МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33036— 2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение острой токсичности для дождевых червей

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 20 октября 2014 . № 71-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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1695-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33036—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test No. 207:1984 «Определение острой токсичности для дождевых червей» («Earthworm, Acute Toxicity Tests, 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, 2015, 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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение острой токсичности для дождевых червей

Test methods for chemicals of environmental hazard. Acute toxicity tests for earthworms

Дата введения — 2015—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения острой токсичности химических веществ для дождевых червей.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

2.1 **медианное значение летальной концентрации (LC_{50}):** Концентрация химического вещества в пищевом рационе, которая приводит к 50 %-ной гибели тестируемых животных.

Примечание — Для контактного теста концентрацию вещества выражают в миллиграммах на квадратный сантиметр, для теста с искусственной почвой — в миллиграммах на килограмм (сухой массы почвы).

3 Принцип теста

Скриннинговый тест (контактный тест с фильтровальной бумагой) включает воздействие на червей тестируемого вещества, нанесенного на влажную фильтровальную бумагу, и позволяет идентифицировать вещества, потенциально токсичные для дождевых червей.

Тест с искусственной почвой включает экспозицию дождевых червей в специально приготовленной искусственной почве, содержащей тестируемое вещество в определенном диапазоне концентраций. Гибель дождевых червей оценивается на 7-й и 14-й день после применения тестируемого вещества.

В серии тестируемых концентраций вещества одна концентрация не должна вызывать гибели, а еще одна — должна приводить к гибели всех червей.

4 Информация о тестируемом веществе

Должна быть известна следующая информация о тестируемом веществе:

- растворимость в воде;
- давление паров;
- структурная формула;
- чистота;
- стабильность в воде, почве и на свету;
- коэффициент распределения н-октанол/вода;
- результаты теста на способность к биоразложению.

Издание официальное

5 Вещество сравнения

Вещество сравнения в тесте для определения LC_{50} должно выбираться по собственному усмотрению и гарантировать, что лабораторные условия, в которых проводят опыты, соответствуют требованиям и не подвержены существенным временным изменениям. Оптимальным веществом сравнения, удовлетворяющим этим условиям, является хлорацетамид.

6 Достоверность теста

Тест считается достоверным, если гибель червей в контроле не превышает 10 % к концу испытания.

7 Описание теста

7.1 Оборудование и материалы

Обычное лабораторное оборудование и специальные принадлежности:

- культура дождевых червей (см. 7.2);
- фильтровальная бумага среднего качества толщиной примерно 0,2 мм и плотностью от 80 до 85 г/м^2;
- искусственный почвенный субстрат, приготовленный следующим образом:

10 % сфагнового сухого и тонко растертого торфа (pH 5,5—6,0; без видимых растительных остатков);

20 % каолиновой глины (с содержанием каолина около 30 %);

70 % промышленного песка (предпочтителен мелкий песок с преобладанием частиц размером от 50 до 200 микрон — более 50 %).

pH в искусственном субстрате регулируют в пределах 6,0 ± 0,5 карбонатом кальция [1]. Сухие составные части тщательно смешивают в строго установленных пропорциях, каждый раз взвешивая общую массу. Влажность смеси определяют при высушивании небольшого количества образца при температуре 105 °С. Деионизированную воду добавляют к полученной смеси до влажности примерно 35 % сухой массы таким образом, чтобы при сжатии субстрата в руке не выделялась вода. Для некоторых видов торфа приемлемым будет и более высокое содержание влаги.

Сосуды, используемые в тесте, должны быть стеклянными вместимостью около 1 л и должны быть покрыты стеклянными крышками или перфорированной пленкой.

Освещение лабораторной комнаты или камеры должно контролироваться в пределах от 400 до 800 Люкс, температура — (20 ± 2) °С.

7.2 Экспериментальные животные

Рекомендуемый вид дождевых червей для теста — *Eisenia foetida* (Michaelsen). Этот вид не совсем типичен для традиционных типов почв и обычно обитает в почвах, богатых органическим веществом. Он чувствителен к химическим веществам, имеет короткий жизненный цикл — черви выводятся из коконов за 3—4 недели и достигают половой зрелости за 7—8 недель при температуре окружающей среды 20 °С. Вид очень плодовитый, взрослый червь производит от 2 до 5 коконов в неделю, из которых выводятся другие черви. Коконы можно приобрести или разводить, разделив популяцию на части (см. приложение А).

Eisenia foetida существует в виде двух рас червей, морфологически сходных между собой [2]. Но одна раса — *E. foetida foetida* имеет типичные поперечные полоски на сегментах, а другая — *E. foetida andrei* не имеет таковых и более красного цвета. В тесте используют *E. foetida foetida,* однако возможно использование и другой расы.

Для опытов берут взрослых червей (в возрасте от двух месяцев) и живой массой от 300 до 600 мг.

7.3 Выполнение теста

7.3.1 Тест с фильтровальной бумагой

Рекомендуются плоскодонные стеклянные колбы с плоским дном или другие стеклянные сосуды, высотой 8 см и диаметром 3 см с плоским дном, стенки которых покрывают фильтровальной бумагой, нарезанной таким образом, чтобы ее края частично перекрывали друг друга.

Тестируемое вещество известной концентрации растворяют в дистиллированной воде (если растворимость вещества не менее 1000 мг/л) или в наиболее подходящем органическом растворителе (ацетоне, хлороформе, гексане). 1 мл раствора капают пипеткой в колбу и испаряют растворитель (операция может быть повторена для достижения требуемого количества осадка вещества). Контрольный сосуд должен быть аналогично обработан 1 мл дистиллированной воды или используемого органического растворителя. После высушивания 1 мл дистиллированной воды переносят в другой сосуд для смачивания бумаги, который накрывают стеклянным колпаком или полимерной пленкой с небольшим отверстием.

Предварительный тест предшествует более точному скриннинговому тесту. Он может быть следующим:

Количество тестируемого вещества на фильтровальной бумаге	Концентрация раствора тестируемого вещества
1,0 мг/см^2	$7 \cdot 10^{-2}$ г/мл
0,1 мг/см^2	$7 \cdot 10^{-3}$ г/мл
0,01 мг/см^2	$7 \cdot 10^{-4} \cdot$ г/мл
0,001 мг/см^2	$7 \cdot 10^{-5}$ г/мл
0,0001 мг/см^2	$7 \cdot 10^{-6}$ г/мл

Для основного скриннингового теста необходимо использовать пять и более уровней геометрического ряда концентраций. Для каждой концентраций — 10 повторностей, помещая одного червя в сосуд. Более одного червя помещать не рекомендуется, т. к. гибель одного червя может оказать неблагоприятное воздействие на других, находящихся с ним в сосуде. Точность полученных при тестировании данных может быть увеличена доведением количества повторностей до 20. Дождевые черви перед использованием их в тесте должны содержаться в течение 3 часов на влажной фильтровальной бумаге, чтобы удалить содержимое их кишечника. Затем их промывают и слегка подсушивают. Во время теста сосуды должны находиться в горизонтальном положении на каком-либо подносе. Температуру во время теста поддерживают в пределах (20 ± 2) °С. Первые 48 ч сосуды держат в затемненном месте, а по прошествии 72 ч оценивают гибель червей. Червь считается погибшим, если он не реагирует на легкие механические раздражения, производимые по направлению от головы к хвосту.

7.3.2 Тест с искусственной почвой

Желателен предварительный тест, который определяет диапазон концентраций вещества и включает следующий ряд концентраций: 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100; 1000 мг/кг (тестируемого вещества в сухой искусственной почвенной смеси). Для основного теста необходимо использовать пять концентраций геометрического ранжированного ряда.

Тест с искусственной почвой и тестируемым веществом необходимо проводить следующим образом: непосредственно перед тестированием эмульсию или дисперсию химиката в дистиллированной воде смешивают с искусственным субстратом или равномерно разбрызгивают по его поверхности. Если тестируемое вещество нерастворимо в воде, оно может быть растворено в подходящем органическом растворителе (ацетоне, гексане или хлороформе), после чего растворителю дают возможность испариться. Если вещество не растворяется, его дисперсию или эмульсию в количестве, соответствующем 750 г искусственной почвы (влажной массы), смешивают с 10 г мелкого кварцевого песка, после чего полученную смесь прибавляют к 740 г влажного искусственного субстрата. Так готовят смесь для каждого тестируемого сосуда. В качестве растворителей химических веществ могут использоваться только сильно летучие вещества. Перед тестированием растворитель должен испариться. Количество испарившейся воды из искусственной смеси должно быть адекватно восполнено.

В каждый сосуд добавляют 750 г влажной искусственной почвы и тестируемое вещество, после чего на поверхность помещают 10 промытых дождевых червей, которые адаптируются в течение 24 ч в искусственном субстрате (без тестируемого вещества). Сосуды накрывают пластиковой пленкой для предотвращения пересыхания содержимого и выдерживают 14 дней.

Рекомендуются четыре повторности для каждой тестируемой концентрации химического вещества. В каждом тесте используют четыре контрольных сосуда, причем искусственный субстрат обрабатывают растворителем, используемым для тестируемых сосудов. Продолжительность теста — 14 дней (определение гибели проводят на 7-й и 14-й дни). Температура проведения теста (20 ± 2) °С. Необхо-

димо контролировать червей в тестируемой смеси в течение всего теста. Гибель подопытных червей определяют, высыпая содержимое сосуда на стеклянную плоскую пластину (поднос), затем проводят выборку червей из субстрата и определяют их состояние по реакции на механические раздражения, производимые от головы к хвосту. После оценки гибели в срок 7 дней червей и смесь искусственной почвы с химикатом помещают в контейнер. Данные о червях с какими-либо патологиями (в том числе поведенческими) фиксируют и отмечают в отчете. В конце теста необходимо оценить влажность субстрата.

8 Данные и отчет о проведении теста

8.1 Обработка результатов

Данные зависимости гибели от концентрации тестируемого вещества отражают в виде графика, по которому определяют медиану летальной концентрации (LC_{50}) и ее доверительные интервалы [3]. Приемлемы также другие методы пробит-анализа. Если при двух последовательных концентрациях тестируемого вещества гибель составляет 0 % и 100 % гибели, эти два значения концентрации являются достаточными, чтобы определить диапазон, в котором находится LC_{50}.

8.2 Отчет о проведении теста

Отчет о тесте должен включать в себя следующую информацию:

- тестируемое вещество: химическая формула, способ применения;
- тестируемые черви: возраст, условия содержания и кормления, источник приобретения;
- условия теста: описание, детали отклонения от рекомендуемых условий и материалов;
- информация о растворителе, примененном в тесте.

Результаты теста:

- средняя живая масса — число живых червей до начала и в конце теста;
- описание явных физических или поведенческих патологических изменений у тестируемых животных;
- метод определения LC_{50} с ссылкой на все использованные и полученные данные теста;
- графическое отражение зависимости эффекта от концентрации;
- гибель червей в контроле;
- гибель для вещества сравнения и тестируемого вещества;
- влажность и pH искусственной почвы перед началом и в конце теста;
- наивысшая концентрация, не вызвавшая гибели;
- самая низкая концентрация, вызвавшая 100 %-ную гибель.

Приложение А
(обязательное)

Кормление и разведение тестовых организмов

Eisenia foetida может выращиваться с использованием различных видов отходов животного происхождения. Рекомендуется выращивать их в смеси конского или коровьего навоза и торфа, смешанных в пропорции 50 : 50; возможно также использование навоза других животных. Водный экстракт смеси должен иметь pH около 7,0, обладать низкой электропроводностью (менее 6,0 миллисименс) и не быть чрезмерно загрязненным аммиаком или мочой. Для крупномасштабного содержания червей идеальны деревянные ящики размером 50 × 50 × 15 см с плотно подогнанными крышками, в которых возможно получение более чем 1000 червей за шесть недель. Для производства достаточного количества червей на 20 кг навоза вносят 1 кг червей. В таких условиях черви достигают живой массы более 1 г каждый. Применяют червей выровненных по возрасту и массе, лучше произведенных из коконов, которые выбирают из емкости с половозрелыми червями в течение 3—4 недель. После выведения из коконов черви созревают 7—8 недель при температуре 20 °С и могут использоваться в опыте.

Библиография

[1] M. B. Bouche, Lombriciens de France, Ecologie et Svstematique. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique (1972)

[2] C. A. Edwards and J. R. Lofty, Biology of Earthworms. 2nd Edition, Chapman and Hall, London (1977)

[3] J. T. Litchfield and F. Wilcoxon, Journal of Pharmacol. Exper. Ther. 96. 99—113 (1949)

[4] C. E. Stephan, in Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. L. Mayer and J. L. Hamelink) pp. 66—84, ASTM STR 634, American Society for Testing and materials (1977)

[5] C. A. Edwards, Development of a Standardized Laboratory Method for Assessing the Toxicity of Chemical Substances to Earthworms, Report EUR 8714EN, Commission of the European Communities (1983)

[6] The Analysis of Agricultural Materials, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book 427, HMSO, London (1981)

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50 IDT

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, оценка острой токсичности, дождевые черви

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 02.04.2019. Подписано в печать 21.05.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,70.
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.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru