
**Качество воды. Определение
подавления подвижности *Daphnia
magna Straus* (Cladocera, Crustacea).
Тест на острую токсичность**

*Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of
Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test*

iTeh STANDARDS ITL
(standards.itih.ai)

ISO 6341:2012

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 6341:2012(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами – членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просим информировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6341:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2012

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по адресу ниже или членом ISO в стране регистрации пребывания.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	2
4 Сущность метода	2
5 Окружающие условия для теста	3
6 Реактивы, испытываемые организмы и среды	3
7 Аппаратура и материалы	5
8 Обработка и подготовка проб	6
8.1 Особые меры предосторожности при пробоотборе, транспортировании, хранении и очистке воды, стоков и водных экстрактов для испытания	6
8.2 Приготовление растворов веществ, подлежащих испытаниям	7
9 Проведение испытания	8
9.1 Общие положения	8
9.2 Предварительное испытание	8
9.3 Определительное испытание	9
9.4 Проверка чувствительности дафний <i>Daphnia magna</i> и соответствия методу испытаний	9
9.5 Предельное испытание	9
10 Интерпретация и достоверность результатов	9
10.1 Оценка EC ₅₀	9
10.2 Критерии достоверности	10
11 Обработка результатов	10
12 Протокол испытания	10
Приложение А (информативное) Приготовление питательной среды Elendt M4	12
Приложение В (информативное) Пример графического определения подавления подвижности дафний <i>Daphnia magna</i> сточной водой или исходным раствором вещества в концентрации 1 000 мг/л	15
Приложение С (информативное) Общие рекомендации для выращивания дафний	18
Приложение D (информативное) Выращивание <i>Daphnia magna</i> для производства покоящихся яиц	19
Приложение E (информативное) Показатели прецизионности	21
Приложение F (информативное) Уровень разведения <i>D</i> — Приготовление серии разведений для определения LID	22
Библиография	24

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, то ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются в соответствии с правилами Директив ISO/IEC, Часть 2.

Основной задачей технических комитетов является подготовка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. Международная организация по стандартизации не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 6341 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитетом SC 5, *Биологические методы*.

Настоящее четвертое издание отменяет и заменяет третье издание (ISO 6341:1996) после технического пересмотра. Он также включил Техническую поправку ISO 6341:1996/Cor. 1:1998.

ISO 6341:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>

Введение

Настоящий международный стандарт устанавливает метод определения острой токсичности химических веществ, воды и сточных вод в отношении водяной блохи *Daphnia magna* Straus.

Оценивание вредных воздействий на качество воды в течение ряда лет включает выполнение биологических тестов. Рачки представляют интерес с точки зрения экотоксикологии, поскольку являются первичными потребителями и основным компонентом зоопланктона в водных экосистемах.

Тест, установленный в настоящем международном стандарте, включает определение иммобилизации водяной блохи *Daphnia magna* Straus после 24 –часового или 48 –часового воздействия (в зависимости от требования пользователей или органов государственной власти) на испытываемую пробу в условиях, установленных в настоящем международном стандарте.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6341:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>

Качество воды. Определение подавления подвижности *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Тест на острую токсичность

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Лица, использующие данный международный стандарт, должны быть знакомы с обычной лабораторной практикой. Настоящий международный стандарт не ставит целью решить все проблемы безопасности, связанные с ее использованием. Пользователь данного международного стандарта сам несет ответственность за разработку соответствующей техники безопасности и правил охраны здоровья, а также за обеспечение соответствия условиям всех национальных регламентов.

ВНИМАНИЕ! — Крайне важно, чтобы испытания по настоящему международному стандарту выполнялись соответствующим образом подготовленным персоналом.

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод определения острой токсичности в отношении *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

Этот метод применим к:

- химическим веществам, которые являются растворимыми в условиях испытания или могут поддерживаться в состоянии стабильной суспензии или дисперсии в условиях теста;
- промышленным или бытовым сточным водам;
- очищенным и неочищенным сточным водам;
- водным экстрактам и продуктам выщелачивания;
- пресной воде (поверхностным и грунтовыми водами);
- элюатам из пресноводных отложений;
- поровой воде пресноводных отложений.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные документы обязательны для применения данного документа. Для датированных ссылок применяется только указанное издание. Для недатированных ссылок применяется самое последнее издание указанного документа (включая все изменения).

ISO 5667-16:1998, *Качество воды. Отбор проб. Часть 16. Руководство по биотестированию проб*

ISO 5814, *Качество воды. Определение растворенного кислорода. Электрохимический метод с применением зонда*

ISO 10523, *Качество воды. Определение pH*

3 Термины и определения

В настоящем документе используются следующие термины и определения.

- 3.1**
партия контролей
control batch
ряд повторных растворов, включая контрольный раствор
[ISO 20665:2008,^[3] 3.3]
- 3.2**
контрольный раствор
control solution
испытательная среда без анализируемой пробы
- 3.3**
иммобилизация
immobilization
неспособность организмов к плаванию в воде в течении 15 с после легкого перемешивания испытательного и контрольного растворов, даже если они продолжают двигать своими усиками
- 3.4**
EC₅₀
концентрация, при которой существует воздействие на 50 % организмов согласно критерию теста
[ISO 15088:2007,^[1] 3.3]
- 3.5**
новорожденный
neonate
только что рожденный или вылупившийся субъект
PRIMEЧАНИЕ В настоящем международном стандарте новорожденной считается первая возрастная стадия дафнии, первые 24 ч жизни.
[ISO 20665:2008,^[3] 3.6]
- 3.6**
испытательная партия
test batch
ряд повторных растворов, наполняемых одним и тем же анализируемым раствором
[ISO 20665:2008,^[3] 3.8]

4 Сущность метода

Определение первоначальной концентрации (т.е. концентрации в начале теста), которая через 24 ч или 48 ч, обездвигивает 50 % анализируемых дафний *D. magna*, в условиях, установленных в настоящем международном стандарте. Эта концентрация, известная как эффективная начальная ингибиторная концентрация, обозначается 24 ч EC₅₀ или 48 ч EC₅₀.

В тех случаях, когда EC₅₀ определить невозможно, желательно указать полученные в тесте самую низкую концентрацию, которая иммобилизует все дафнии *D. Magna*, и самую высокую концентрацию, которая не иммобилизует ни одну дафнию *D. magna* и представить полезную информацию.

Тест выполняется в одну или две стадии:

- предварительный тест, определяющий диапазон концентраций, который необходимо проанализировать при определении токсичности, и дающий приблизительное значение 24 ч EC₅₀ или 48 ч EC₅₀;
- собственно тест, выполняемый, если значения, полученного в предварительном тесте недостаточно, позволяющий вычислить 24 ч EC₅₀ или 48 ч EC₅₀, и определяющий концентрации, соответствующие 0 % и 100 % -ной иммобилизации.

Если метод, установленный в настоящем международном стандарте, используется для биотестирования химических веществ, можно выполнить тест на предельное содержание при концентрации 100 мг/л или при более низкой концентрации, при которой вещество растворяется или является стабильной дисперсией в условиях испытания (см. 9.5). Если этот тест дает полезную информацию, то его можно провести при концентрациях выше 100 мг/л при условии, что вещество растворяется при этой концентрации или дает стабильную дисперсию.

5 Окружающие условия для теста

Воздействие на организмы в соответствии с данным международным стандартом должно осуществляться либо в темноте, либо как при световом дне: 16 ч свет + 8 ч темнота, в помещении с температурным контролем или в инкубаторе при температуре (20 ± 2) °C в испытательных емкостях.

Испытательная атмосфера не должна содержать пары или пыль, токсичные для *D. magna*. Разлагаемые на свету химические вещества должны испытываться в темноте или при минимальном освещении в течение установленного фотопериода, или минимальном освещении красным светом, в зависимости от рассматриваемого случая.

Использование контролей (3.1) также позволяет проверить, что испытание выполняется в атмосфере, не содержащей токсичной пыли и паров.

6 Реактивы, испытываемые организмы и среды

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет иных установок.

6.1 Испытуемые организмы. Испытуемые организмы являются новорожденными *D. magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*), полученными при ациклическом партеногенезе в установленных условиях размножения (см. Приложение С).

Особь, используемые для испытания, должны иметь возраст менее 24 ч, причем не следует брать потомство первого поколения. Дафнии *D. magna* должны происходить от жизнеспособных особей, не проявляющих признаков стресса, например, смертность >20 % в течение 2 дней, присутствие мужских особей, эфипиумов, или бесцветных особей, а также не должно быть задержки в воспроизводстве первого поколения. Отделяют оплодотворенные женские особи и собирают новорожденных, появившихся в течение 24 ч.

Если условия среды выращивания значительно отличаются от условий испытания, рекомендуется одно поколение акклиматизировать к условиям испытания в течение примерно одной недели, чтобы избежать стресса родителей и потомства.

Возраст исходной культуры и источника (включая клон, если возможно) дафний *D. magna* должен быть указан в протоколе испытания, поскольку на чувствительность дафний *D. magna* к токсическим веществам может повлиять источник культуры.

Дафнии *D. magna* могут также быть получены при инкубировании эфипиумов, полученных из лабораторных культур рачков, в соответствии с Приложением D, или их можно приобрести в

специализированной компании.¹ Новорожденные, появившиеся из эфипиумов, могут быть использованы непосредственно как испытуемые организмы, если они соответствуют всем критериям валидности, описанным в данном международном стандарте.

6.2 Чистая вода, проводимость ниже 10 мкСм/см.

6.3 Вода для разбавления и выращивания.

6.3.1 Общие положения. Природная вода (поверхностные или грунтовые воды), восстановленная вода или дехлорированная водопроводная вода приемлемы в качестве воды для культивирования и разбавления, если дафнии *D. magna* в ней выживают на протяжении культивирования, акклиматизации и испытания, не проявляя признаков стресса. Такие воды можно использовать, если они соответствуют всем критериям и условиям, установленным в данном международном стандарте. Рекомендуется использовать воды в диапазоне от pH 6 до pH 9, с жесткостью от 140 мг/л до 275 мг/л (в пересчете на CaCO₃).

Для исходной культуры *D. magna* в лаборатории также можно использовать среду М4 (см. Приложение А).

Среду М4 (Приложение А) не следует использовать в качестве воды для разбавления для проб, содержащих двухвалентные ионы металлов. ЭДТА в этой среде может снизить биологическую доступность таких ионов, что приведет к снижению кажущейся токсичности. Кроме того, по той же причине, среду М4 не следует использовать как воду для разбавления для проб неизвестного состава.

ПРИМЕЧАНИЕ Если испытание выполняется с целью, требующей применения воды для разбавления, характеристики которой отличаются от описанных в трех предыдущих абзацах, указывают основные характеристики использованной искусственной воды для разбавления.

В качестве примера ниже описывается приготовление воды для разбавления, удовлетворяющей требованиям.

Растворяют известные количества реактивов в чистой воде (6.2) Приготовленная вода для разбавления должна иметь pH $7,8 \pm 0,5$, жесткость (225 ± 50) мг/л (в пересчете на CaCO₃), молярное соотношение Ca + Mg близкое к 4 + 1 и концентрацию растворенного кислорода выше 7 мг/л.

Готовят растворы, установленные в 6.3.2 - 6.3.5.

6.3.2 Раствор хлорида кальция. Растворяют 11,76 г дигидрата хлорида кальция (CaCl₂·2H₂O) в чистой воде (6.2) и доводят до 1 л чистой водой (6.2).

6.3.3 Раствор сульфата магния. Растворяют 4,93 г гептагидрата сульфата магния (MgSO₄·7H₂O) в чистой воде (6.2) и доводят до 1 л чистой водой (6.2).

6.3.4 Раствор бикарбоната натрия. Растворяют 2,59 г бикарбоната натрия (NaHCO₃) в чистой воде (6.2) и доводят до 1 л чистой водой (6.2).

¹ Компания MicroBioTests Inc., Mariakerke, Belgium, является примером подходящего поставщика. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ISO в отношении этого поставщика.

6.3.5 Раствор хлорида калия. Растворяют 0,23 г хлорида калия (KCl) в чистой воде (6.2) и доводят до 1 л чистой водой (6.2).

6.3.6 Перемешивание. Перемешивают 25 мл каждого из четырех растворов (6.3.2 - 6.3.5) и доводят до 1 л чистой водой (6.2).

Вода для разбавления должна быть аэрирована, так чтобы довести концентрацию растворенного кислорода до насыщения, а pH до стабилизации. При необходимости, регулируют pH до $7,8 \pm 0,5$ добавлением раствора гидроксида натрия (NaOH) или соляной кислоты (HCl). Воду для разбавления, приготовленную таким образом, перед использованием больше аэрировать не требуется.

6.4 Стандартное вещество. Рекомендуется дихромат калия ($K_2Cr_2O_7$).

Поскольку $K_2Cr_2O_7$ является канцерогенным веществом, токсичным при вдыхании, применение готового раствора с определенной концентрацией $K_2Cr_2O_7$ для приготовления исходного раствора стандартного вещества может снизить риск вдыхания токсичной пыли в лаборатории.

6.5 Раствор гидроксида натрия, например, [NaOH] = 1 моль/л.

6.6 Соляная кислота, например, [HCl] = 1 моль/л.

7 Аппаратура и материалы

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

7.1 Помещение с температурным контролем или камера.

7.2 Устройство для измерения растворенного кислорода.

7.3 Сосуды для культур, из химически инертного материала достаточной вместимости, например, стеклянные химические стаканы вместимостью 2 л.

7.4 Испытательные емкости, из химически инертного материала достаточной вместимости, например, стеклянные пробирки или химические стаканы.

7.5 Пипетка для отбора испытуемых организмов, достаточного диаметра для захвата особей, позволяющим при этом отобрать только небольшой объем среды.

Микропипетки из инертной пластмассы с утолщением на конце очень хорошо подходят для подобных операций.

7.6 Емкости для сбора проб, в соответствии с ISO 5667-16.

7.7 Сита. Подходящие сита (например, с размером ячейки 1,0 мм и 0,3 мм) для переноса взрослых особей в исходную культуру и для отделения молодых от взрослых.

2 Раствор дихромата калия Titrisol является примером продукции, имеющейся в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ISO в отношении этой продукции.

8 Обработка и подготовка проб

8.1 Особые меры предосторожности при пробоотборе, транспортировании, хранении и очистке воды, стоков и водных экстрактов для испытания

Отбор проб, транспортирование и хранение проб следует выполнять в соответствии с ISO 5667-16.

Тест на токсичность выполняют, по возможности, быстро, предпочтительно в течение 12 ч с момента отбора проб. Если невозможно уложиться в указанный интервал, охлаждают пробу до температуры 0 °С - 5 °С и испытывают ее в течение 24 ч с момента пробоотбора. Если невозможно выполнить тест в течение 72 ч, пробу можно заморозить практически сразу же после отбора и поддерживать в состоянии глубокой заморозки (ниже -18 °С) для испытаний в течение 2 месяцев с момента отбора (см. ISO 5667-16:1998, Раздел 5).

После полного оттаивания пробы испытывают немедленно, например, в водяной бане при максимальной температуре 30 °С. Не допускается использовать микроволновую печь для размораживания проб.

Во время испытания, гомогенизируют пробу для анализа встряхиванием вручную. Высокие концентрации суспендированных неорганических и органических твердых веществ в пробе могут повредить фильтрующим дафниям *D. magna*. Скомпенсировать такие влияния можно обработкой пробы от мутности. При необходимости, дают отстояться в течение не более 2 ч в емкости, и отбирают пробу, например, требуемое количество надосадочной жидкости пипеткой, держа конец пипетки в центре сечения емкости и на середине расстояния от осадка до поверхности жидкости. Если необработанная проба надосадочной жидкости может помешать тестированию (за счет присутствия остаточного взвешенного вещества, простейших, микроорганизмов и т.д.), центрифугируют, например, в течение 10 мин при 5 000g или фильтруют необработанную или декантированную пробу. Определяют остаточную токсичность надосадочной жидкости. Фильтр конкретного типа следует перед применением проверить испытанием с контрольной средой, пропущенной через фильтры.

ПРИМЕЧАНИЕ Некоторые фильтры и аппаратура могут внести вклад в измеряемую токсичность, иногда за счет смачивающих веществ, добавляемых в фильтры. Фильтровальная бумага может также абсорбировать токсичные вещества, извлекая их, таким образом, из фильтрата пробы.

Проба, полученная одним из этих методов, является пробой, предлагаемой для анализа.

Обычно не требуется аэрирования пробы или приготовления конкретных концентраций для анализа. Если, и только в том случае, если растворенный кислород составит <40 % насыщения, предварительно аэрируют пробу или все испытательные растворы в течение самое большее 20 мин подходящими методами, например, можно выполнить аэрирование или перемешивание. Всякое пересыщение следует исправлять.

Измеряют pH (в соответствии с ISO 10523) и концентрацию растворенного кислорода (в соответствии с ISO 5814) и записывают эти значения в протокол испытания.

Сообщают о предварительном аэрировании испытательных растворов или пробы.

Тестирование необходимо выполнять без регулирования pH пробы.

pH испытываемых партий (3.6) измеряют в начале и в конце тестирования и вносят в протокол.

В то же время, в некоторых случаях, окончательный pH испытательного раствора может значительно отличаться от первоначального pH испытываемой пробы за счет выбранного диапазона концентраций и в результате буферной емкости воды для разбавления или пробы. Если наблюдается токсичное воздействие при концентрациях, когда pH несовместим с выживанием организмов (т.е. вне диапазона pH 6,0 - pH 9,0), тестирование можно повторить, отрегулировав pH пробы.

ВНИМАНИЕ! — Регулирование pH может изменить характер пробы.