой вещество оказывает значимый эффект (при p = 0,05) по сравнению с контролем. Однако, у всех испытательных концентраций выше LOEC должен отмечаться неблагоприятный эффект, равный или больший наблюдаемому в LOEC.

2.2 **неэффективная концентрация;** NOEC: Концентрация непосредственно ниже LOEC.

2.3 **ECx:** Концентрация тестируемого вещества, которая вызывает x % изменение в темпе роста рыбы при сравнении с контролем.

2.4 **уровень загрузки** (Loading rate): Живой вес рыбы на объем воды.

2.5 **плотность посадки** (Stocking density): Число рыб на объем воды.

2.6 **удельный темп роста индивидуальной особи** (Individual fish specific growth rate)**:** Темп роста, выраженный на одну особь, основанный на ее начальном весе.

2.7 **средний удельный темп роста на аквариум** (Tank-average specific growth rate): Средний темп роста популяции аквариума для одной концентрации.

2.8 **псевдоспецифичный темп роста** (Pseudo specific growth rate): Средний темп прироста по сравнению со средним начальным весом популяции аквариума.

3 Принцип тестирования

3.1 Мальки рыб в фазе экспоненциального роста перед размещением в аквариумах должны быть взвешены в лаборатории и распределены по диапазону подлетельных концентраций тестируемого вещества, разведенного в воде предпочтительно в проточном аквариуме, а если это не возможно, в полустатических (статическое возобновление) условиях.

3.2 Продолжительность теста составляет 28 дней.

3.3 Рыб необходимо ежедневно кормить. Порция корма рассчитывается из начального веса рыбы и может быть повторно установлена по истечении 14 дней. В конце теста рыб взвешивают повторно.

3.4 Эффекты на темпы прироста анализируют, используя модель регрессионного анализа для оценки концентрации, которая вызвала бы x изменений в процентах в темпе роста, то есть EC_x (например, EC_{10}, EC_{20} или EC_{30}).

3.5 Данные могут быть сравнены с контролем для определения наименьшей эффективной концентрации (LOEC) и следовательно неэффективной концентрации (NOEC).

Издание официальное

4 Информация по тестируемому веществу

4.1 Результаты теста на острую токсичность (см. Директиву 203 [8]), желательно проведенного с видами, выбранными для этого теста, должны быть доступны. Это подразумевает, что растворимость в воде и давление пара испытуемого вещества известны, и доступен надежный аналитический метод для определения количества вещества в экспериментальном растворе с установленными данными о точности и пределе обнаружения вещества.

4.2 Полезная информация включает структурную формулу, чистоту вещества, стабильность в воде и на свету, pK_a, P_{OW} и результаты теста на биоразлагаемость (см. Директиву 301 [8]).

5 Достоверность испытания

Применяются следующие критерии достоверности теста:

- смертность в контроле не должна превышать 10 % в конце теста;
- средний вес рыбы в контроле должен увеличиваться достаточно, чтобы установить минимальные изменения темпа роста, которые могут быть рассмотрены как существенные.

Межлабораторный круговой тест в странах ОЭСР [2] показал, что для радужной форели средний вес рыбы в контроле должен увеличиться, по крайней мере, на половину (то есть 50 %) от среднего начального веса за более чем 28 дней.

Пример — Начальный вес: 1 г/рыба (= 100 %), заключительный вес после 28 дней: ≥ 1,5 г/рыба (≥ 150 %);

- концентрация растворенного кислорода должна составлять, по крайней мере, 60 процентов от насыщающей концентрации кислородом в течение теста;
- температура воды не должна отличаться больше, чем на ±1 °С между экспериментальными аквариумами в любое время проведения теста и должна оставаться в пределах диапазона 2 °С и температуры, установленной для подопытных видов (приложение А).

6 Описание метода

6.1 Оборудование

Стандартное лабораторное оборудование, в частности следующее.

- кислородомер и pH-метр;
- оборудование для определения жесткости воды и щелочности;
- соответствующее устройство для контроля температуры, предпочтительно для непрерывного контроля;
- резервуары (аквариумы), сделанные из химически инертного материала и обеспечивающие необходимую плотность посадки. Рекомендуемая загрузка и плотность посадки (см. пункт 8.5 и приложение А);
- соответствующий баланс точности (т. е. точность ±0,5 %).

6.2 Вода

Любая вода, которая может обеспечить долгосрочное выживание и рост подопытного вида, может использоваться в качестве тестовой воды. Вода должна иметь постоянное качество во время теста. pH воды должно быть в пределах диапазона от 6,5 до 8,5, но во время данного теста pH должно оставаться в пределах диапазона ±0,5.

Рекомендуется жесткость выше 140 мг/л (по $CaCO_3$). Чтобы гарантировать, что разбавляющая вода не будет влиять на результаты испытания (например, образует комплексы с испытуемым веществом), необходимо отобрать пробы для аналитического исследования. Определяют содержание тяжелых металлов (например, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), основные анионы и катионы (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), пестициды (например, общие фосфорорганические и общие хлорорганические пестициды), общий органический углерод и взвешенные вещества. Исследования должны проводиться регулярно, например, ежемесячно, чтобы быть уверенным, что разбавляющая вода соответствует критериям качества. Если было продемонстрировано, что вода соответствует критериям качества в течение более одного года, частоту аналитических исследований можно уменьшить (например, один раз в шесть месяцев). Некоторые химические характеристики качества разбавляющей воды приведены в приложении Б.

6.3 Тестируемые растворы

Тестовые растворы выбранных концентраций готовятся разбавлением маточного раствора. Маточный раствор готовится простым смешением или растворением тестируемого вещества в разбавляющей воде с помощью механических средств. Колонки сатурации (колонки растворимости) могут использоваться для того, чтобы достигнуть необходимой концентрации маточного раствора. Использование растворителей или диспергаторов (повышающих растворимость веществ) может требоваться в некоторых случаях, чтобы получить необходимую концентрацию маточного раствора. Примеры подходящих растворителей — ацетон, этанол, метанол, диметилсульфоксид, диметилформамид и триэтиленгликоль. Примеры подходящих диспергаторов: метилцеллюлоза 0,01 % и HCO-40. Следует соблюдать осторожность при использовании легко разлагаемых веществ (например, ацетон) и/или веществ переменного состава, поскольку они могут вызвать проблемы с увеличением бактериального загрязнения в проточном эксперименте. Когда используется повышающий растворимость агент, он не должен оказывать никаких существенных эффектов на рост рыбы, а также видимого отрицательного воздействия на молодь по сравнению с контролем, содержащим только растворитель.

Для динамических (проточных) тестов система, которая непрерывно распределяет и растворяет маточный раствор тестируемого вещества (например, измерительный насос, пропорциональный разбавитель, система сатурации), обязана обеспечивать ряд концентраций в тестовые аквариумы. Расходы маточных растворов и разбавляющей воды должны проверяться во время теста с равными промежутками, предпочтительно ежедневно, и не должны меняться более чем на 10 % в течение теста. Межлабораторный тест [2] показал, что для радужной форели частота водообмена во время теста равная 6 л/г рыб/день является приемлемой (см. 8.2.2).

Для полустатического (с возобновлением) эксперимента проверяют частоту среднего возобновления, которая зависит от стабильности тестируемого вещества, но рекомендуется ежедневное водное обновление. Если предварительные тесты на стабильность (см. пункты 4.1 и 4.2) показали, что испытательная концентрация вещества не устойчива (то есть выходит за диапазон от 80 % до 120 % от номинала или падающий ниже 80 % средневзвешенной начальной концентрации) за период обновления, должно быть уделено внимание проведению проточного (динамического) теста.

6.4 Выбор видов

Радужная форель (Oncorhynchus mykiss) является рекомендуемым видом для этого теста, т. к. для этого вида было получено наибольшее количество данных в результате межлабораторного теста [1], [2]. Однако другие хорошо известные виды также могут использоваться, но процедуру проверки, вероятно, придется адаптировать, чтобы обеспечить необходимые испытательные условия. Например, доступны экспериментальные данные с данио (Danio rerio) [3], [4] и медакой (medaka, Oryzias latipes) [5], [6], [7]. В этом случае нужно дать объяснение выбора видов и экспериментального метода.

6.5 Содержание рыбы

Подопытная рыба должна быть отобрана из одной популяции, предпочтительно одного и того же помета, который содержался в течение по крайней мере двух недель до теста при условиях качества воды и освещения, используемых в тесте. Они должны питаться порциями минимум 2 % от массы тела в день, предпочтительно 4 % от массы тела в день в течение периода содержания и во время теста.

После 48-часового периода после запуска рыбы регистрируют смертность, используя следующие критерии:

- смертность более чем 10 % популяции через семь дней — бракуют всю партию;
- смертность между 5 % и 10 % популяции: дополнительная акклиматизация в течение семи дней; если смертность больше 5 % в течение вторых семи дней, бракуют всю партию;
- смертность менее 5 % популяции через семь дней — принимают всю партию.

Рыбы не должны получать лечение от болезней в две недели, предшествующие тесту, и во время теста.

7 Дизайн теста

7.1 Дизайн (план) теста касается выбора числа и интервала экспериментальных концентраций, числа резервуаров для каждой концентрации и числа рыб на резервуар. В идеале, дизайн теста должен быть применен по отношению к:

- цели исследования;

- методам статистического анализа, которые будут использоваться;
- доступности и стоимости экспериментальных ресурсов.

Заявленные цели, по возможности, должны определить статистические методы, чувствительные к определяемым критериям, которые предполагается обнаружить (например, к темпу роста) или, альтернативно, обеспечивающие точность, с которой ECx (например, Cx = 10, 20, или 30, и предпочтительно не меньше чем 10) должна быть оценена. Без этого не могут быть даны точные предписания объема исследования.

Важно признать, что дизайн, который оптимален (лучше всего использует ресурсы) для использования с одним методом статистического анализа не обязательно оптимален для другого. Рекомендуемый дизайн для оценки — LOEC/NOEC, поэтому не может быть таким же, как это рекомендовано для регрессионного анализа.

В большинстве случаев регрессионный анализ предпочтительней дисперсионного по причинам, обсужденным в [9]. Однако, если не найдено никакой подходящей модели регресса (r^2 < 0,9), должен использоваться NOEC/LOEC.

7.2 Дизайн для регрессионного анализа

7.2.1 Важные соображения в дизайне теста, который будет проанализирован регрессией:

- эффективная концентрация (например, $EC_{10,20,30}$) и уровни тестируемого вещества концентраций, которые вызывают представляющий интерес эффект, должны обязательно быть представлены концентрациями, включенными в тест. Точность, с которой могут быть сделаны оценки эффективной концентрации, будет лучше, когда эта концентрация будет находиться в середине диапазона проверенных концентраций. Предварительный тест по установлению подходящего диапазона может быть полезен при отборе соответствующих тестовых концентраций:
- чтобы провести удовлетворительное статистическое моделирование, тест должен включать, по крайней мере, один резервуар контроля и пять дополнительных резервуаров с различными концентрациями. Если используется агент, повышающий растворимость, дополнительно ставится один контроль, содержащий этот агент с самой высокой используемой концентрацией (см. пункты 8.3—8.4).

7.2.2 Следует использовать соответствующий геометрический или логарифмический ряд [10] (см. приложение В). Логарифмический интервал тестовых концентраций предпочтительней, если доступно больше шести резервуаров, дополнительные резервуары должны использоваться для репликаций или расширения диапазона концентраций, чтобы сузить уровни интервалов. Любая из этих мер одинаково желательна.

7.3 Дизайн для оценки NOEC/LOEC с использованием дисперсионного анализа (ANOVA)

Желательны дублирующие резервуары для каждой концентрации, и статистический анализ должен проводиться на уровне резервуара [11]. Без репликации аквариумов не может быть проведено никакого сравнения изменчивости между резервуарами и сравнение будет проводиться на уровне отдельной рыбы. Однако, практика показывает [12], что изменчивость между аквариумами обычно очень мала по сравнению с изменчивостью в пределах резервуара (то есть между рыбами). Поэтому относительно приемлемой альтернативой может быть выполнение статистического анализа на уровне отдельной рыбы.

Традиционно ставят, по крайней мере, пять тестовых концентраций, взятых в геометрической прогрессии с фактором, желательно не превышающим 3,2.

Вообще, когда тесты выполнены с резервуарами повтора, число репликаций резервуаров контроля и следовательно число рыбы должно удвоиться по сравнению с каждой тестируемой концентрацией, которые должны иметь равный размер [13], [14], [15]. В противоположность, при отсутствии репликаций количество рыбы в контрольной группе должно быть тем же самым, что и в каждой тестовой концентрации.

Если ANOVA основана на резервуарах, а не на отдельной рыбе (которая повлечет за собой необходимость или отдельной маркировки рыбы или использование псевдо специфичного темпа роста (см. пункт 8.3), существует потребность в достаточном количестве аквариумов репликации, чтобы позволить определить стандартное отклонение «резервуаров в пределах концентрации». Это означает, что степень свободы для ошибки в дисперсионном анализе должна быть, по крайней мере, 5 [11]. Если повторяется только контроль, есть опасность получения ошибочных результатов изменчивости, потому что она будет увеличиваться со средним значением темпа роста. Так как темп роста, вероятно, уменьшится с увеличением концентрации, это приведет к тенденции переоценки изменчивости.

8 Процедура

8.1 Выбор и взвешивание подопытной рыбы

Важно минимизировать изменчивость в весе рыбы в начале теста. Подходящие диапазоны размера для различных видов, рекомендуемых для использования в этом тесте, даны в приложении А. Для всей партии рыбы, используемой в тесте, диапазон в отдельных весах в начале теста в идеале должен находиться в пределах ±10 % веса среднего арифметического и, в любом случае, не должен превышать 25 %. Рекомендуется взвесить предварительный образец рыбы перед тестом, чтобы оценить средний вес.

Нужно прекратить кормить общую популяцию за 24 часа до начала теста. Рыба должна быть выбрана наугад. Используя обычное анастезирующее средство (например, водный раствор 100 мг/л трикаинметансульфонат (MS 222), нейтрализованный добавлением двух частей бикарбоната натрия на часть MS 222), рыба должна быть взвешена индивидуально для определения живого веса (грязного сухого) с точностью, данной в приложении А. Рыбы с весами в пределах намеченного диапазона должны быть отсажены, а затем беспорядочно распределены между тестовыми аквариумами. Полный живой вес рыбы в каждом тестовом аквариуме должен быть зарегистрирован. Использование анестезии, также как и перемещение рыбы (включая промакивание салфеткой и взвешивание), может вызвать стресс и раны у мальков, в особенности для видов небольшого размера. Поэтому обработка мальков должна быть сделана с предельной осторожностью, чтобы избежать повреждения и ранения подопытных животных.

Рыб взвешивают снова на 28 день теста (см. 8.6). Однако, если это необходимо, чтобы повторно рассчитать порцию корма, рыба может быть взвешена на 14 день теста (см. 8.2.3). Также может использоваться фотографический метод для определения изменения в размере рыбы, с помощью которого можно рассчитать порцию корма.

8.2 Условия проведения испытания

8.2.1 Продолжительность

Продолжительность испытания более или равна 28 дням.

8.2.2 Уровень загрузки и плотность посадки

Важно, чтобы уровень загрузки и плотность посадки соответствовал используемым подопытным видам (см. приложение А). Если плотность посадки слишком высока, это вызывает стресс переселенности, что приводит к уменьшению темпа роста и возможно к болезни. Если загрузка слишком низкая, это может вызвать территориальное поведение, которое также может затронуть рост. В любом случае, уровень загрузки должен быть достаточно низким, чтобы концентрация растворенного кислорода составляла, по крайней мере, 60 % от насыщения и могла бы быть поддержана без аэрации. Межлабораторный тест [2] показал, что для радужной форели уровень загрузки 16 особей от 3 до 5 г в 40-литровом объеме является приемлемым. Рекомендуемая частота обновления воды во время теста составляет 6 литров/г рыб/день.

8.2.3 Кормление

Рыба должна питаться полноценным кормом (приложение А) в достаточных количествах, чтобы обеспечить приемлемый темп роста. Необходимо проявлять осторожность, чтобы избежать микробного роста и мутности воды. Для радужной форели этим условиям удовлетворяет уровень 4 % массы тела в день [2], [16], [17], [18]. Ежедневная порция может быть разделена на две равных части и дана рыбе в два приема в день, разделенных, по крайней мере, 5 часами. Порция рассчитывается исходя из начального живого веса рыбы, для каждого тестового аквариума. Если рыбы снова взвешиваются на 14 день, порцию рассчитывают повторно. Нужно отказать рыбам в еде за 24 часа до взвешивания.

Несъеденная еда и фекалии должны удаляться из аквариумов каждый день тщательной очисткой дна каждого аквариума с помощью всасывания.

8.2.4 Свет и температура

Световой период и температура воды должны соответствовать подопытным видам (см. приложение А).

8.3 Тестовые концентрации

Обычно требуется пять концентраций тестируемого вещества, независимо от испытательного дизайна (см. 7.3). Предварительные данные о токсичности вещества (например, результаты острого теста

и/или предварительного исследования) должны помочь при отборе соответствующих тестовых концентраций. Если используется меньше пяти концентраций, должно быть дано объяснение. Самая высокая тестовая концентрация не должна превышать предел растворимости вещества в воде.

Если используется агент, повышающий растворимость, его заключительная концентрация не должна быть больше 0,1 мл/л и по возможности должна быть одинаковой во всех тестовых аквариумах. Однако следует избегать использования таких веществ.

8.4 Контроль

Число контрольных образцов зависит от дизайна теста (см. раздел 7). Если используется повышающий растворимость агент, дополнительно ставится такое же число контролей агентом растворения.

8.5 Частота аналитических исследований и измерений

В течение теста концентрацию испытательного вещества определяют через равные интервалы.

В проточном эксперименте расходы разбавляющей воды и вызывающего отравление маточного раствора необходимо проверять по возможности еженедельно, концентрация не должна меняться больше, чем на 10 % в течение теста. Тестируемые концентрации вещества, как ожидают, будут в пределах ±20 % от номинальной (т. е. в пределах диапазона от 80 % до 120 % (см. 7.2—7.6). Рекомендуется анализировать, как минимум, самые высокие и самые низкие концентрации в начале теста и через недельные интервалы после этого. Если ожидают, что концентрация испытательного вещества не останется в пределах ±20 % от номинала (на основе данных о стабильности испытательного вещества), необходимо проанализировать все испытательные концентрации в том же самом режиме.

В полустатическом (с обновлением) тесте проверяют, если ожидают, что концентрация испытательного вещества останется в пределах ±20 % от номинала, рекомендуется анализировать самые высокие и самые низкие тестируемые концентрации сразу после приготовления и непосредственно перед обновлением в начале исследования и еженедельно после этого. Для тестов, где концентрация испытательного вещества, как ожидают, не остается в пределах ±20 % номинала, все испытательные концентрации должны быть проанализированы после сверх того же самого режима, что и более устойчивые вещества.

Рекомендуется, чтобы результаты основывались на взвешенных концентрациях. Однако, если доступны доказательства, что концентрация тестируемого вещества в растворе удовлетворительно поддерживается в пределах ±20 % от номинала или было проведено измерение начальной концентрации, тогда результаты могут быть основаны на номинале или измеренных величинах.

Образцы, по возможности, должны быть отфильтрованы или отцентрифугированы. Центрифугирование — рекомендуемая процедура. Однако, если испытательный материал не адсорбируется фильтрами, фильтрация также может быть приемлема.

Во время теста растворенный кислород, pH фактор и температура должны быть измерены во всех испытательных судах. Полная жесткость, щелочность и соленость (если применимо) должны быть измерены в контроле и одном аквариуме с самой высокой концентрацией. Растворенный кислород и соленость (если применимо) должны быть измерены, как минимум, три раза — в начале, в середине и в конце теста. В полустатических тестах рекомендуется измерять растворенный кислород более часто, желательно перед и после каждого обновления или, по крайней мере, один раз в неделю. pH фактор должен быть измерен в начале и в конце каждого обновления в статическом тесте и, по крайней мере, еженедельно в динамическом тесте. Жесткость и щелочность должны быть измерены один раз в течение теста. Температура должна контролироваться непрерывно, по крайней мере, в одном тестовом аквариуме.

8.6 Наблюдения

Вес: в конце теста вся выживающая рыба должна быть взвешена живым весом или в группах по тестовым аквариумам, или индивидуально. Взвешивание животных тестовыми аквариумами предпочтительней, чем индивидуальное взвешивание, которое требует индивидуальной маркировки рыб. В случае измерения отдельных весов, отдельных особей выбранная техника маркировки должна избегать травмирования животных (может быть использована альтернатива холодовой маркировке, например, с помощью тонких цветных лесок).

Рыба во время испытательного периода должна ежедневно осматриваться на наличие любых внешних отклонений (таких как кровоизлияние, обесцвечивание), и атипичное поведение. Все смер-

тельные случаи должны быть зарегистрированы, мертвая рыба должна удаляться как можно скорее. Мертвых рыб не заменяют, уровень загрузки и плотность посадки являются достаточными, чтобы избежать воздействия на рост через изменения в числе рыбы на аквариум. Однако, количество корма должно быть адаптировано.

9 Данные и отчет

9.1 Обработка результатов

Рекомендуется, чтобы статистика использовалась и в дизайне, и в анализе теста, т. к. настоящий стандарт допускает значительные изменения в проведении эксперимента в том, что касается числа тестовых аквариумов, тестируемых концентраций, количества рыбы и т. д. Ввиду наличия вариантов, здесь не приводится специальное руководство по статистическому анализу.

Темпы роста не должны вычисляться для тестовых аквариумов, если смертность превышает 10 %. Однако, смертность должна быть установлена для всех тестируемых концентраций.

Вне зависимости от того, какой метод используется для анализа данных, центральное понятие — специфичный темп роста r между временем t_1 и временем t_2. Он может быть определен несколькими способами в зависимости от того, маркировались ли рыбы индивидуально или использовалось среднее число на аквариум, по формулам 1, 2, 3.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \cdot 100, \quad (1)$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e W_2} - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \cdot 100, \quad (2)$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \cdot 100, \quad (3)$$

где r_1 — специфический темп роста индивидуальной рыбы;

r_2 — средний специфический темп роста на аквариум;

r_3 — псевдоспецифический темп роста;

W_1, W_2 — вес отдельной рыбы во время t_1 и t_2, соответственно;

$\log W_1$ — логарифм веса отдельной рыбы в начале периода исследования;

$\log W_2$ — логарифм веса отдельной рыбы в конце периода исследования;

$\overline{\log_e W_1}$ — среднее число логарифмов значений W_1 для рыбы в аквариуме в начале периода исследования;

$\overline{\log_e W_2}$ — среднее число логарифмов значений W_2 для рыбы в резервуаре в конце периода исследования;

t_1, t_2 — время (дни) в начале и конце периода исследования;

r_1, r_2, r_3 вычисляют для периода от 0 до 28 дней и, если применимо (то есть когда измерение было сделано в 14 день) для 0 — 14 и 14 — периоды 28 дней.

9.2 Анализ результатов регрессией (моделирование концентрация—ответ)

Этот метод анализа устанавливает соответствующую математическую связь между удельным темпом роста и концентрацией, и следовательно позволяет оценить ECx, т. е. все необходимые значения EC. Нет необходимости использовать этот метод вычисления r для отдельной рыбы (r_1), вместо этого, анализ может быть основан на среднем значении для резервуара r (r_2). Этот последний метод предпочтителен. Он является также более пригодным в случае использования самых мелких видов.

Определенные средние темпы роста для резервуара (r_2) должны быть построены графически в связи с концентрацией для построения отношения концентрация—ответ.

Для того, чтобы выразить отношения между r_2 и концентрацией, должна быть выбрана соответствующая модель и этот выбор должен быть поддержан соответствующим рассуждением.

Если количество рыбы, выжившей в каждом аквариуме, неодинаково, то процесс подгонки модели простой или нелинейной должен быть взвешенным, чтобы учесть неравные размеры групп.

Метод подгонки модели должен позволить оценить, например, EC_{20} и дисперсию (или стандартное отклонение или доверительный интервал). График модели должен быть так подогнан к данным, чтобы можно было увидеть адекватность построенной модели [9], [19], [20], [21].

9.3 Анализ результатов для оценки LOEC

Если тест включает повторность аквариумов для всех уровней концентраций, оценка LOEC может быть основана на дисперсионном анализе (ANOVA) средней удельной скорости роста аквариума (см. пункт 8.1), а затем с помощью подходящего метода (например, тестов Даннета или Уильямся ([13], [14], [15], [22]) сравнения средней *r* для каждой концентрации со средней *r* контроля, чтобы определить самую низкую концентрацию, для которой это различие имеет значимое значение при 0,05 уровне вероятности. Если не выполняются требуемые предположения параметрического метода — непараметрическое распределение (например, тест Шапиро-Вилка) или гетерогенная дисперсия (тест Бартлетта), следует учитывать для преобразования данных однородной массы отклонений перед проведением дисперсионного анализа или выполнение взвешенных ANOVA.

Если тест не включает повторность аквариумов для всех уровней концентраций, выполнение ANOVA, основанной на средних темпах прироста для аквариума, нечувствительно или невозможно. В этой ситуации компромисс заключается в основывании ANOVA на псевдо специфичном темпе роста r_3 для индивидуальной рыбы.

Средний r_3 для каждой тестируемой концентрации может быть сравнена со средним r_3 для контроля. LOEC может быть определен как приведено выше. Следует признать, что этот метод не учитывает изменчивость между аквариумами за счет изменчивости между отдельными рыбами. Однако, как показывает практика [9], эта межаквариумная изменчивость гораздо меньше изменчивости внутри аквариума (т.е. между рыбами). Если индивидуальные особи не были включены в анализ, метод изолированной идентификации и его обоснование должны быть приведены.

9.4 Интерпретация результатов

Результаты должны интерпретироваться с осторожностью, если измеренные токсичные концентрации в тесте находятся на уровнях около предела обнаружения аналитического метода или, в полустатических тестах, когда концентрация тестируемого вещества снижается в период между недавно приготовленным раствором и перед обновлением.

9.5 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать в себя следующую информацию.

Тестируемое вещество:

- физическая природа и соответствующие физическо-химические свойства;
- данные о химической идентификации, включая чистоту и аналитический метод определения количества тестируемого вещества, если применимо.

Подопытные виды:

- научное название, порода, размер, поставщик, любые предварительные манипуляции и т. д.

Условия тестирования:

- используемая процедура тестирования (например, полустатическая/с обновлением, проточная (динамическая), загрузка, плотность посадки и т. д.);
- дизайн теста (например, число тестовых аквариумов, тестируемые концентрации и повторности, число рыб на аквариум);
- метод приготовления маточного раствора и частота обновления (повышающий растворимость агент и его концентрация должна быть приведена, если используется);
- номинальные испытательные концентрации, средства измерения и их стандартные отклонения в тестовых емкостях и методы, которыми они были достигнуты, и доказательства, что измерения относятся к концентрациям тестируемого вещества в истинном растворе;
- особенности разбавляющей воды: pH, жесткость, щелочность, температура, концентрация растворенного кислорода, остаточные количества хлора (если измерялся), общий органический углерод, взвешенные вещества, соленость тестовой среды (если измерялась) и любые другие сделанные измерения,
- качество воды в пределах тестовых аквариумов: pH, жесткость, температура и концентрация растворенного кислорода;

- подробная информация о кормлении (например, тип корма(ов), источник, данное количество и частота).

Результаты:

- доказательства, что контроль соответствовал критерию достоверности по выживаемости и данным по смертности в любой из тестируемых концентраций;
- используемые методы статистического анализа, статистика, основанная на репликации или рыбе, обработка данных и объяснение используемых методов;
- сведенные в таблицу данные по особям и средним весам рыбы в дни 0, 14 (если измерялось) и 28 — среднеаквариумные или псевдо специфические темпы роста (если применимо) в течение периодов от 0 до 28 или, возможно, от 0 до 14 и от 14 до 28;
- результаты статистического анализа (то есть регрессионный анализ или ANOVA) предпочтительно в табличной и графической форме, LOEC ($p = 0,05$) и NOEC или ECx с возможными стандартными ошибками, если применимо;
- частота любых необычных реакций рыбы и видимые эффекты, вызываемые тестируемым веществом.

Приложение А
(справочное)

Виды рыб для тестирования и соответствующие условия тестирования

Таблица А.1

Вид	Рекомендуемые границы температур, °С	Фотопериод, час	Рекомендуемые границы начальных весов, г	Рекомендуемая точность измерений	Плотность посадки, г/л	Плотность загрузки на 1 л	Корм	Длительность теста
Рекомендуемые виды								
Радужная форель Oncorhynchus mykiss	12,5—16,0	12—16	1—5	около 100 мг	1,2—2,0	4	Сухой корм для лососевых	≥28
Другие хорошо описанные виды								
Данио Danio rerio	21—25	12—16	0,050—0,100	около 1 мг	0,2—1,0	5—10	Живой корм (*Brachionus, Artemia*)	≥28
Медака Oryzias latipes	21—25	12—16	0,050—0,100	около 1 мг	0,2—1,0	5—10	Живой корм (*Brachionus, Artemia*)	≥28

Приложение В
(рекомендуемое)

Некоторые химические характеристики разбавляющей воды

Таблица В.1

Вещество	Концентрация
Взвешенные частицы	< 20 мг/л
Общий органический углерод	< 2 мг/л
Неионизированный аммоний	< 1 мкг/л
Остаточный хлор	< 10 мкг/л
Общие фосфорорганические пестициды	< 50 нг/л
Общие хлорорганические пестициды + полихлорированные бифенилы	< 50 нг/л
Общий органический хлор	< 25 нг/л

Приложение С
(справочное)

Ряд логарифмических концентраций, подходящих для испытания на токсичность

Таблица С.1

Колонка (число концентраций между 100 и 10 или между 10 и 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
32,0	46,0	56,0	63,0	68,0	72,0	75,0
10,0	22,0	32,0	40,0	46,0	52,0	56,0
3,2	10,0	18,0	25,0	32,0	37,0	42,0
1,0	4,6	10,0	16,0	22,0	27,0	32,0
	2,2	5,6	10,0	15,0	19,0	24,0
	1,0	3,2	6,3	10,0	14,0	18,0
		1,8	4,0	6,8	10,0	13,0
		1,0	2,5	4,6	7,2	10,0
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Серия из пяти (или более) последовательных концентраций, которые могут быть выбраны из колонки. Средние точки между концентрациями в колонке (x) находятся в колонке (2x + 1). Приведенные значения представлены концентрациями, выраженными в процентах на единицу объема или веса (мг/л или мкг/л). Значения можно умножить или разделить на любую величину, кратную 10 соответственно. Колонка 1 может быть использована, если существует значительная неопределенность в отношении уровня токсичности.

Библиография

[1] Solbe J.F de L G (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Rest of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

[2] Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

[3] Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855—1870.

[4] Nagel R., Bresch H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N., and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloraniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 157—164.

[5] Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokyo, Japan.

[6] Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp 287—297.

[7] Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91—063. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

[8] OECD (1993). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris.

[9] Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328—338.

[10] Environment Canada. (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

[11] Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

[12] Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10—12 December 1991.

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

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

[15] Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103—117.

[16] Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville, N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured foods to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, 123—133.

[17] Quinton, J.C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, 33—41

[18] Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc., Neptune City, New Jersey, USA. 288 p.

[19] Bruce, R.D.and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485—1494.

[20] DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test: intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

[21] Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988. 12 pp.

[22] Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510—531.

[23] Environment Canada. (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or Atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на окружающую среду, окружающая среда, токсичность, рыбы

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 05.04.2019. Подписано в печать 11.06.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,48.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru