МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32628— 2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение острой токсичности на Chironomus sp.

(OECD, Test № 235:2011, IDT)

Издание официальное

**Москва
Стандартинформ
2015**

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила, 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»); Техническим комитетом по стандартизации № 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ» Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии на основе собственного аутентичного перевода на русский язык руководящего документа, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 мая 2014 г. № 67-П)

За принятие стандарта 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
Туркменистан	TM	Туркменстандартлары
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Департамент технического регулирования Минэкономторг

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 235:2011 Chironomus sp. Acute Immobilisation Test (ОЭСР Тест № 235: 2011 «Определение острой токсичности для Chironomus sp.»).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 сентября 2014 № 1234-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32628—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2015 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, 2015

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

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 острой токсичности на Chironomus sp.

Testing of chemicals of environmental hazard
Chironomus sp. Acute Immobilisation Test

Дата введения – 2015–06–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод по определению острой токсичности химических веществ для хирономид (*Chironomus sp.*).

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применимы термины со следующими определениями:

2.1 **полуэффективная концентрация (EC_{50} – The concentration estimated):** Концентрация исследуемого вещества, которая приводит к угнетению подвижности (иммобилизации) 50% личинок хирономид в течение установленного периода воздействия.

2.2 **иммобилизация (угнетение подвижности) (Immobilisation):** личинки хирономид, неспособные изменять свое положение (ползком или за счет плавательных движений) в течение 15 секунд после воздействия механического раздражителя, например воздействия струи воды из пипетки Пастера или встряхивания тестового сосуда, считаются неподвижными (иммобилизованными). Личинки движутся хаотично, и фазы высокой активности (например плавания за счет быстрого изменения формы тела в альфа-форму при максимальном сжатии и обратно) сменяются фазами полного отсутствия движения. Личинки, не обнаруженные в тестируемом растворе, считаются иммобилизованными.

3 Принцип теста

Личинок *Chironomus sp.* первого возраста подвергают воздействию исследуемого вещества в определенном диапазоне концентраций в воде в течение 48 ч. Иммобилизация регистрируется на 24-ый и 48-ой ч. EC_{50} рассчитывается на 24-ый и 48-ой ч (если существуют необходимые данные).

4 Информация об исследуемом веществе

4.1 Должны быть известны растворимость в воде и давление паров исследуемого вещества. Для аналитического определения исследуемого вещества в тестируемом растворе необходимо использовать достоверный аналитический метод с известной воспроизводимостью и пределом обнаружения.

4.2 Полезной также может быть информация о:

- структурной формуле исследуемого вещества;
- чистоте;
- стабильности в воде и на свету;
- коэффициенте распределения октанол / вода, *Kow*;
- результатах теста на способность к биоразложению.

Описание физического состояния исследуемого вещества должно быть представлено в отчете о проведении теста.

Издание официальное

5 Стандартные вещества

5.1 В целях подтверждения надежности и достоверности тестовой системы и условий проведения теста необходимо регулярно тестировать стандартные вещества. В качестве стандартных веществ рекомендуется использовать химические вещества, проверенные в межлабораторных и валидационных тестах. Межлабораторные тесты проводились с 3,5-дихлорфенолом и хлоридом калия (приложение А). Также в качестве стандартных веществ в тесте на острую токсичность для *Chironomus sp.* можно использовать линдан, пентахлорфенол и хлорида кадмия.

5.2 Тестирование стандартных веществ проводится по мере необходимости, например после введения новых организмов в тестовую культуру или после значительных изменений условий культивирования. Тем не менее, в течение года необходимо проводить, как минимум, два тестирования со стандартными веществами.

6 Достоверность теста

Тест считается достоверным, если выполняются следующие критерии эффективности:

- в контрольной пробе, в том числе контрольной пробе с растворителем, иммобилизация или другие признаки недомогания или стресса должны наблюдаться не более чем для 15% личинок (например аномальное или нестандартное поведение такое, как нахождение на поверхности воды) в конце теста;

- концентрация растворенного кислорода в конце теста должна составлять ≥ 3 мг/л в контрольном и тестовых сосудах.

7 Описание теста

7.1 Оборудование

7.1.1 Тестовые сосуды и другое оборудование, контактирующее с тестируемым раствором, должны быть полностью изготовлены из стекла или других химически инертных материалов. Для тестирования можно использовать чашки Петри вместимостью 50 мл (высота 3 см, внутренний диаметр 4,7 см) или стаканы вместимостью 100 мл (высота 7 см, внутренний диаметр 4,5 см), которые должны быть очищены стандартными лабораторными методами перед каждым использованием. Тестовые сосуды должны быть негерметично закрыты (например стеклянной крышкой, часовым стеклом или паропленкой) для уменьшения потерь воды вследствие испарения и предотвращения попадания пыли в тестируемые растворы.

7.1.2 При тестировании также может использоваться следующее лабораторное оборудование:

- оксиметр (оборудованный микроэлектродом или другим подходящим устройством для измерения содержания растворенного кислорода в пробах малого объема);

- pH-метр;

- оборудование для определения жесткости воды;

- оборудование для контроля температуры.

Если для приготовления тестируемых растворов используется вода из поверхностных или подземных источников, также необходимо оборудование для определения содержания общего органического углерода (ООУ) и (или) химического потребления кислорода (ХПК).

7.2 Тестовые виды

7.2.1 При тестировании используются личинки *Chironomus riparius* первого возраста, поскольку данная личиночная стадия наиболее чувствительна. Кроме того, личинки данного возраста свободно плавают и, следовательно, не испытывают стресса при отсутствии донных отложений. *C. riparius* является наиболее предпочтительным видом, также могут использоваться виды *C. dilutus* или *C. yoshimatsui*. Процедура культивирования *C. riparius* описана в приложении В. Тестовые организмы должны быть получены из надежного источника (желательно лабораторной культуры).

7.2.2 Личинки должны быть получены от здоровой популяции (не демонстрирующей признаков стресса таких, как высокая смертность, обесцвечивание и т.д.) с известной историей (метод выращивания, условия культивирования). Все организмы, используемые для отдельного тестирования, должны быть получены из одной и той же культуры. Выращивание основной культуры должно осуществляться в условиях (свет, температура и среда), аналогичных условиям, которые будут использоваться при тестировании. Если среда для тестирования отличается от среды для культивирования *Chironomus sp.*, то следует включить в тестирование предварительную стадию

акклиматизации – размещение кладок яиц для выведения и сохранения личинок первого возраста в среде, используемой для тестирования, при температуре тестирования до начала тестирования.

7.3 Вода

7.3.1 Для содержания личинок и проведения тестирования может использоваться природная вода (поверхностные или подземные воды), дехлорированная водопроводная вода или искусственная среда (М4 или М7, приложение В), если *Chironomus sp.* выживают в таких средах во время культивирования, акклиматизации и тестирования, не проявляя признаков стресса. Любая вода, качество которой соответствует химическим характеристикам подходящей воды, указанным в приложении С, может использоваться для тестирования. Качество воды должно быть постоянным в течение всего теста. Искусственные среды могут быть получены путем добавления определенного количества реагентов (ч.д.а.) к дистиллированной или деионизированной воде. Примеры приготовления искусственных сред приведены в приложении В.

7.3.2 Характеристики качества природной воды, указанные в приложении С, необходимо измерять как минимум два раза в год, или если предполагается, что качество воды могло измениться. Также необходимо определять содержание тяжелых металлов (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). При использовании дехлорированной водопроводной воды необходимо определять содержание хлора. При использовании природной воды необходимо измерять электрическую проводимость, содержание общего органического углерода (ООУ) и химического потребления кислорода (ХПК).

7.3.4 Для тестирования и культивирования рекомендуется использовать одну и ту же воду. Это позволит избежать проведения акклиматизации. Перед тестированием необходимо провести аэрацию воды для насыщения кислородом.

7.4 Тестируемые растворы

7.4.1 Тестируемые растворы исследуемого вещества необходимой концентрации обычно готовят путем разбавления исходного основного раствора. Желательно готовить основные растворы путем растворения исследуемого вещества непосредственно в используемой воде. Если возможно, то использования растворителей и диспергаторов следует избегать. Тем не менее, применение растворителей может быть необходимо в некоторых случаях для получения раствора с нужной концентрацией или однородного основного раствора. Для активных ингредиентов или других индивидуальных химических веществ (т.е. не смесей) количество исследуемого вещества в тестируемом растворе не должно превышать практического предела растворимости исследуемого вещества в воде (среде). При использовании растворителей или диспергаторов концентрация растворителя должна быть одинаковой во всех тестируемых растворах и контрольной пробе. Кроме того, максимальная концентрация растворителя должна составлять 100 мкл/л или 100 мг/л в зависимости от того, какая величина меньше.

7.4.2 В общем случае, тестирование проводится без корректировки pH. Если pH не сохраняется в диапазоне 6 – 9, то проводится повторное тестирование с регулировкой pH исходного основного раствора до pH используемой воды перед приготовлением тестируемых растворов. Регулирование pH, предпочтительно 0,1 М раствором HCl и 0,1 М раствором NaOH, должно проводиться таким образом, чтобы концентрация исходного основного раствора не изменялась в значительной степени и не происходили какие-либо химические реакции, например осаждение исследуемого вещества. Для поддержания концентрации тестируемого раствора в течение 48 ч корректировка pH в диапазоне 6 – 9 может проводиться для химических веществ, неустойчивых в данном диапазоне pH.

8 Процедура теста

8.1 Предварительная подготовка тестовых организмов

8.1.1 За 4 – 5 дней до добавления личинок первого возраста в тестовые сосуды (начала теста) свежие кладки яиц (< 24 ч) отбираются из основной культуры. Для обеспечения правильного возраста кладок края сосудов для культивирования должны быть очищены от старых кладок яиц за 24 ч до отбора (старые кладки также могут оставаться в сосудах для культивирования). Для начала тестирования как минимум 3, но наиболее предпочтительно 6, нитей яиц отбирают из культуры, и дают им вылупиться, одновременно добавляя корм (п. 8.1.2). Личинки для тестирования выбираются случайным образом из этой партии.

При тестировании может использоваться среда, полученная от культивирования, или свежеприготовленная среда. Как правило, личинки вылупляются в течение нескольких дней после закладки яиц (от 2 до 3 дней для *C. riparius* при 20 °С и от 1 до 4 дней для *C. dilutus* при 23 °С и *C. yoshimatsui* при 25 °С). Для тестирования необходимо использовать личинки первого возраста. Возраст личинок может быть проверен путем измерения ширины головной капсулы. На рисунках 1 и 2 изображены свежая кладка яиц и кладка яиц после вылупливания соответственно.

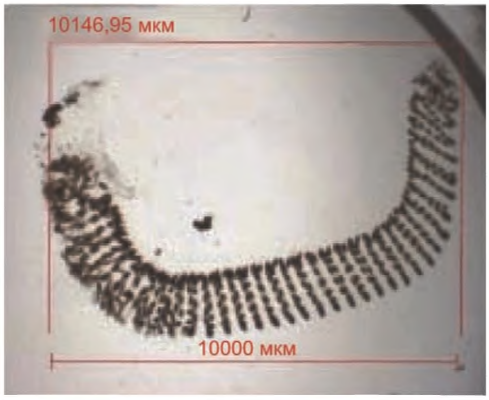

Рисунок 1 – Свежая кладка яиц (< 24 ч) *C. riparius*.



Рисунок 2 – Личинки первого возраста из практически полностью вылупившейся кладки яиц *C. riparius*.

8.1.2 Во время тестирования личинок нельзя кормить. Тем не менее, кормление до начала тестирования (т.е. непосредственно после вылупливания) имеет значение для обеспечения ≥ 85% выживаемости личинок в контрольной группе в конце тестирования. Несколько капель фильтрата из мелкой суспензии корма для рыб (например TetraMin® или TetraPhyll®) в количестве 0,05 – 0,5 мг на одну личинку является достаточным для молодых личинок. В качестве корма также можно использовать зеленые водоросли. В таком случае, следует проявлять осторожность при добавлении личинок в тестовый сосуд, чтобы не допустить прививание тестовой среды водорослями, которые могут повлиять на доступность исследуемого вещества.

В качестве альтернативы корму для рыб может использоваться растительный материал, например крапива (*Urtica dioca*), шелковица (*Morus alba*), белый клевер (*Trifolium repens*) и шпинат (*Spinacia oleracea*), а также другие растительные материалы (Cerophyl или альфа-целлюлоза).

Количество корма, необходимое до начала теста, должно обеспечивать адекватную выживаемость. Экстракт корма для рыб может быть получен путем кипячения суспензии корма для рыб с последующим удалением крупных частиц, например путем фильтрации или удаления осажденной фракции. Содержание общего органического углерода в полученном экстракте, как правило, составляет около 3,7 г/л, только малое количество которого будет добавлено в тестовые сосуды.

8.1.3 Личинки могут удерживаться на поверхности воды без возможности проникновения в толщу воды. Это во многом зависит от физико-химических свойств исследуемого вещества и (или) тестовой среды, а также может быть связано с процессом очистки сосудов. Добавление личинок к тестовой системе путем выпуска их ниже поверхности раствора является одним из способов уменьшения эффекта задержания на поверхности. При наличии личинок на поверхности тестируемого раствора на них можно добавить несколько капель раствора из пипетки, что поможет им погрузиться в раствор. Задержание личинок на поверхности может привести к получению недостоверных данных (например высокой смертности в контрольных пробах). Одним из возможных решений для предотвращения задержания является добавление небольшого количества диспергатора, например Твин-80 в концентрации 2 мкл/л, для снижения поверхностного натяжения тестируемого раствора, хотя использование диспергаторов, как правило, не приветствуется (см. п. 7.4.1). Другим способом может быть физическое предотвращение поступления личинок на границу раздела воздух/раствор, например за счет использования герметичных тестовых сосудов без свободного воздушного пространства или с помощью сеток, удерживающих личинок в тестируемом растворе.

8.2 Условия проведения теста

8.2.1 Тестовые и контрольные группы

Тестовые сосуды заполняют необходимым количеством тестируемых растворов. Личинок первого возраста *Chironomus sp.* случайным образом распределяют в тестовые сосуды при помощи пипетки с тупым концом. Для каждой тестируемой концентрации и контрольной пробы используют, как минимум, по 20 личинок, предварительно разделенных на четыре группы по пять личинок. Для каждой личинки необходимо обеспечить хотя бы по 2 мл тестируемого раствора (т.е. объем тестируемого раствора для пяти личинок в тестовом сосуде должен составлять, как минимум, 10 мл; объем тестируемого раствора также должен быть достаточным для отбора необходимых образцов в конце теста для аналитического определения концентрации воздействия).

8.2.2 Тестируемые концентрации

8.2.2.1 Концентрации для окончательного тестирования можно определять в тесте по подбору диапазона концентраций. Для этого на личинок воздействуют исследуемым веществом в широком диапазоне концентраций в течение 48 ч. Для каждой выбранной концентрации используют, как минимум, десять личинок, разделенных на две параллельные группы.

8.2.2.2 В окончательном тесте используют, как минимум, пять концентраций исследуемого вещества, а также контрольные пробы только с водой и растворителем (при необходимости). Контрольная проба с растворителем содержит растворитель в концентрации, используемой при тестировании. Тестируемые концентрации должны составлять геометрическую прогрессию со знаменателем не более 2,2. В отчете о проведении теста необходимо обоснование использования в тестировании менее пяти концентраций или наличия геометрической прогрессии с бóльшим знаменателем, например пологий наклон кривой «тестируемая концентрация – отклик». Желательно, чтобы наибольшая тестируемая концентрация вызывала 100%-ую иммобилизацию, а наименьшая концентрация не приводила к появлению какого-либо очевидного эффекта. В то же время, данные условия являются второстепенными для надлежащего определения EC_{50}.

8.2.3 Условия инкубации

Температура воды должна быть 18 – 22 °С для *C. riparius*. Для *C. dilutus* и *C. yoshimatsui* рекомендуется температура 23 °С и 25 °С, соответственно. В каждом отдельном тесте температура должна быть постоянной в пределах ±1 °С. Рекомендуется освещенность в последовательности – 16 ч свет, 8 ч темнота, интенсивность света должна быть в пределах от 500 до 1000 лк. Полная темнота также приемлема, особенно для тестирования веществ, неустойчивых на свету. Тестовые сосуды должны быть расположены в лаборатории в случайном порядке.

8.2.4 Продолжительность теста

Тестирование начинается с добавления личинок в тестируемый раствор и продолжается в течение 48 ч.

8.2.5 Наблюдения

На 24-ый и 48-ой ч тестирования каждый тестовый сосуд необходимо проверять на присутствие иммобилизованных личинок. Для облегчения наблюдений необходимо использовать стереомикроскоп или световой стол. Личинки, неспособные изменять свое положение (ползком или за счет плавательных движений) в течение 15 секунд после воздействия механического раздражителя,

например воздействия струи воды из пипетки Пастера или встряхивания тестового сосуда, считаются неподвижными (иммобилизованными). Личинки движутся хаотично, и фазы высокой активности (например плавания за счет быстрого изменения формы тела в альфа-форму при максимальном сжатии и обратно) сменяются фазами полного отсутствия движения.

Иммобилизация используется в качестве показателя-заменителя летального исхода, поскольку установить гибель личинок первого возраста достаточно трудно. В дополнение к иммобилизации также должны быть зарегистрированы любое нестандартное поведение или аномальный внешний вид. Иммобилизованные личинки, обнаруженные на 24-ый ч тестирования, не удаляются из тестовых сосудов, таким образом, их иммобилизация может быть подтверждена по окончании теста. Личинки, не обнаруженные в тестируемом растворе, считаются иммобилизованными.

8.2.6 Аналитические измерения

8.2.6.1 Содержание растворенного кислорода и pH измеряются, как минимум, в контрольном растворе и тестируемом растворе с наибольшей концентрацией исследуемого вещества в начале и в конце теста. Содержание растворенного кислорода в контрольном растворе должно соответствовать критериям достоверности теста. Содержание растворенного кислорода в контрольных и тестовых сосудах должно быть представлено в мг/л. Значение pH не должно изменяться более чем на 1,5 единицы в течение теста. Температура обычно измеряется в контрольных сосудах и должна регистрироваться непрерывно на протяжении всего теста или, как минимум, в начале и в конце теста.

8.2.6.2 Концентрацию исследуемого вещества необходимо измерять в контрольных пробах, а также пробах с наименьшей и наибольшей концентрацией в начале и конце каждого теста. Результаты теста рекомендуется рассчитывать на основании измеренных концентраций. Однако, если доказано, что концентрация исследуемого вещества удовлетворительно поддерживается в пределах ±20% от номинальной или измеренной начальной концентрации на протяжении всего теста, то результаты могут быть основаны на номинальных или измеренных начальных значениях.

8.2.7 Пороговый тест

Пороговый тест с одной концентрацией может быть выполнен при 100 мг/л исследуемого вещества или концентрации, равной практическому пределу растворимости в тестовой среде (с наименьшей концентрацией) для демонстрации того, что EC_{50} больше тестируемой концентрации. Пороговый тест выполняется с использованием 20 личинок (партию личинок желательно разделить на четыре группы по 5 личинок), а также 20 личинок в контрольной пробе. Если процент иммобилизации составляет > 15% в конце теста, то необходимо проводить окончательный тест для получения описания зависимости тестируемая концентрация – отклик. Любое наблюдаемое аномальное поведение личинок должно быть зарегистрировано.

9 Данные и отчет о проведении теста

9.1 Данные

9.1.1 Полученные данные должны быть представлены в табличной форме с указанием значений для каждой параллельной пробы, количества личинок, используемых при тестировании, и значений иммобилизации для каждой пробы. Иммобилизация (количество иммобилизованных личинок в %), обнаруженная на 24-ый и 48-ой ч теста, изображается на графике в зависимости от тестируемой концентрации. Анализ данных проводят с использованием соответствующих моделей (например пробит-преобразования) для определения зависимости тестируемая концентрация – отклик, наклона кривой тестируемая концентрация – отклик и значения EC_{50} с 95%-ым доверительным интервалом. *NOEC* может быть определена с помощью соответствующего статистического теста, например теста Фишера.

9.1.2 Если стандартные методы расчета EC_{50} не применимы к полученным данным, то наибольшая концентрация, не вызывающая иммобилизацию, и наименьшая концентрация, приводящая к 100%-ой иммобилизации, должны использоваться в качестве аппроксимирующих значений для вычисления EC_{50} (EC_{50} рассматривается как среднее геометрическое двух данных концентраций).

9.2 Отчет о проведении теста

Отчет о проведении теста должен содержать следующую информацию:

об исследуемом веществе:

- физическая природа и физико-химические свойства;
- данные о химической идентификации, в том числе чистота исследуемого вещества;

о тестовом виде:

- источник и виды *Chironomus sp.*, поставщик источника (если известен), а также используемые условия культивирования (в том числе источник, вид и количество корма, частота

кормлений);

об условиях тестирования:

- описание тестовых сосудов: тип и объем сосудов, объем тестируемого раствора, количество личинок в одном тестовом сосуде, количество тестовых сосудов (в том числе параллельных) для одной концентрации;

- методы подготовки исходного основного и тестируемых растворов, включая концентрацию любого растворителя или диспергатора, используемые тестируемые концентрации;

- подробные сведения об используемой воде: источник и характеристики качества воды (pH, жесткость, электропроводность и т.д.); состав искусственной среды, если она используется;

- условия инкубации: температура, интенсивность света и последовательность освещения, содержание растворенного кислорода, pH и т.д.

Результаты теста:

- количество и процент личинок, иммобилизованных или демонстрирующих любые побочные эффекты (включая нестандартное поведение) в контрольной пробе и каждой тестовой пробе для каждого времени наблюдения, а также описание природы наблюдаемых эффектов;

- результаты и данные, полученные в тесте со стандартным веществом, при его наличии;

- номинальная тестируемая концентрация и результаты всех анализов по определению концентрации исследуемого вещества в тестовых сосудах с указанием воспроизводимости и предела обнаружения аналитического метода;

- данные всех физико-химических измерений, в том числе температуры, pH и содержания растворенного кислорода, проведенных в течение теста;

- EC_{50} (48 ч) для иммобилизации с 95%-ым доверительным интервалом и график зависимости тестируемая концентрация – отклик, наклон графика зависимости тестируемая концентрация – отклик и его стандартное отклонение от подходящей модели;

- статистические и (или) математические процедуры, используемые для определения EC_{50} (данные об иммобилизации на 24-ый ч теста также должны быть указаны, если подобные измерения проводились);

- *NOEC* для 24 и 48 ч, при необходимости;

- обоснование любого отклонения от рекомендуемой процедуры теста и влияние данных отклонений на результаты теста.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторного теста со стандартными веществами – 3,5-дихлорфенолом и хлоридом калия

В межлабораторном тесте со стандартными веществами – 3,5-дихлорфенолом и хлоридом калия, были получены значения EC_{50} для 24 и 48 ч. Подтвержденные значения EC_{50} используются для получения приближенных диапазонов, с которыми могут сравниваться результаты тестирования со стандартными веществами (п. 5).

Таблица А.1 – Данные межлабораторного теста с 3,5-дихлорфенолом (3,5-ДХФ) и хлоридом калия (KCl)

Значения	3,5-ДХФ (24 ч)	3,5-ДХФ (48 ч)	KCl (24 ч)	KCl (48 ч)
Число значений	13	13	15	15
Минимальное	0,770	0,517	1,53	0,330
25% процентиль	1,68	0,776	2,16	1,10
Среднее	2,30	1,67	2,84	1,44
75% процентиль	3,47	2,15	3,80	1,85
Максимальное	5,74	3,86	5,94	2,19
10% процентиль	0,807	0,541	1,54	0,643
90% процентиль	5,21	3,57	5,34	2,09
Коэффициент вариации	53,89%	60,12%	39,97%	35,92%

На основании 10 и 90% процентили диапазоны значений (округленные значения) могут быть оценены следующим образом:

3,5-ДХФ EC_{50} (24 ч) = 0,80 – 5,3 мг/л EC_{50} (48 ч) = 0,50 – 3,6 мг/л

KCl EC_{50} (24 ч) = 1,5 – 5,4 мг/л EC_{50} (48 ч) = 0,60 – 2,1 мг/л

Данные значения следует рассматривать как ориентировочные для изучения изменения чувствительности хирономид из тестируемой культуры с течением времени, особенно при значительных изменениях условий культивирования или при добавлении новых организмов к культуре.

Значения для KCl более однородные, чем для 3,5-дихлорфенола (согласно коэффициентам вариации). Некоторые характеристики KCl, то есть высокая растворимость в воде, неспособность к биоразложению, а также бóльшая тестируемая концентрация (в 1000 раз превышающая наибольшую тестируемую концентрацию 3,5-ДХФ), необходимая для получения 50% эффекта, вероятно, способствовали уменьшению погрешности при проведении теста в лаборатории.

Приложение В
(рекомендуемое)

Культивирование *Chironomus riparius*

В.1 Культивирование личинок *C. riparius* может проводиться в чашке-кристаллизаторе или больших сосудах. На дно сосуда тонким слоем от 5 до 10 мм помещают мелкий кварцевый песок. Диатомовая земля (например Merck, ст 8117) также является подходящим субстратом для культивирования (достаточно тонкого слоя диатомовой земли высотой до нескольких мм). Также в качестве субстрата может использоваться фильтровальная бумага. После добавления субстрата в сосуд для культивирования добавляют воду (п. В.3) на высоту до нескольких сантиметров. По мере необходимости в сосуд для культивирования добавляют воду для восполнения потерь вследствие испарения и предотвращения высыхания среды для культивирования. При необходимости воду можно периодически заменять.

Проводят аккуратную аэрацию подготовленной среды для культивирования. Сосуды для культивирования помещают в специальный инкубатор для предотвращения выпуска появившихся взрослых хирономид. Инкубатор должен быть достаточной вместимости для обеспечения свободного перемещения и роения появившихся взрослых хирономид, иначе не будет происходить копуляция (размеры инкубатора должны составлять как минимум 30 × 30 × 30 см).

Для минимизации инбридинга желательно регулярно проводить обмен полученными нитями яиц с другими лабораториями.

В.2 В инкубаторе необходимо поддерживать комнатную температуру или постоянную температуру 20 ± 2 °С и обеспечивать освещенность в последовательности: 16 ч свет (интенсивность около 1000 лк), 8 ч темнота, включая получасовую фазу рассвета или сумерек с низкой интенсивностью света около 500 лк для стимулирования роения и воспроизводства. Влажность воздуха должна составлять более 60%, меньшая влажность воздуха может препятствовать размножению.

В.3 Вода для культивирования

В качестве воды для культивирования может использоваться любая подходящая природная вода или искусственная среда. Обычно это артезианская вода, дехлорированная водопроводная вода и искусственные среды (среды М4 или М7). За 24 ч до культивирования следует провести аэрацию воды. При необходимости воду для культивирования можно обновлять путем аккуратного сливания или откачивания использованной воды из сосуда для культивирования без воздействия на личинок. Замена воды должна проводиться, как минимум, один раз в месяц или при значительном ухудшении качества воды.

В.4 Кормление личинок

В.4.1 В качестве корма для личинок используют хлопьевидный корм для рыб (TetraMin®, TetraPhyll® или другой аналогичный корм) в количестве около 250 мг на один сосуд для культивирования в сутки. Корм дают личинкам в виде сухого порошка или водной суспензии: 1,0 г хлопьевидного корма добавляют к 20 мл воды для культивирования и перемешивают до получения однородной смеси. В сосуды для культивирования добавляют суспензию из расчета 5 мл на один сосуд (перед добавлением в сосуд суспензию встряхивают). Для личинок старшего возраста корма может быть больше.

В.4.2 Кормление регулируется в зависимости от качества воды. Если среда для культивирования становится мутной, то количество корма необходимо уменьшать. Добавление корма необходимо тщательно контролировать. Недостаточное питание может привести к миграции личинок на дно сосуда, слишком обильное питание может вызывать повышение активности микроорганизмов и снижение концентрации кислорода. Обе ситуации могут привести к снижению темпов роста личинок.

В.4.3 В сосуды для культивирования также можно добавлять некоторые виды зеленых водорослей (например *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

В.4.4 Кормление взрослых хирономид

В качестве корма для взрослых хирономид используют насыщенный раствор сахарозы, нанесенный на ватный диск. Такое кормление способствует увеличению продолжительности жизни хирономид и улучшению воспроизводства.

В.5 Появление хирономид

По прошествии 13 – 15 дней при температуре 20 ± 2 °С в сосудах для культивирования появляются взрослые особи хирономид. Мужские особи имеют тонкое тело и перистые усики.

В.6 Откладывание яиц

При первом появлении взрослых особей в инкубаторе все сосуды для культивирования следует проверять три раза в неделю на наличие кладок яиц. При необходимости для начала теста на острую токсичность или для создания новой культуры кладки яиц извлекают из сосудов для культивирования и переносят в небольшие емкости, заполненные водой для культивирования. Кладки яиц могут использоваться непосредственно для выращивания новой культуры (например 2 – 4 кладки яиц на один сосуд для культивирования) или после вылупливания личинок (например 200 личинок) переносят в новый сосуд для культивирования.

При температуре 20 °С личинки первого возраста появляются через 2 – 3 дня.

В.7 Подготовка новых сосудов для культивирования

После получения новой культуры должна быть возможность установки новых сосудов для культивирования. Новые сосуды устанавливают один раз в неделю или реже в зависимости от условий тестирования и удаления старых сосудов после появления взрослых хирономид. Данная процедура позволяет регулярно получать взрослых хирономид при минимальном контроле культивирования.

В.8 Подготовка сред для культивирования М4 и М7

Среды для культивирования М4 и М7 готовят из основных растворов (I) микроэлементов и витаминов. Сначала готовят основные растворы (I) в деионизированной воде. Из данных основных растворов (I) готовят второй единственный основной комбинированный раствор (II) (таблица В.1). Концентрации отдельных химических веществ в среде М7 в 4 раза ниже, чем в среде М4.

В.9 Подготовка среды М7

Каждый основной раствор (I) готовят индивидуально, и комбинированный основной раствор (II) получают из приготовленных основных растворов (I). Для приготовления среды М7 50 мл комбинированного основного раствора (II) и определенные объемы основных растворов питательных веществ, указанные в таблице В.2, доводят до метки 1 л деионизированной водой. Основной раствор витаминов получают путем добавления трех витаминов к деионизированной воде, как показано в таблице В.3, и 0,1 мл основного комбинированного раствора витаминов добавляют в подготовленную среду М7 незадолго до использования. Основной раствор витаминов хранят в замороженном виде небольшими порциями. Подготовленные среды аэрируют и отстаивают.

Таблица В.1 – Основные растворы микроэлементов для сред М4 и М7

Основные растворы (I)	Масса вещества, мг [3]	Объем основного раствора (I), мл/л [4]		Окончательные концентрации в тестируемых растворах (мг/л)	
		М4	М7	М4	М7
H_3BO_3 [1]	57190	1,0	0,25	2,860	0,715
$MgCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6120	1,0	0,25	0,306	0,770
RbCl [1]	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ [1]	3040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr [1]	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ [1]	1260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ [1]	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,.5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$ [1, 2]	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ [1, 2]	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

[1] – Содержание данных веществ различно для сред М4 и М7.
[2] – Данные растворы готовят индивидуально, сливают вместе и немедленно помещают в автоклав.
[3] – Доводят до метки 1 л деионизированной водой для приготовления основного раствора (I).
[4] – Доводят до метки 1 л деионизированной водой для приготовления комбинированного основного раствора (II).

Таблица В.2 – Основные растворы питательных веществ для сред М4 и М7

Основные растворы	Масса вещества, мг [1]	Объем основного раствора питательного вещества, мл/л [2]	Окончательные концентрации в тестируемых растворах М4 и М7, мг/л
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246600	0,5	123,3
KCl	58000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1840	0,1	0,184

[1] – Доводят до метки 1 л деионизированной водой для приготовления основного раствора.
[2] – Добавляют к средам М4 и М7.

Таблица В.3 – Основной раствор витаминов для сред М4 и М7

Витамин	Масса витамина, мг [1]	Объем основного раствора витамина, мл/л [2]	Окончательные концентрации в тестируемых растворах М4 и М7, мг/л
Тиамина гидрохлорид	750	0,1	0,075
Цианокобаламин (B_{12})	10	0,1	0,001
Биотин	7,5	0,1	0,00075

[1] – Доводят до метки 1 л деионизированной водой для приготовления основного раствора.
[2] – Добавляют к средам М4 и М7 перед использованием.

Для получения единого витаминного раствора сливают три основных раствора витаминов.

Приложение С
(справочное)

Химические характеристики воды, приемлемой для проведения теста

Природная вода со следующими характеристиками (таблица С.1) является подходящей средой для содержания, культивирования и тестирования хирономид.

Таблица С.1 – Химические характеристики воды, приемлемой для проведения теста

Вещество	Концентрация
Взвешенные частицы	< 20 мг/л
Полный органический углерод	< 2 мг/л
Неионизированный аммоний	< 1 мкг/л
Жесткость по $CaCO_3$ [1]	< 400 мг/л
Остаточный хлор	< 10 мкг/л
Общие органофосфорные пестициды	< 50 нг/л
Общие органохлорные пестициды и полихлорированные бифенилы	< 50 нг/л
Общий органический хлор	< 25 нг/л
[1] – Если ожидается, что исследуемое вещество взаимодействует с ионами жесткости, то используется вода с меньшей жесткостью (таким образом, в данной ситуации среда М4 не должна использоваться).	

УДК 658.382.3:006.354 МКС 13.020.01 IDT

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, оценка острой токсичности, хирономиды

Подписано в печать 12.01.2015. Формат 60х84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 33 экз. Зак. 166.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru