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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32536— 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение острой токсичности для дафний

(OECD, Test №452:2008, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»);

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 784-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32536–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test No. 202:1992 Daphnia sp. Acute Immobilisation Test (Дафнии. Тест по оценке острой токсичности).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «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 (gost.ru)

© 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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение острой токсичности для дафний

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

Дата введения — 2014—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения острой токсичности для дафний (Daphnia) при воздействии химических веществ в течение 48 ч.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями:

2.1 полуэффективная концентрация (EC_{50}) : Концентрация исследуемого вещества, которая приводит к угнетению подвижности 50% дафний в течение установленного периода воздействия.

Примечание – Если используется другое определение, то необходимо привести его в отчете о проведении теста со ссылкой на источник информации.

2.1 угнетение подвижности (иммобилизация): Особи дафний, неспособные плавать в течение 15 сек после легкого встряхивания тестового сосуда, считаются неподвижными (иммобилизованными), даже если они способны плавать с помощью сяжков.

3 Принцип теста

Молодые рачки дафний в возрасте менее 24 ч в начале теста подвергаются воздействию исследуемого вещества в определенном диапазоне концентраций в течение 48 ч. Иммобилизация регистрируется на 24 и 48-й ч теста и сравнивается с контрольными величинами. Проводится анализ результатов в целях вычисления EC_{50} для 48 ч. Определение EC_{50} для 24 ч является факультативным.

4 Информация об исследуемом веществе

Информация об исследуемом веществе должна содержать сведения о растворимости исследуемого вещества в воде и давлении паров. Количественное определение исследуемого вещества в тестируемых растворах необходимо проводить с помощью достоверного аналитического метода с известной точностью и пределом обнаружения.

Полезной также может быть информация о:

структурной формуле исследуемого вещества;

- чистоте исследуемого вещества;
- стабильности исследуемого вещества в воде и на свету;
- коэффициенте распределения н-октанол/вода P_{ow};
- результатах испытания на потенциальную способность к биоразложению (ГОСТ 32295).

Издание официальное

5 Стандартные вещества

Исследование стандартного вещества на EC_{50} может проводиться в целях проверки правильности условий проведения теста. В качестве стандартных веществ рекомендуется использовать вещества, протестированные в международных лабораторных тестах (ISO 6341, EC_{50} (24 ч) для дихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) составляет 0,6 – 2,1 мг/л). Тесты со стандартными веществами должны проводиться каждый месяц или как минимум два раза в год.

6 Достоверность теста

Устанавливаются следующие критерии достоверности теста:

- в контрольном тесте, в том числе в контрольном тесте с растворителем, не более 10% дафний должны быть иммобилизованы;
- концентрация растворенного кислорода по окончании теста должна быть ≥ 3 мг/л в контрольном и тестовых образцах.

Примечание – Для первого критерия не более 10% контрольных особей дафний должны демонстрировать иммобилизацию или другие признаки поражения или стресса, например, обесцвечивание или аномальное поведение, такое, как нахождение на поверхности воды.

7 Оборудование

7.1 При тестировании используются сосуды и другое оборудование, изготовленные из стекла или иного химически инертного материала. В качестве тестовых сосудов обычно используются стеклянные пробирки или мензурки; перед каждым использованием их необходимо промывать обычным лабораторным способом. Тестовые сосуды должны быть укупорены для того, чтобы уменьшить потерю воды из-за испарения и избежать попадания пыли в тестируемые растворы. Исследования летучих веществ должны проводиться в заполненных герметичных сосудах, достаточно больших для того, чтобы предотвратить чрезмерное снижение содержания кислорода (п. 6 и 11.1.6.1).

7.2 Помимо этого может использоваться:

- прибор для измерения содержания кислорода, оксиметр (с микроэлектродом или другим подходящим оборудованием для измерения растворенного кислорода в маленьких объемах);
- pH-метр;
- оборудование для контроля за температурой;
- оборудование для определения общего органического углерода (ООУ);
- оборудование для определения химического потребления кислорода (ХПК);
- оборудование для определения жесткости воды.

8 Тестовые организмы

Наиболее предпочтительным видом является *Daphnia magna Straus*, но другие подходящие виды *Daphnia* также могут использоваться в данном тесте (например *Daphnia pulex*). В начале теста дафнии должны быть в возрасте не менее 24 ч, и для снижения изменчивости рекомендуется использовать дафний не из первого потомства. Дафнии должны быть получены от здоровой популяции без симптомов стресса, таких как высокая смертность, присутствие мужских особей и эфиппий, присутствие бесцветных особей и пр. Все организмы, используемые в отдельном тесте, получают из культур, основанных на одной и той же популяции дафний. Основная популяция должна культивироваться в условиях (освещение, температура, среда), близких к условиям проведения теста. Если питательная среда, которая будет использоваться для дафний в тесте, отличается от среды, используемой для обычного культивирования дафний, то дафний необходимо подвергнуть предварительной акклиматизации. Для этого дафний содержат в воде, используемой для проведения теста, при температуре теста в течение как минимум 48 ч до начала теста.

9 Вода

9.1 Природная вода (поверхностные или грунтовые воды), модифицированная вода или дехлорированная водопроводная вода считаются приемлемыми для содержания дафний, если дафнии выживают в такой воде во время культивирования, акклиматизации и теста без каких-либо признаков

стресса. Химические характеристики воды, приемлемой для проведения теста, приведены в приложении А. Модифицированная вода может быть получена путем растворения определенного количества реагентов известной аналитической чистоты в дистиллированной или деионизированной воде. Примеры состава модифицированной воды приведены в приложении Б. Необходимо отметить, что среды, содержащие известные комплексообразующие вещества такие, как М4 и М7 в приложении Б, не должны использоваться для исследования веществ, содержащих металлы. Значение pH воды должно находиться в диапазоне от 6 до 9. Для Daphnia magna рекомендуется жесткость воды от 140 до 250 мг/л (в пересчете на CaCO3), более низкие значения жесткости могут использоваться для других видов Daphnia. Для того чтобы концентрация растворенного кислорода достигла насыщения, непосредственно перед использованием в тесте можно проводить аэрацию воды.

9.2 Если используется природная вода, то параметры качества должны измеряться как минимум два раза в год или каждый раз в случае возможного изменения данных параметров (п. 9.1 и приложение А). Также необходимо проводить анализ содержания тяжелых металлов (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Если используется дехлорированная водопроводная вода, то необходимо проводить ежедневный анализ содержания хлора. Если используется поверхностная или грунтовая вода, то необходимо измерять ее электрическую проводимость и содержание в ней общего органического углерода (ООУ) или химическое потребления кислорода (ХПК).

10 Тестируемые растворы

10.1 Тестируемые растворы выбранных концентраций обычно готовятся путем разбавления основного раствора. Основные растворы готовят путем растворения исследуемых веществ в воде (п. 9). В некоторых случаях для подготовки раствора с нужной концентрацией необходимо использовать солюбилизатор (растворитель, эмульгатор или диспергатор). Если это возможно, то использования солюбилизатора следует избегать. В любом случае содержание исследуемого вещества в тестируемом растворе не должно превышать предела растворимости в воде.

10.2 Тест необходимо проводить без регулирования pH. Если pH не сохраняется в диапазоне 6 – 9, то может быть проведен второй тест с приведением pH основного раствора к pH используемой воды перед добавлением исследуемого вещества. Регулирование pH должно проводиться таким образом, чтобы концентрация основного раствора не менялась в значительной степени и не происходило химической реакции или осаждения исследуемого вещества. Наиболее приемлемым реагентами для регулирования pH основного раствора исследуемого вещества является соляная кислота HCl и NaOH.

11 Процедура тестирования

11.1 Условия воздействия

11.1.1 Тестовые и контрольные группы

11.1.1.1 Тестовые сосуды заполняют соответствующими объемами воды и растворами исследуемых веществ. Соотношение объемов воздуха и воды в сосуде должно быть идентичным для тестовых и контрольных групп. В сосуды помещают дафний. Как минимум 20 особей дафний, разделенных на четыре группы, по пять особей в каждой, используются для каждой тестовой концентрации и в контрольном тесте. Для каждой особи дафний необходимо обеспечить как минимум по 2 мл тестируемого раствора (т.е. 10 мл для 5 дафний в одном тестовом сосуде). Тест проводят с полустатическим обновлением или в проточной системе с непостоянной концентрацией исследуемого вещества.

11.1.1.2 Помимо основной серии тестов необходимо проводить один контрольный тест с водой и при необходимости один контрольный тест с солюбилизатором с используемой в основном тесте концентрацией.

11.1.2 Тест по подбору диапазона концентраций

11.1.2.1 Тест по подбору диапазона концентраций исследуемого вещества может проводиться для определения диапазона для значимого исследования в том случае, если информация о токсичности исследуемого вещества недоступна. С этой целью дафнии подвергаются воздействию различных концентраций исследуемого вещества. Пять дафний необходимо подвергать воздействию каждой используемой концентрации в течение 48 ч, параллельные исследования не проводятся. Период экспозиции можно сократить (например до 24 ч), если данные, необходимые для определения диапазона значимых концентраций, могут быть получены в более короткие сроки.

11.1.2.2 Тест проводят как минимум с пятью различными концентрациями. Концентрации должны составлять геометрическую прогрессию со знаменателем, не превышающим 2,2. При использовании менее пяти концентраций в отчете о проведении теста необходимо привести обоснование. Наибольшая тестовая концентрация должна приводить к 100%-ной иммобилизации, а наименьшая – не оказывать никакого заметного воздействия.

11.1.3 Условия проведения теста

11.1.3.1 Температура поддерживается в диапазоне от 18 до 22^{0}С, в каждом отдельном тесте температура должна быть постоянной, допускается отклонение ±1°С. Рекомендуемая периодичность освещения: 16 ч – свет, 8 ч – темнота. Допускается проведение теста в полной темноте, в частности при исследовании веществ, нестабильных на свету.

11.1.3.2 В течение теста проводят аэрацию тестовых сосудов. Проведение теста не требует регулировки pH. Во время теста дафний нельзя кормить.

11.1.4 Продолжительность теста

Продолжительность теста составляет 48 ч.

11.1.5 Наблюдения

11.1.5.1 Каждый тестовый сосуд проверяют на присутствие иммобилизованных дафний после 24 и 48 ч с момента начала теста. В дополнение к угнетению подвижности в отчет о проведении теста необходимо включать сообщение о любых аномальных проявлениях или поведении дафний.

11.1.6 Аналитические измерения

11.1.6.1 Растворенный кислород и pH измеряют в начале и конце теста в контрольной группе и тестовой группе с наибольшей концентрацией исследуемого вещества. Концентрация растворенного кислорода в контрольных группах должна находиться в соответствии с критериями достоверности (п. 6). Величина pH в общем случае не должна изменяться более чем на 1,5 единицы в любом тесте. В течение всего теста непрерывно регистрируют температуру в контрольном сосуде или температуру окружающего воздуха. Если это невозможно, то необходимо как минимум измерить температуру в контрольной группе или температуру окружающего воздуха в начале и конце теста.

11.1.6.2 Концентрация исследуемого вещества должна определяться в начале и конце теста как минимум для наибольшей и наименьшей тестовых концентраций. Расчет результатов рекомендуется проводить на основании измеренных концентраций. Но если существует подтверждение того, что концентрации исследуемого вещества могут удовлетворительно поддерживаться в пределах ±20% от номинального или измеренного начального значения в течение теста, то результаты могут быть основаны на номинальном или измеренном начальном значении.

12 Пороговый тест

12.1 Используя процедуры, описанные в настоящем стандарте, пороговый тест может быть выполнен при концентрации исследуемого вещества 100 мг/л или при концентрации, равной пределу растворимости исследуемого вещества в тестовой среде (при концентрации, наименьшей из данных), для подтверждения того, что EC50 больше, чем данная концентрация. Для проведения порогового теста используются 20 дафний (желательно разделенных на четыре группы по пять особей), а также 20 дафний для контроля. Если процент иммобилизованных особей дафний превышает 10% в конце теста, то необходимо провести полное исследование. Любое наблюдаемое аномальное поведение должно быть зарегистрировано.

13 Данные и отчет о проведении теста

13.1 Данные

13.1.1 Данные теста представляют в виде таблицы. Для каждой тестовой и контрольной группы в таблице приводят данные об используемом количестве дафний и иммобилизации для каждого наблюдения. Также необходимо графически представить зависимость процента иммобилизованных особей дафний от тестовой концентрации исследуемого вещества. Анализ данных проводится подходящим статистическим методом (например с помощью пробит-преобразования), вычисляют наклон кривых и EC_{50} с 95%-ным доверительным интервалом.

13.1.2 В случае если стандартные методы вычисления EC_{50} не могут использоваться для полученных данных, наибольшая концентрация, не вызывающая иммобилизации, и наименьшая концен-

трация, приводящая к 100%-ому угнетению подвижности, должны использоваться для приближенной оценки EC_{50} (предполагается, что EC_{50} является средним геометрическим двух данных величин).

13.2 Отчет о проведении теста

13.2.1 Отчет о проведении теста должен содержать следующую информацию об:

- исследуемом веществе:
- агрегатное состояние и соответствующие физико-химические свойства;
- идентификационные данные, включая чистоту.
- тестовых видах:
- источник и вид дафний, поставщик (если он известен) и используемые условия культивирования (включая источник, вид и количество пищи, частоту кормления).
- условиях проведения теста:
- характеристики тестовых сосудов: тип и объем сосудов, объем тестируемых растворов, количество дафний в тестовом сосуде, число тестовых сосудов (параллельных проб) для одной концентрации;
- описание приготовления основных и тестируемых растворов, включая использование любого растворителя, используемые концентрации;
- характеристики воды: источник и характеристики качества воды (pH, жесткость, соотношение Ca / Mg, соотношение Na / K, щелочность, электрическая проводимость); состав модифицированной воды, если она используется;
- температура, интенсивность и периодичность освещения, содержание растворенного кислорода, pH и пр.

Результаты теста:

- количество и процент дафний, для которых наблюдались угнетение подвижности или любые негативные проявления, включая аномальное поведение, в контрольных и каждой тестовой группе для каждого периода наблюдения и описание природы наблюдаемых проявлений;
- результаты и дата проведения теста со стандартными веществами, если такие данные доступны;
- номинальные тестовые концентрации и результаты всех исследований на определение концентрации исследуемого вещества в тестовом сосуде; воспроизводимость и предел обнаружения аналитического метода;
- все данные об измерениях температуры, pH и растворенного кислорода;
- EC50 (48 ч) для иммобилизации с доверительными интервалами и методы, используемые для их расчета; наклоны кривых концентрация –отклик и их стандартное отклонение, статистические методы, используемые для расчета EC50 (соответствующие данные об иммобилизации для 24 ч должны также быть приведены, если они измерялись);
- обоснование любого отклонения от тестовой процедуры, изложенной в настоящем стандарте, и сообщение о влиянии отклонений на результаты теста.

Приложение А
(справочное)

Некоторые химические характеристики воды, приемлемой для проведения теста

Т а б л и ц а А.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
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

Приложение Б
(справочное)

Примеры модифицированной воды и питательных сред для использования в тесте

Б.1 Примеры модифицированной воды для использования в тесте приведены в таблице Б.1

Таблица Б.1 – Вода для теста ISO (I)

Основной раствор (одно вещество)		Для приготовления модифицированной воды к 1 л дистиллированной или деионизированной воды добавляют следующие объемы основных растворов
вещество	количество для добавления к 1 л воды	
Кальция хлорид CaCl2×2H2O	11,76 г	25 мл
Магния сульфат MgSO4×7H2O	4,93 г	25 мл
Натрия гидрокарбонат NaHCO3	2,59 г	25 мл
Калия хлорид KCl	0,23 г	25 мл

Б.2 Искусственные питательные среды Elendt M4 и M7

Б.2.1 Адаптация к средам Elendt M4 и M7

В некоторых случаях наблюдаются трудности при пересадке дафний непосредственно в питательные среды M4 и M7. Данные трудности можно преодолеть путем постепенной акклиматизации, то есть постепенной пересадкой дафний от собственной среды к 30%-ой, 60%-ой и затем к 100%-ой Elendt. Периоды акклиматизации могут составлять более 1 мес.

Б.2.2 Приготовление

Микроэлементы

Основные растворы (I) отдельных микроэлементов сначала готовятся в воде подходящей чистоты, например, дистиллированной, деионизированной или очищенной обратным осмосом. Из данных основных растворов (I) готовится второй единственный основной раствор (II), который содержит все микроэлементы (комбинированный раствор) (пример приведен в таблице Б.2).

Таблица Б.2 – Приготовление основного раствора микроэлементов

Основные растворы (I) (одно вещество)	Количество вещества для добавления к воде (мг/л)	Концентрация (по отношению к среде M4)	Для приготовления комбинированного основного раствора (II) добавляют следующее количество основного раствора (I) к воде (мл/л)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-кратная	1,0	0,25
$MgCl_2×4H_2O$	7 210	20 000-кратная	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-кратная	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-кратная	1,0	0,25
$SrCl_2×6H_2O$	3 040	20 000-кратная	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-кратная	1,0	0,25
$Na_2MoO_4×2H_2O$	1 230	20 000-кратная	1,0	0,25
$CuCl_2×2H_2O$	335	20 000-кратная	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-кратная	1,0	1,0
$CoCl_2×6H_2O$	200	20 000-кратная	1,0	1,0

Окончание таблицы Б.2

KI	65	20 000-кратная	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43.8	20 000-кратная	1,0	1,0
NH_4VO_3	11.5	20 000-кратная	1,0	1,0
Na_2ЭДТА×$2H_2O$	5 000	2 000-кратная	-	-
$FeSO_4$×$7H_2O$	1991	2 000-кратная	-	-
Растворы Na_2ЭДТА и $FeSO_4$ готовятся отдельно, сливаются вместе и немедленно помещаются в автоклав, вследствие чего получается следующий раствор:				
21 Fe-ЭДТА		1 000-кратная	20.0	5.0

Среды М4 и М7 готовят с использованием основного раствора (II), макроэлементов и витаминов в соответствии с таблицей Б.3.

Т а б л и ц а Б.3 – Питательные среды М4 и М7

	Количество компонента для добавления к воде (мг/л)	Концентрации (для среды М4)	Количество основного раствора (II) для приготовления среды (мл/л)	
			М4	М7
Основной раствор (II) (следовые элементы)		20-кратная	50	50
Основной раствор макроэлементов (одно вещество)				
$CaCl_2$×$2H_2O$	293 800	1 000-кратная	1,0	1,0
$MgSO_4$×$7H_2O$	246 600	2 000-кратная	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-кратная	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-кратная	1,0	1,0
Na_2SiO_3×$9H_2O$	50 000	5 000-кратная	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-кратная	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-кратная	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-кратная	0,1	0,1
Объединенный витаминный раствор	-	10 000-кратная	0,1	0,1
Комбинированный витаминный раствор готовят путем добавления 3 витаминов к 1 л воды в следующих количествах:				
Тиамина гидрохлорид	750	10 000-кратная		
Цианокобаламин (B_{12})	10	10 000-кратная		
Биотин	7,5	10 000-кратная		

Комбинированный витаминный раствор хранится в замороженном виде в малых порциях. Витамины добавляют к питательной среде непосредственно перед использованием.

Для того, чтобы предотвратить осаждение солей при приготовлении питательных сред, добавляют порции основного раствора к примерно 500 – 800 мл деионизированной воды и затем доводят до метки 1 л.

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50 Т58

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, водная среда, метод испытаний, оценка острой токсичности, дафнии

Подписано в печать 01.09.2014. Формат 60x841/8.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 36 экз. Зак. 3245.

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