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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32541– 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Краткосрочное испытание токсичности на эмбрионах и предличинках рыб

(OECD, Test №212:1998, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

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 Российской Федерации

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 14 ноября 2013 г. № 44–2013)

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
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № No. 212 «Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages» (ОЭСР Тест № 212 «Рыбы. Кратковременное исследование токсичности на стадиях икринки и предличинки»).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 799-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32541–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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, 2014

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

Введение

Только тесты, охватывающие все стадии жизни рыб, могут дать точную оценку хронической токсичности химических веществ, и что любое ограничение воздействия, такое как удаление определенного этапа жизненного цикла, может снизить чувствительность и таким образом привести к неправильной оценке хронической токсичности. Проведение теста на эмбриональной стадии и стадии желточного мешка могут быть менее чувствительными, чем полное исследование токсичности первой стадии жизни [36], особенно относительно химических веществ с высокой липофильностью (log Poe > 4), и химических веществ с определенным способом токсического воздействия. Однако, различия в чувствительности между этими двумя тестами меньше, чем ожидалось для химических веществ с неспецифическим наркотическим воздействием [1].

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

Краткосрочное испытание токсичности на эмбрионах и предличинках рыб

Testing of chemicals of environmental hazard. Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages

Дата введения – 2014 - 08 - 01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы исследования токсичности на стадиях эмбриона и малька рыб – экспресс–метод, в котором воздействию подвергаются животные на стадии жизненного цикла от оплодотворения икры до конца стадии желточного мешка.

Настоящий стандарт предназначен для определения летального эффекта, и ограниченно, сублетальных эффектов химических веществ на определенных стадиях развития тестируемых видов.

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 который вещество оказывает эффект или наименьшая эффективная концентрация. Однако, у всех тестируемых концентраций выше LOEC должен быть неблагоприятный эффект, равный или больший, чем наблюдаемые в LOEC.

2.2 **не эффективная концентрация** (NOEC): Максимальная концентрация в тесте, в котором не наблюдается статистически значимого смертельного или другого эффекта (концентрация непосредственно ниже LOEC).

3 Принцип тестирования

Рыбы в стадиях эмбриона и желточного мешка подвергаются воздействию диапазоном тестовых концентраций растворенного в воде вещества. Тест позволяет выбирать между полустатическим и динамическим тестом. Выбор зависит от природы испытуемого вещества. Испытание начинают, помещая оплодотворенные икринки в испытательные камеры, и завершают непосредственно перед исчезновением желточного мешка у любой из личинок в любой из испытательных камер перед началом гибели животных от голода в контрольной группе. Смертельные и сублетальные эффекты оцениваются по сравнению с контролем для определения самой низкой наблюдаемой эффективной концентрации и, следовательно, неэффективной концентрации NOEC. Альтернативно эти параметры мо-гут быть проанализированы с помощью регрессионного анализа для оценки процента концентрации данного эффекта (то есть, LC/ECx, где x – % определенного эффекта).

4 Информация относительно тестируемого вещества

4.1 Должны быть доступными результаты острого испытания на токсичность [37], выполненные предпочтительно на видах выбранный для этого теста. Результаты могут быть полезными при выборе адекватного диапазона тестируемых концентраций в испытании первых стадий жизненного цикла. Растворимость в воде (включая растворимость в тестируемой воде) и давление пара исследуемого вещества должно быть известно. Также должен быть доступным надежный аналитический метод для определения вещества в тестируемых растворах с требуемой точностью и предел обнаружения, о которых сообщают в отчете.

Издание официальное

4.2 Информация относительно тестируемого вещества, которая может повлиять на условия эксперимента, включая структурную формулу, чистота тестируемого вещества, стабильности на свету, стабильности при условиях испытания, pKa, Pow и результаты испытания на биоразлагаемость [38].

5 Достоверность испытания

Для испытания, чтобы быть достоверными, на результаты теста накладываются следующие условия:

- полное выживание оплодотворенной икры в контрольных группах и, где применимо, в одном растворителе, который должен быть большим или равным пределам, определенным в приложениях Б и В;
- концентрация растворенного кислорода в течение испытания должна быть между 60 и 100 процентов от величина насыщения (ASV);
- температура воды не должна отличаться больше, чем ± 1,5 °С между тестовыми аквариумами или между репликациями в течение всего теста, и должна быть в пределах температурного диапазона, определенного для тестовых видов (приложения Б и В).

6 Описание метода

6.1 Испытательные камеры (аквариумы)

Может использоваться любое стекло или другой химически инертный материал. Размеры аквариума должны быть достаточно большими, чтобы обеспечить необходимую загрузку (7.2). Рекомендуется, устанавливать аквариумы в случайном порядке. Тестовые аквариумы должны быть защищены от посторонних воздействий.

6.2 Выбор вида рыбы

Рекомендуемые виды рыбы даны в таблице 1. Это не препятствует использованию других видов (примеры даны в таблице 2), но испытательную процедуру, вероятно, придется адаптировать, чтобы обеспечить подходящие испытательные условия. В этом случае необходимо объяснение выбора видов и экспериментального метода.

Таблица 1 – Виды рыб, рекомендованные для теста:

Пресноводные
Oncorhynchus mykiss - Радужная форель (9) (16)
Brachydanio rerio - Данио рерио (7) (17) (18)
Cyprinus carpio - Карп (8)(19)
Oryzias latipes - Японская медака (20) (21)
Pimephales promelas - Тупоголовый гольян (8)(22)

Таблица 2 – Примеры других хорошо зарекомендовавших видов, которые также могут быть использованы в тестах

Пресноводные	Морские
Золотой карась Carassius auratus Солнечник Lepomis macrochirus	Менидия Menidia peninsulae Сельдь Clupea harengus Треска Gadus morhua Карпозубик Cyprinodon variegatus

6.3 Содержание рыбы

Проведение сырья выводка с удовлетворительным состоянием должно соответствовать [36 пункты 2, 3, 4, 5, 6].

6.4 Получение эмбрионов и личинок

6.4.1 Эмбрионы и личинки могут быть подвергнуты воздействию в основном аквариуме или в меньшей емкости, оборудованной приспособлениями, разбивающими поток тестируемого раствора реактива. Нетурбулентный поток через этот небольшой сосуд может быть усилен механическим перемешиванием. Оплодотворенная икра сальмонид может содержаться на стеллажах или сетках с отверстиями достаточно большими, чтобы позволить личинкам погружаться после вылупления. Допустимо использование пипеток Пастера для удаления эмбрионов и личинок в полустатическом тесте с полным ежедневным обновлением (6.6.2).

6.4.2 Там, где используются сетки или стеллажи для икры в основном тестовом сосуде, это оборудование должно быть удалено после выхода личинок согласно рекомендациям [36], за исключением случая, когда сетки должны быть сохранены, чтобы не допустить уход рыбы. Личинки не должны подвергаться воздействию воздуха, а сетки не должны использоваться для отделения рыбы от емкостей с икрой (такое предостережение возможно, но не обязательно для некоторых менее нежных видов, например, карпа). Длительность отделения меняется в зависимости от вида, и передача может не всегда быть необходимый. Для полустатического метода могут использоваться стаканы или небольшие контейнеры, оборудованные, если необходимо, сеткой немного поднятой выше дна стакана. Если объем этих емкостей достаточен, чтобы выполнить требования по загрузке (7.2), нет необходимости пересаживать эмбрионы или личинки. В любом случае рекомендуют обработку эмбрионов и предличинок.

6.5 Вода

Для эксперимента может использоваться любая вода, которая обеспечивает условия долговременного выживание и рост тестовых видов. Она должна иметь постоянные характеристики в течение проведения теста. pH воды должно быть в диапазоне от 6,5 до 8,5, но во время теста это значение должно колебаться в пределах ± 0,5. Чтобы гарантировать, что вода, используемая для разбавления, не будет влиять на результаты эксперимента (например, путем образования комплексов с тестируемым веществом), должны быть взяты пробы воды для анализа. Необходимо каждые три месяца в разбавляющей воде измерять концентрацию тяжелых металлов (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, N и т.д.), основных анионов и катионов (Ca, Mr, Na, K, Cl, SO_4 и т. д.), пестицидов (общее содержание фосфор и хлорорганических веществ), содержание общего органического углерода и сухого остатка для того, чтобы иметь уверенность в том, что вода является относительно постоянной по своему составу. Если существуют доказательства того, что качество воды постоянно в течение года, определения могут быть менее частыми (например, каждые шесть месяцев).

6.6 Тестовые растворы реактива

6.6.1 Тестовые растворы требуемых концентраций готовятся путем разбавления основного раствора. Основной раствор подготавливается путем растворения необходимых веществ в воде с использованием механических средств (например, магнитные или ультразвуковые мешалки). Для получения необходимого концентрированного раствора можно использовать таблицы растворимости. Использование растворителей не рекомендуется. Однако, в случае, если это необходимо, нужно отдельно поставить контрольную пробу с растворителем в той же самой концентрации, что и в эксперименте. Выбор растворителя будет определен химическими свойствами вещества. Рекомендуемая максимальная концентрация растворителя – 100 мкл/л.

Рекомендуется минимизировать концентрацию растворителя везде, где это технически выполнимо (в зависимости от физико–химических свойств тестируемого вещества).

6.6.2 Для полустатического теста могут использоваться две различные процедуры обновления; или (i) новые тестируемые растворы реактива добавляет в чистый сосуд, в который пересаживают икру и личинки в небольшом объеме старого раствора, избегая контакта с воздухом, или (ii) подопытные организмы оставляют в тестовом аквариуме, заменяя (по крайней мере три четверти) воды новым раствором. Частота обновления тестовой среды будет зависеть от стабильности испытательного вещества, но рекомендуется ежедневное водное обновление. Если в ходе предварительных испытаний на стабильность (пункт 4), тестовая концентрация вещества неустойчива (то есть находится вне диапазона от 80% до 120 % от номинала или падает ниже 80 % начальной концентрации) за период обновления, рекомендуют динамический тип теста. В любом случае, не следует подвергать личинки стрессу во время обновления среды.

6.6.3 Для динамического теста, в котором система непрерывно распределяет и разбавляет основной раствор тестируемого вещества (например, дозаторный насос, пропорциональный разбавитель, система растворения) необходимо использовать ряд концентраций к испытательным камерам. Скорости потока основных растворов и воды разбавления должны проверяться с равными промежутками, предпочтительно ежедневно, и не должны меняться больше, чем на 10% в течении теста. Подходящая скорость потока, эквивалентна, по крайней мере пяти объемам тестового аквариума в 24 часа [2].

7 Процедура

7.1 Условия воздействия

7.1.1 Продолжительность

Эксперимент должен начаться в течение 30 минут после оплодотворения икры. Эмбрионы помещают в тестовый раствор реактива сразу или как можно скорее после начала стадии деления бластодиска и в любом случае перед началом стадии гаструлы. Для икры, полученной от коммерческого поставщика, не представляется возможным начать испытания немедленно после оплодотворения. Таким образом, чувствительность испытания может пострадать из-за запаздывания начала испытания. Испытание должно быть инициировано в течение восьми часов после оплодотворения. Поскольку личинки не питаются во время периода желточного мешка, испытание должно быть завершено непосредственно перед тем, как желточный мешок полностью рассосется или прежде, чем начнется смерть от голодания в контрольных группах. Продолжительность теста будет зависеть от вида. Несколько рекомендуемых продолжительностей теста даны в приложениях Б и В.

7.2 Загрузка

Количество оплодотворенной икры в начале теста должно быть достаточным, чтобы отвечать статистическим требованиям. Икра должна быть случайным образом распределена порциями по 30 оплодотворенных икринок (насколько это возможно, так как может быть трудно получить равные порции для некоторых видов), между тремя репликациями для каждой концентрации. Уровень загрузки (биомасса на объем испытуемого раствора реактива) должна быть достаточно низкой, чтобы концентрация растворенного кислорода, на уровне не менее 60 % от насыщения, могла быть поддержана без аэрирования. Для проточного теста рекомендуют уровень загрузки не более 0,5 г/л в 24 часа и не более 5 г/л раствора [2].

7.3 Свет и температура

Фотопериод и температура воды должны соответствовать требованиям содержания видов (см. приложения Б и В).

7.4 Испытательные концентрации

7.4.1 Обычно готовят пять концентраций испытательного вещества, с кратностью разбавления 3,2. Кривая, связывающая LC50 с периодом воздействия в остром эксперименте, должна помочь при выборе диапазона испытательных концентраций. Использование меньше пяти концентраций, например, в тесте на предельное содержание и более узком интервале концентрации, могут применяться в некоторых обстоятельствах. Если используется меньше пяти концентраций, должна быть проведена проверка. Концентрации вещества выше девяноста шестичасового LC50 или 100 мг/л не применяется. Вещества не должны тестироваться выше их предела растворимости в воде.

7.4.2 Когда используются средства повышения растворимости (пункт 6.6.1), конечная концентрация вспомогательного вещества в тестовом аквариуме не должна быть больше, чем 0,1 мл/л, и должна быть одинаковой во всех аквариумах.

7.5 Контрольные группы

Один контроль с разбавляющей водой (желательно в двух повторностях), а также, если необходимо, один контроль веществом, повышающим растворение, должен быть добавлен к тестовому ряду.

7.6 Частота аналитических определений и измерений

7.6.1 Во время испытания концентрации испытательного вещества распределяют равномерно (пункт 7.6.2, п.7.6.3).

7.6.2 В полустатическом тесте, где концентрация испытательного вещества, как ожидают, остается в пределах ± 20 % от номинала (то есть в пределах диапазона от 80 % до 120 % (пункт 4.1, п.6.6.2); рекомендуют анализировать, как минимум самые высокие и самые низкие тестовые концентрации, сразу после приготовления и непосредственно перед обновлением трижды, оставляя равные промежутки между анализами (то есть исследования должны быть сделаны на выборке из того же самого свежеприготовленного раствора). В случае, если концентрация тестируемого вещества не остается в пределах ± 20 % от номинала (на основе данных о стабильности вещества), необходимо анализировать все тестируемые концентрации после приготовления и перед обновлением в том же самом режиме (по крайней мере, три раза). Определение тестируемых концентраций вещества перед обновлением должно быть выполнено для каждого сосуда каждой тестируемой концентрации. Определения должны быть сделаны не реже, чем раз в семь дней. Рекомендуется основывать результаты на взвешенных концентрациях. Однако, если возможно продемонстрировать, что концентрация тестируемого вещества в растворе оставалась в пределах ±

20 % от номинала или взвешенной начальной концентрации в течении всего теста, данные могут быть основаны на номинале или измеренном начальном значении.

7.6.3 Для динамического теста применяют такой же выборочный режим, что и для полустатического теста (но измерение старых растворов не применимо в этом случае). Однако, если продолжительность испытания составляет больше семи дней, желательно увеличить число анализов в течение первой недели (например, три серии измерений), чтобы гарантировать, что испытательные концентрации находятся в стабильном состоянии.

7.6.4 Возможно потребуется центрифугирование или фильтрование (например, с использованием 0,45 мм фильтра). Однако, ни центрифугирование, ни фильтрация не всегда отделяют биодоступную фракцию тестируемого вещества, в этом случае может потребоваться очистка

7.6.5 Во время теста растворенный кислород и температура должны быть измерены во всех сосудах. Общая жесткость и минерализация (если применимо) должны быть измерены в контрольных группах и одном сосуде с самой высокой концентрацией. Растворенный кислород и минерализация должны быть измерены три раза – в начале, в середине и конце теста. В полустатическом эксперименте рекомендуется измерять растворенный кислород более часто, предпочтительно перед и после каждого обновления, или, по крайней мере один раз в неделю. Жесткость должна быть измерена один раз. Температура должна измеряться ежедневно и желательно непрерывно, по крайней мере, в одном испытательном сосуде.

7.7 Наблюдения

7.7.1 Стадия эмбрионального развития: зародышевая стадия (то есть стадия гаструлы) вначале воздействия тестируемого вещества должна быть установлена настолько точно насколько это возможно. Это может быть сделано с помощью представительной выборки икры соответственным образом сохраненной и очищенной. Описание и иллюстрации зародышевых стадий в литературе можно найти в [2], [5], [10], [11].

7.7.2 Выведение и выживание: наблюдения относительно выведения и выживания должны быть сделаны, по крайней мере, один раз в день и количественно зарегистрированы. Желательно делать более частые наблюдения в начале испытаний (например, каждые 30 минут в течение первых трех часов), в некоторых случаях выживание может в большей степени относиться только к количеству смертельных случаев (например, когда есть острый токсический эффект). Мертвые эмбрионы и личинки должны удаляться при обнаружении, так как они могут быстро разлагаться. С особой осторожностью следует удалять мертвых особей, стараясь не повредить соседние икринки/личинки, которые являются чрезвычайно нежными и чувствительными.

Критерии для констатации смерти изменяются соответственно от стадии жизненного цикла:

- для икры: особенно в ранних стадиях, помутнение и изменения в окраске (побеление), вызванные коагуляцией и/или осаждением белка;
- для эмбрионов: отсутствие движения тела и/или отсутствие сердечного сокращения и/или изменение цвета у некоторых видов, эмбрионы которых являются обычно прозрачными;
- для личинок: неподвижность и/или отсутствие дыхательного движения, и/или отсутствие сердечное сокращение, и/или белое непрозрачное окрашивание центральной нервной системы, и/или отсутствие реакции на механические раздражители.

7.7.3 Патологические реакции: количество личинок с деформацией тела и/или пигментированием на стадии поглощения желточного мешка должно быть зарегистрировано в адекватных интервалах в зависимости от продолжительности испытания и подробно описаны. Следует отметить, что патологические эмбрионы и личинки встречаются в естественных условиях и могут составлять несколько процентов в контроле для некоторых видов. Патологические животные должны быть удалены из испытательного сосуда.

7.7.4 Патологическое поведение: расстройства, например, гипервентиляция, некоординируемое плавание, атипичная неподвижность должна быть зарегистрирована в адекватных интервалах в зависимости от продолжительности испытания. Эти эффекты, хотя и трудней определить количественно, если наблюдаются, могут помочь в интерпретации данных, то есть предоставляют информацию о способе токсического действия вещества.

7.7.5 Длина: в конце теста рекомендуется измерение индивидуальных длин; стандартная, до хвоста или полная длина; если, наблюдается гниение или эрозия хвостового плавника, должен использоваться стандартный метод измерения длины. В хорошо проведенном тесте, коэффициент вариации длины в контрольных группах должен быть менее 20 %.

7.7.6 Вес: в конце испытания могут быть измерены индивидуальные веса; сухой вес (24 часа при 60 °С) или, предпочтительно, сырой вес. В хорошо проведенном тесте, коэффициент вариации веса в контрольных группах должен быть менее 20 %.

7.7.7 Наблюдения заканчиваются некоторыми или всеми указанными ниже данными доступными для статистического анализа:

- накопленная смертность;
- количество здоровых личинок в конце теста;
- время начала и конца выведения (то есть 90 % выведения в каждой повторности);
- количество личинок, вылупляющихся каждый день;
- длина (и вес) выживших животных в конце испытания;
- количество личинок с патологическими отклонениями;
- количество личинок с патологическим поведением.

8 Данные и отчет

8.1 Обработка результатов

8.1.1 Необходимо, чтобы статистическая обработка соответствовали требованиям настоящего стандарта и учитывала возможные изменения в проведении теста, например, в количестве тестовых емкостей, количестве исследованных концентраций, начальном количестве оплодотворенных икринок. Все параметры должны иметь размерность. Ввиду возможности выбора в проведении теста, конкретные статистические процедуры здесь не даны.

8.1.2 Если должны быть оценены LOEC/NOECs, для их установления необходимо провести дисперсионный анализ использования процедуры таблицы сопряженности признаков или (ANOVA) для каждого множества повторностей. Чтобы сделать множественное сравнение между результатами индивидуальных концентраций по сравнению с контрольными группами признан полезным метод Даннета (Dunnett) [12],[13]. Другие полезные примеры также доступны [14],[15]. Размер эффекта, поддающийся обнаружению с использованием ANOVA, или другие процедуры (то есть сила теста), должен быть вычислены и сообщены. Нужно отметить, что не все наблюдения, перечисленные в пункте 8.7.7 являются подходящими для статистического анализа ANOVA. Например, накопленная смертность и количество здоровых личинок в конце испытания могут быть проанализированы с помощью метода пробит анализа (анализа вероятностей).

8.1.3 Если должны быть оценены LC/ECxs, соответствующая кривая(ые), такая, как логистическая кривая, должна быть приспособлена к полученным данным, с помощью статистических методов, таких, как метод наименьших квадратов или метод нелинейных наименьших квадратов. Кривая(ые) должна параметрироваться так, чтобы необходимые LC/ECx и его стандартная ошибка были оценены непосредственно. Это значительно уменьшит величину доверительных интервалов вокруг LC/ECx. Если нет серьезных причин, чтобы предпочесть другие уровни значимости, должна быть указана двусторонняя 95 % достоверность. Адаптирующая процедура должна обеспечить средства для такой оценки. Могут использоваться графические методы для того, чтобы адаптировать кривые. Регрессионный анализ подходит для всех наблюдений, перечисленных в пункте 8.7.7.

8.2 Интерпретация результатов

Результаты должны интерпретироваться с осторожностью, если установленные токсичные концентрации тестовых растворов находятся на уровнях около предела чувствительности аналитического метода. Интерпретацию результатов для концентраций выше растворимости в воде тестируемого вещества также следует делать осторожно.

8.3 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать следующую информацию:

8.3.1 Тестируемое вещество:

- физическая природа и соответствующие физико-химические свойства;
- данные о химической идентификации, включая чистоту и аналитический метод для определения веществ, если применимо.

8.3.2 Подопытные виды:

- научное название, порода, количество родительских особей (то есть сколько самок выметали необходимое количество икры в тесте), источник и метод сбора оплодотворенной икры и последующие манипуляции.

8.3.3 Условия эксперимента:

- использованная испытательная процедура (например, полустатический или динамический, время от оплодотворения до начала испытаний, загрузка, и т.д.);
- фотопериод(ы);
- дизайн теста (например, количество испытательных камер и репликаций, количество эмбрионов в повторности);

- метод подготовки основных растворов и частота обновления (вещества, повышающие растворимость, и их концентрация должны быть приведены, если используются);
- номинальные тестовые концентрации, взвешенные значения, оборудование для взвешивания и величина отклонения в тестовой емкости и методы, которыми была достигнута требуемая точность и, если тестируемое вещество растворимо в воде в более низких концентрациях, доказательства, что измерения относятся к тестовым концентрациям вещества в растворе;
- особенности разбавляющей воды: жесткость, температура, концентрация растворенного кислорода, уровни остаточного хлора (если измерялись), полный органический углерод, взвешенные вещества, минерализация среды (если измерялась) и любые другие сделанные измерения;
- качество воды в пределах тестовой емкости, жесткость, температура и концентрация растворенного кислорода.

8.3.4 Результаты:

- результаты любых предварительных исследований стабильности испытательного вещества;
- доказательства, что контрольные группы соответствуют стандарту выживаемости подопытных видов (приложения Б и В);
- данные по летальности/выживанию эмбрионов и личинок, и общая смертность/выживаемость;
- день и количество вылупленных икринок;
- данные по длине (и весу);
- идентификация и описание морфологических патологий, если имеются;
- идентификация и описание поведенческих отклонений, если имеются;
- статистический анализ и обработка данных;
- для испытаний, проанализированных с помощью ANOVA, наименьшая наблюдаемая концентрация эффекта (LOEC) при p=0,05 и неэффективная наблюдаемая концентрация (NOEC) для каждой оцененной реакции, включая описание используемых статистических процедур и доказательства, что величина эффекта может быть обнаружена;
- для теста, проанализированного с помощью регрессионного анализа, LC/ECx и доверительные интервалы, а также график адаптированной модели используемой для ее вычисления;
- объяснение любого отклонения от стандарта.

Таблица 1А – Виды рекомендованные для теста

Пресноводные

Радужная форель Oncorhynchus mykiss [9],[16]

Данио рерио Brachydanio rerio [7],[17],[18]

Карп Cyprinus carpio [8], [19]

Японская медака Oryzias latipes [20],[21]

Тупотоголовый гальян Pimephales promelas [8], [22]

Таблица 1В – Примеры других хорошо описанных видов, которые также могут быть использованы в этом тесте.

Пресноводные	Морские
Золотой карась Carassius auratus Солнечник Lepomis macrochirus	Менидия Menidia peninsulae Сельдь Clupea harengus ТрескаGadusmorhua КарпозубикCyprinodonvariegatus

Приложение А
(рекомендуемое)
Руководство по проведению испытания на токсичность на эмбрионах и личинках Данио Рерио (Brachydanio rerio)

А.1 Введение

А.1.1 Данио Рерио обитает в районе Коромандельского побережья Индии, где населяет потоки с быстрым течением. Это – обычная аквариумная рыбка семейства карповых, и информация о методах ее содержания и разведения может быть найдена в стандартных справочниках по тропическим рыбам. Ее биология и использование в исследовании рыбоводства было рассмотрено Laale [1].

А.1.2 Рыба редко превышает 45 мм в длину. Тело является цилиндрическим с семью – восемью темно–синими горизонтальными серебристыми полосами. Эти полосы соединяются с хвостовыми и анальными плавниками. Спина является коричнево–зеленой. Самцы меньше самок. Самки более светлые и брюшко увеличено, особенно перед нерестом.

А.1.3 Взрослые рыбы в состоянии вынести большие колебания температуры и жесткости. Однако, чтобы получить здоровых рыб, которые производят икру хорошего качества, должны быть созданы оптимальные условия.

А.1.4 Во время нереста самцы преследуют и прижимают самку, выдавливая и оплодотворяя икру. Прозрачные и нелипкие икринки падают на дно, где они могут быть съедены родителями. Нерест связан с освещением. Обычно он происходит в первые часы после рассвета.

А.1.5 Самка может производить несколько сотен икринок в недельные интервалы.

А.2 Условия содержания родительских особей, разведение и стадии развития

А.2.1 Выберите необходимое количество здоровой рыбы и содержите ее в подходящих условиях (например, как указано в приложении 5) в течение, по крайней мере, двух недель до намеченного нереста. Рыбе нужно дать отнереститься, по крайней мере, один раз перед использованием икры в тесте. Плотность посадки рыб в течение этого периода не должна превышать один грамм рыбы на литр. Регулярная подмена воды или использование системы фильтрации делает возможным более высокую плотность посадки. Температура в нерестовиках должна поддерживаться равной (25 ± 2) °С. Рыбу нужно держать на разнообразной диете, которая может состоять из, например, коммерческого сухого корма, живых, недавно выведенных, Artemia, хирономид, дафний, мучных червей (Enchytraeidae).

А.2.2 Две процедуры описывают ниже в общих чертах, как на практике получить здоровую оплодотворенную икру для теста:

- 8 самок и 16 самцов помещаются в пятидесяти литровый аквариум с разбавляющей водой, экранированный от прямого света и оставляют в максимальном покое, по крайней мере, 48 часов. Нерестовый лоток помещают на дно аквариума за день перед началом нереста. Нерестовая тарелка представляет собой рамку (плексиглассовую или из другого подходящего материала) от 5 до 7 см высотой с присоединенной сверху сеткой с ячейками от 2 до 5 мм, и от 10 до 30 мкм тонкой сеткой в основании. Многие «нерестовые кусты», состоят из некрученой нейлоновой веревки, присоединённой к крупноячеистой сети. После того, как рыбы выдерживаются в темноте в течение 12 часов, включают слабый свет, который инициирует нерест. Спустя два – четыре часа после нереста, нерестовая тарелка удаляется и икра собирается. Нерестовая тарелка предотвращает поедание икры рыбами и в то же время облегчает сбор. Группа рыбы должна отнереститься, по крайней мере, один раз перед тем, как использовать икру в тесте.

- Пять – десять самцов и самок отсаживают отдельно, по крайней мере, за две недели до намеченного нереста. Через пять – десять дней брюшные полости самок увеличатся и станут заметны половые бугорки. У самцов бугорки будут незаметны. Нерест выполняется в нерестовые лотки (как описано выше). Аквариум заполняют водой разбавления, так, чтобы высота воды была выше нерестовой тарелки на пять – десять сантиметров. Одну самку и двух самцов отсаживают в нерестовый аквариум за день перед нерестом. Температуру воды постепенно увеличивают на градус выше температуры содержания. Выключают свет и аквариум оставляют в максимальном покое. Утром включают слабый свет, который инициирует нерест. Через два – четыре часа рыб удаляют, а икру собирают. Если необходимы большие количества икры, чем может дать одна самка, можно установить параллельно несколько нерестовых аквариумов. Делают запись успешного воспроизводства индивидуальных самок перед тестом (размер нереста и качество), самых плодовитых самок отбирают для размножения.

А.2.3 Икру переносят в тестовый сосуд с помощью стеклянной трубки (внутренний диаметр не меньше 4 мм). Количество воды, захваченной с икринкой при переносе должно быть, как можно меньше. Икра тяжелее воды и выливается из трубки. Следует соблюдать осторожность при переносе, чтобы предотвратить контакт икринки (и личинки) с воздухом. Должно быть выполнено микроскопическое исследование выборки(ок), чтобы гарантировать отсутствие неравномерности в первых стадиях развития. Дезинфекция икры недопустима.

А.2.4 Смертность икры максимальна в течение первых 24 часов после оплодотворения. В течение этого периода часто наблюдают смертность от 5 % до 40 %. Икра погибает в результате неудачного оплодотворения или отсутствия развития. Качество загрузки икры зависит от самки, поскольку некоторые самки последовательно производят икру хорошего качества, а другие нет. Также уровень развития и уровень вылупления изменяется от одного нереста к другому. Выживаемость успешно оплодотворенной икры и личинок с желточным мешком обычно выше 90 процентов. При 25 ºС личинки вылупляются через пять дней после оплодотворения, желточный мешок рассасывается приблизительно спустя тринадцать дней после оплодотворения.

А.2.5 Эмбриональное развитие было хорошо изучено Hisaoka и Battle [2]. Из–за прозрачности икринок и предличинок можно наблюдать развитие рыбы и наличие пороков развития. Приблизительно через четыре часа после нереста, неоплодотворенные яйца можно отличить от оплодотворенных [3]. Для этого икру и личинки помещают в небольшой сосуд и изучают под микроскопом.

А.2.6 Условия тестирования, которые относятся к ювенильной стадии, перечислены в приложении Б. Оптимальные значения pH и жесткости воды разбавления составляют 7,8 и 250 мг $CaCO_3$/л соответственно.

А.3 Вычисления и статистика

Предлагается двухступенчатый подход. Во-первых, данные по смертности, аномалии развития и время вылупления анализируют статистически. Тогда выявленные концентрации, которые не оказывают никаких неблагоприятных эффектов на любой из этих трех параметров и длина тела оценивают статистически. Этот подход желателен, так как ядовитое вещество может выборочно убить мальков, задержать вылупление и стимулировать серьезные пороки развития, таким образом приводя к искажениям параметра длины. Кроме того, примерно такое же количество рыбы измеряется перед обработкой, гарантируя достоверность полученных статистических данных.

А.4 Определение LC50 И EC50

Вычисляют процент выживших икринок и личинок и корректируют смертность в контрольных группах в соответствии с уравнением Эбботта (Abbott) [4]:

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \cdot 100 \right), \qquad \text{(А.1)}$$

где P – откорректированное выживание, %;

P' – выживание, наблюдаемое на тестируемой концентрации, %;

C – выживание в контроле, %.

Если возможно, LC50 определяют подходящим методом в конце испытания.

Если в статистическую величину EC50 включают морфологические расстройства, желательно, использовать руководство Stephan [5].

А.5 Оценка LOEC И NOEC

Целью теста на эмбрионах и личинках является установить наименьшую действующую концентрацию, то есть определить LOEC. Поэтому должны быть использованы множественные процедуры сравнения [6],[7],[8],[9],[10].

Приложение Б
(обязательное)
Условия тестирования, продолжительность и условия выживаемости для рекомендуемых видов

Таблица Б.1

Виды	Температура, °С	Соленость %	Фотопериод	Продолжительность теста, дней		Типичная продолжительность теста	Выживаемость в контроле, мин. %	
				Эмбрион	Предличинка		Скорость вылупления	После вылупления
Пресноводные								
Данио *Brachydanio rerio*	25 ± 1		12 - 16	3 - 5	8 - 10	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до пяти дней после вылупления (8 – 10 дней)	80	90
Радужная форель *Oncorhynchus mykiss*	10 ± 1 [1)] 12 ± 1 [2)]		0 [a)]	30 - 35	25 - 30	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до двадцати дней после вылупления (50 – 55 дней)	66	70

Окончание таблицы Б.1

Виды	Температура, °С	Соленость ‰	Фотопериод	Продолжительность теста, дней		Типичная продолжительность теста	Выживаемость в контроле, мин. %	
				Эмбрион	Предличинка		Скорость вылупления	После вылупления
Японская медака *Oryzias latipes*	24 ± 1 [1)] 23 ± 2 [2)]		12 - 16	8 - 11	4 - 8	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до пяти дней после вылупления (13 – 16 дней)	80	80
Тупоголовый гальян *Pimephales promelas*	25 ± 2		16	4 - 5	5	Как можно раньше, сразу после оплодот-ворения (ранняя ста-дия гаструлы) до пяти дней после вылупления (8 – 10 дней)	60	70

1) для эмбрионов;
2) для личинок;
а) затемнение для личинок и эмбрионов на протяжении 1 недели после вылупления, кроме случаев проверки. Затем приглушенное освещение на протяжении всего теста

Приложение В
(обязательное)
Условия тестирования, продолжительность и условия выживаемости для других пригодных видов

Таблица В.1

Виды	Температура, ^{0}С	Соленость ‰	Фотопе-риод	Продолжительность тест (дней)		Типичная продолжительность теста	Выживаемость в контроле, мин. %	
				Эмбрион	Предличинка		Скорость вылупления	После вылупления
Пресноводные								
Золотой карась *Carassius auratus*	24 ± 1			3 - 4	> 4	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до четвёртого дня после вылупления (7 дней)	-	80
Солнечник *Leopomis macrochirus*	21 ± 1		16	3	> 4	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до четвертого дня после вылупления (7 дней)	-	75
Морские								
Менидия *Menidia peninsulae*	22 - 25	15 - 22	12	1.5	10	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до пятого дня после вылупления (6 – 7 дней)	80	60
Сельдь *Clupea harengus*	10 ± 1	8 - 15	12	20 - 25	3 - 5	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до третьего дня после вылупления (23 – 27 дней)	60	80
Треска Gadus morhua	5 ± 1	5 - 30	12	14 - 16	3 - 5	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до третьего дня после вылупления (18 дней)	60	80
Карпозубик Cyprinodon variegatus	25 ± 2	15 - 30	12	-	-	Как можно раньше, сразу после оплодотворения (ранняя стадия гаструлы) до 4/7 дней после вылупления (28 дней)	> 75	80

Библиография

[1] KristensenP. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final Report to the Commission of the European Communities, pp. 60. June 1990.

[2] ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

[3] Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Re-search Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

[4] Brungs W.A. and Jones B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Pro-tocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

[5] Laale H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fi-sheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol., 10, 121-173.

[6] Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting of Eggs of the Zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan). Copeia, 4, 328-330.

[7] Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (Brachydanio rerio) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, 61-71.

[8] Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, 807-821.

[9] Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). Aquatic Toxicology, 9, 129-145.

[10] Kirchen R.V. and W.R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

[11] Kirchen R.V. and W.R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Devel-opment. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

[12] Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

[13] Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biome-trics, 20, 482-491.

[14] Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

[15] Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermens J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, 321-334.

[16] Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, pp 81.

[17] Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Em-bryos and Larvae of Zebrafish, Brachydanio rerio. Arch. of Environmental Contamina-tion and Toxicology, 21, 126-134.

[18] Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebra-fish (Danio rerio), a model system in developmental biology - an invitation to the com-parative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

[19] Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicolo-gy and Environmental Safety 32, 19-28 (1995).

[20] US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, December 1991, EPA, Duluth.

[21] US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, December 1991, EPA, Duluth.

[22] De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Variability in the performance of the seven-day Fat-head minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10:1189-1203.

[23] Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology. Blackwells, Oxford. Vol 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity Tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

[24] Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Junk Publ., Dordrecht. 280 pp.

[25] Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development. In: W.S. Hoar and D.J. Randall, Eds., Fish Physiology, vol XIA, Academic Press, pp. 1-58.
[26] Laale H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fi-sheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol., 10, 121-173.
[27] Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Developmental Stages of the Ze-brafish, Branchydanio rerio (Hamilton-Buchanan). J. Morph., 102, 311.
[28] Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachyda-nio rerio, Ham.-Buch.). Journal of Applied Ichthyology, 2,173-181.
[29] Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Cam-bridge, Great Britain, pp. 1-333.
[30] Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.
[31] Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
[32] Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biome-trics, 20, 482-491.
[33] Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Sev-eral Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, 103-117.
[34] Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics, 28, 519-531.
[35] Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
[36] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test, July 1992
[37] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, July 1992
[38] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, Test No. 301: Ready Biodegradability, July 1992

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, водная среда, метод испытаний

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,33. Тираж 31 экз. Зак. 1320.

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