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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
32473—
2013**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение острой токсичности для рыб

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 ноября 2013 г. № 61-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 783-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32473—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test No. 203:1992 «Определение острой токсичности для рыб» («Fish, Acute Toxicity Test», IDT).

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

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2019 г.

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

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

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

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

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

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Определение острой токсичности для рыб

Methods for testing of chemicals of environmental hazard acute toxicity test for fish

Дата введения — 2014—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт является руководством по определению острой токсичности для рыб.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **статический тест** (static test): Тест, проводимый без обновления тестируемого раствора.

2.2 **полустатический тест** (semi-static test): Тест, проводимый с периодическим порционным обновлением тестируемого раствора после длительных периодов теста (например, 24 ч).

2.3 **проточный тест** (flow-troughn test): Тест, проводимый с автоматическим и постоянным обновлением тестируемого раствора.

2.4 **LC_{50}:** В настоящем стандарте определяется средняя летальная концентрация, т. е. концентрация исследуемого вещества в воде, которая в течение определенного периода воздействия приводит к гибели 50 % особей рыб, составляющих тестовую группу.

3 Принцип теста

Рыбы подвергаются воздействию исследуемого вещества в течение 96 ч. Смертность регистрируется на 24-й, 48-й, 72-й и 96-й ч, и определяются концентрации исследуемого вещества, вызывающие гибель 50 % особей рыб, составляющих тестовую группу (LC_{50}).

4 Информация об исследуемом веществе

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

4.2 Полезной может быть также информация:

- о структурной формуле исследуемого вещества;
- чистоте исследуемого вещества;
- стабильности в воде и на свету;
- константе диссоциации pK_a;
- коэффициенте распределения н-октанол/вода K_{ow};
- давлении паров исследуемого вещества;
- результатах испытания на потенциальную способность к биоразложению.

Растворимость и давление паров исследуемого вещества могут быть использованы для расчета константы Генри, которая показывает, могут ли произойти потери исследуемого вещества.

Издание официальное

5 Достоверность теста

Устанавливаются следующие критерии достоверности теста:

- смертность в контрольных группах не превышает 10 % (т. е. гибель одной особи при использовании < 10 особей рыб в контрольной группе) по окончании теста;
- на протяжении всего теста поддерживаются постоянные условия и используются полустатические или проточные процедуры;
- концентрация растворенного кислорода должна составлять по крайней мере 60 % от величины насыщения воздуха при заданных условиях на протяжении всего теста;
- на протяжении всего теста концентрация исследуемого вещества, для которой проводится тестирование, должна поддерживаться на оптимальном уровне, составляющем не менее 80 % от номинальной концентрации. Если отклонение от номинальной концентрации составляет более 20 %, то результаты теста должны быть основаны на измеренных величинах концентрации.

6 Описание метода

6.1 Оборудование

При тестировании используется лабораторное оборудование стандартного назначения, а также:

- оксиметр;
- оборудование для определения жесткости воды;
- оборудование для контроля за температурой;
- сосуды, изготовленные из химически инертного материала, различной вместимости в зависимости от рекомендуемой загрузки.

6.2 Выбор видов рыб

6.2.1 Тестирование проводят для одного или нескольких видов рыб на усмотрение лаборатории. Предполагается, что виды рыб выбираются на основе таких важных практических критериев, как их доступность в течение всего года, простота содержания и обращения, пригодность для тестирования, а также экономических, биологических или экологических факторов. Особи рыб должны быть здоровыми, без каких-либо видимых патологий.

6.2.2 Примеры видов рыб, рекомендуемых для тестирования, приведены в таблице 1. Указанные виды легко культивируются в лаборатории в условиях, исключающих распространение заболеваний, в том числе паразитарных, и доступны в течение всего года. Если используются другие виды, удовлетворяющие вышеперечисленным критериям, то тест должен быть адаптирован таким образом, чтобы обеспечивались подходящие условия для тестирования.

Таблица 1 — Рекомендуемые для тестирования виды рыб

Рекомендуемый вид	Рекомендуемый диапазон температуры (°С)	Рекомендуемая полная длина рыбы, см*
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Данио рерио	21—25	2,0 ± 1,0
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Гольян бычеголовый	21—25	2,0 ± 1,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidac) (Linnaeus) Карп	20—24	3,0 ± 1,0
Oryzias latipes (Teleostei, Cyprinodontidae) (Temminck and Schlegel) Медка японская	21—25	2,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Солнечник синежаберный	21—25	2,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poccilиidae) (Peters) Гуппи	21—25	2,0 ± 1,0

Окончание таблицы 1

Рекомендуемый вид	Рекомендуемый диапазон температуры (°С)	Рекомендуемая полная длина рыбы, см*
Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Форель радужная	13—17	5,0 ± 1,0
* Если используются особи рыб с размерами, отличными от рекомендуемых, то необходимо указать на это в отчете о проведении теста и привести соответствующее обоснование.		

6.3 Содержание рыб

6.3.1 Все особи рыб должны быть получены и должны содержаться в лаборатории в течение как минимум 12 дней до их использования в тестировании. Рыб необходимо содержать в воде качества, аналогичного качеству воды, которая будет использоваться при тестировании как минимум в течение 7 дней непосредственно перед тестированием и при следующих условиях:

- освещенность: от 12 до 16 ч светового периода в день;
- температура: подходящая для используемого вида (таблица 1);
- концентрация кислорода: как минимум 80 % от величины насыщения воздуха;
- питание: три раза в неделю или ежедневно, кормление прекращают за 24 ч до начала тестирования.

6.3.2 По прошествии 48 ч после начала периода акклиматизации регистрируется смертность и устанавливаются следующие критерии:

- гибель более 10 % особей рыб в течение 7 дней; отказ от всей партии;
- гибель от 5 до 10 % особей рыб: акклиматизация продолжается еще в течение 7 дополнительных дней;
- гибель менее 5 % особей рыб: принятие всей партии.

6.4 Вода

В тестировании используют предпочтительно природную воду или модифицированную воду (приложение А), также может использоваться дехлорированная питьевая вода. Предпочтительной является вода с общей жесткостью от 10 до 250 мг $CaCO_3$ на 1 л, pH 6,0—8,5. Реагенты, используемые для приготовления модифицированной воды, должны быть аналитической чистоты, дистиллированная или деионизированная вода должна обладать электрической проводимостью < 10 мкСм/м.

6.5 Тестируемые растворы

6.5.1 Тестируемые растворы исследуемых веществ с необходимой концентрацией готовят путем разбавления основных растворов исследуемых веществ. Основные растворы исследуемых веществ с низкой растворимостью в воде готовят ультразвуковым диспергированием или другими физическими методами. При необходимости для приготовления основных растворов может использоваться солюбилизатор (растворитель, эмульгатор или диспергатор), обладающий низкой токсичностью для рыб. При использовании солюбилизатора необходимо проводить тестирование дополнительной контрольной группы, которая подвергается воздействию солюбилизатора в наибольшей концентрации, используемой для приготовления тестируемого раствора исследуемого вещества. Концентрация солюбилизатора в тестируемом растворе не должна превышать 100 мг/л.

6.5.2 Тестирование проводится без регулировки pH. Если существует вероятность изменения pH тестируемого раствора после добавления исследуемого вещества, необходимо провести тест повторно, приведя pH основного раствора исследуемого вещества к pH воды, используемой для приготовления тестируемого раствора, 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 приемлемыми реагентами для регулирования pH основного раствора исследуемого вещества являются соляная кислота HCl и NaOH.

6.6 Процедура тестирования

Условия воздействия:

- продолжительность: предпочтительно 96 ч;
- загрузка: для статических и полустатических условий рекомендуется максимальная загрузка 1,0 г рыбы на 1 л; в проточных системах возможна более плотная загрузка;

- освещенность: от 12 до 16 ч светового периода в день;
- температура: подходящая для используемого вида (таблица 1) и постоянная в диапазоне ±2°С;
- концентрация кислорода: не менее 60 % от величины насыщения воздуха при данных условиях. Аэрация может использоваться при условии, что это не приводит к значительным потерям исследуемого вещества;
- питание: нет;
- внешние факторы: следует избегать воздействия внешних факторов, которые могли бы привести к изменению поведения рыб.

6.7 Количество особей рыб

Во всех тестовых и контрольных группах необходимо использовать как минимум 7 особей рыб.

6.8 Тестируемые концентрации

Необходимо проводить исследование как минимум пяти концентраций, составляющих геометрическую прогрессию со знаменателем не более 2,2. Подходящий диапазон концентраций подбирается до начала основного теста на основании теста по определению диапазона концентраций.

6.9 Контрольные группы

В дополнение к серии основных тестов проводят одно тестирование с раствором, не содержащим исследуемое вещество, и при необходимости одно контрольное тестирование с солюбилизатором (растворителем, эмульгатором или диспергатором).

6.10 Наблюдения

Тестовые группы проверяют по крайней мере по прошествии 24, 48, 72 и 96 ч. Особь рыбы признается мертвой, если не наблюдается видимого движения (например, жаберного движения) и реакции на касание хвостового стебля. Смертность регистрируется, а умершие рыбы удаляются из тестируемого раствора. Желательно также проводить наблюдения через 3 и 6 ч после начала теста. Помимо смертности также необходимо регистрировать аномальное поведение (например, потерю равновесия, изменение способности плавать, изменение дыхательной функции, появление пигментации и пр.). Измерение pH, содержания растворенного кислорода и температуры проводят как минимум один раз в день.

6.11 Пороговый тест

С помощью процедур, представленных в настоящем стандарте, может быть проведен пороговый тест с концентрацией исследуемого вещества 100 мг/л для того, чтобы показать, что LC_{50} превышает данную концентрацию. Пороговый тест должен проводиться с использованием как минимум 7 рыб и 7 рыб в контрольной пробе. Согласно биномиальной теории в тесте с 10 рыбами с нулевой смертностью вероятность того, что LC_{50} больше 100 мг/л, составляет 99,9 %. В тесте с 7, 8 или 9 рыбами отсутствие смертности как минимум на 99 % подтверждает, что LC_{50} больше концентрации, используемой в пороговом тесте. Если в пороговом тесте наблюдается смертность, должно быть проведено полное тестирование. Любые сублетальные эффекты должны быть зарегистрированы.

7 Данные и отчет о проведении теста

7.1 Обработка результатов

7.1.1 Совокупный процент смертности для каждого периода воздействия (24, 48, 72 и 96 ч) изображается на графике зависимости смертности в процентах от логарифма тестируемой концентрации. Далее для расчета LC_{50} для соответствующего периода воздействия используются стандартные статистические процедуры. Доверительные интервалы ($p = 0,95$) для расчетных величин LC_{50} определяются с использованием стандартных статистических процедур.

7.1.2 Если для расчета величин LC_{50} полученных данных недостаточно, то самая высокая концентрация, не приводящая к гибели рыб, и самая низкая концентрация, приводящая к 100 %-ной смертности, должны использоваться для определения LC_{50} путем аппроксимации (за LC_{50} принимается среднее геометрическое данных концентраций).

7.2 Отчет о проведении теста

В отчет о проведении теста включается следующая информация об:

исследуемом веществе:

- агрегатное состояние и физико-химические свойства;
- данные о химической идентификации;

тестируемом виде рыб:

- научное наименование, штамм, размеры, поставщик, любая предварительная подготовка;

условиях проведения теста:

- характеристика процедуры тестирования (статический, полустатический или проточный тест, аэрация, загрузка);
- характеристика качества воды (pH, жесткость, температура);
- концентрация растворенного кислорода, pH и температура тестового раствора через 24-часовые интервалы (в полустатической системе pH необходимо измерять до и после обновления воды);
- метод приготовления основных и тестируемых растворов;
- исследуемые концентрации;
- концентрации исследуемого вещества в тестируемом растворе;
- количество особей рыб в каждом тестируемом растворе.

Результаты теста:

- максимальная концентрация, не вызывающая смертность в период теста;
- минимальная концентрация, приводящая к 100 %-ной смертности в течение всего периода теста;
- совокупная смертность при каждой концентрации в рекомендуемый период наблюдения;
- значения LC_{50} с 95 %-ным доверительным интервалом для каждого рекомендуемого периода наблюдения, если это возможно;
- график зависимости смертности от логарифма концентрации исследуемого вещества;
- статистические процедуры, используемые для определения значения LC_{50};
- смертность в контрольной группе;
- инциденты в ходе теста, которые могли бы повлиять на его результаты;
- аномальное поведение рыбы.

Обсуждение результатов.

Приложение А
(справочное)

Приготовление модифицированной воды

А.1 В соответствии с ИСО 6341 модифицированную воду готовят следующим образом [1]:

- раствор хлорида кальция: в деионизированной воде растворяют 11,76 г $CaCl_2 \times 2H_2O$, затем доводят до метки 1 л деионизированной водой;
- раствор хлорида магния: в деионизированной воде растворяют 4,93 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, затем доводят до метки 1 л деионизированной водой;
- раствор гидрокарбоната натрия: в деионизированной воде растворяют 2,59 г $NaHCO_3$, затем доводят до метки 1 л деионизированной водой;
- раствор хлорида калия: в деионизированной воде растворяют 0,23 г KCl, затем доводят до метки 1 л деионизированной водой.

А.2 Все реагенты должны быть аналитической чистоты.

А.3 Электрическая проводимость дистиллированной или деионизированной воды не должна превышать 10 мкСм/м.

А.4 Смешивают по 25 мл каждого раствора и доводят до метки 1 л деионизированной водой. Общее содержание ионов кальция и магния в данном растворе должно составлять 2,5 ммоль/л. Соотношение ионов Ca:Mg должно составлять 4:1, Na:K — 10:1. Кислотность раствора должна составлять 0,8 ммоль/л.

А.5 В начале теста проводят аэрацию воды для разбавления до полного насыщения кислородом, затем воду отстаивают в течение двух дней без дальнейшей аэрации перед использованием.

Библиография

[1] ISO 6341:1996* Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test (Качество воды. Определение подавления подвижности Daphnia Magna Straus (Cladocera, Crustacea). Тест на острую токсичность)

* Действует ISO 6341:2012.

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50

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

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.А. Ворониной*

Сдано в набор 05.04.2019. **Подписано в печать** 07.05.2019. **Формат** 60×84$^{1}/_{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,12.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

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

gost.e-ecolog.ru