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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
33036—
2014

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ
ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ
ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

**Определение острой токсичности
для дождевых червей**

(OECD, Test No 207:1984, IDT)

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2015

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, 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 аутентичного перевода на русский язык руководящего документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 октября 2014 г. № 71-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
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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1695-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33036—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен руководящему документу OECD, Test No 207:1984 Earthworm, Acute Toxicity Tests (Определение острой токсичности для дождевых червей).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного руководящего документа для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5—2001 (подраздел 3.6)

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия — идентичная (IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартиформ, 2015

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

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ
ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ****Определение острой токсичности для дождевых червей**

Test methods for chemicals of environmental hazard. Earthworm acute toxicity tests

Дата введения — 2015—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения острой токсичности химических веществ для дождевых червей.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

2.1 медианное значение летальной концентрации (LC₅₀): Концентрация химического вещества в пищевом рационе, которая приводит к 50 %-ной гибели тестируемых животных.

П р и м е ч а н и е — Для контактного теста концентрацию вещества выражают в миллиграммах на квадратный сантиметр, для теста с искусственной почвой — в миллиграммах на килограмм (сухой массы почвы).

3 Принцип теста

Скрининговый тест (контактный тест с фильтровальной бумагой) включает воздействие на червей тестируемого вещества, нанесенного на влажную фильтровальную бумагу, и позволяет идентифицировать вещества, потенциально токсичные для дождевых червей.

Тест с искусственной почвой включает экспозицию дождевых червей в специально приготовленной искусственной почве, содержащей тестируемое вещество в определенном диапазоне концентраций. Гибель дождевых червей оценивается на 7-й и 14-й день после применения тестируемого вещества.

В серии тестируемых концентраций вещества одна концентрация не должна вызывать гибели, а еще одна — должна приводить к гибели всех червей.

4 Информация о тестируемом веществе

Должна быть известна следующая информация о тестируемом веществе:

- растворимость в воде;
- давление паров;
- структурная формула;
- чистота;
- стабильность в воде, почве и на свету;
- коэффициент распределения н-октанол/вода;
- результаты теста на способность к биоразложению.

5 Вещество сравнения

Вещество сравнения в тесте для определения LC_{50} должно выбираться по собственному усмотрению и гарантировать, что лабораторные условия, в которых проводят опыты, соответствуют требованиям и не подвержены существенным временным изменениям. Оптимальным веществом сравнения, удовлетворяющим этим условиям, является хлорацетамид.

6 Достоверность теста

Тест считается достоверным, если гибель червей в контроле не превышает 10 % к концу испытания.

7 Описание теста

7.1 Оборудование и материалы

Обычное лабораторное оборудование и специальные принадлежности:

- культура дождевых червей (см. 7.2);
- фильтровальная бумага среднего качества толщиной примерно 0,2 мм и плотностью от 80 до 85 г/м²;
- искусственный почвенный субстрат, приготовленный следующим образом:
 - 10 % сфагнового сухого и тонко растертого торфа (рН 5,5—6,0; без видимых растительных остатков);
 - 20 % каолиновой глины (с содержанием каолина около 30 %);
 - 70 % промышленного песка (предпочтителен мелкий песок с преобладанием частиц размером от 50 до 200 микрон — более 50 %).

рН в искусственном субстрате регулируют в пределах $6,0 \pm 0,5$ карбонатом кальция [1]. Сухие составные части тщательно смешивают в строго установленных пропорциях, каждый раз взвешивая общую массу. Влажность смеси определяют при высушивании небольшого количества образца при температуре 105 °С. Деионизированную воду добавляют к полученной смеси до влажности примерно 35 % сухой массы таким образом, чтобы при сжатии субстрата в руке не выделялась вода. Для некоторых видов торфа приемлемым будет и более высокое содержание влаги.

Сосуды, используемые в тесте, должны быть стеклянными — вместимостью около 1 л и должны быть покрыты стеклянными крышками или перфорированной пленкой.

Освещение лабораторной комнаты или камеры должно контролироваться в пределах от 400 до 800 Люкс, температура — (20 ± 2) °С.

7.2 Экспериментальные животные

Рекомендуемый вид дождевых червей для теста — *Eisenia foetida* (Michaelsen). Этот вид не совсем типичен для традиционных типов почв и обычно обитает в почвах, богатых органическим веществом. Он чувствителен к химическим веществам, имеет короткий жизненный цикл — черви выводятся из коконов за 3—4 недели и достигают половой зрелости за 7—8 недель при температуре окружающей среды 20 °С. Вид очень плодовитый, взрослый червь производит от 2 до 5 коконов в неделю, из которых выводятся другие черви. Кокон можно приобрести или разводить, разделив популяцию на части (см. приложение А).

Eisenia foetida существует в виде двух рас червей, морфологически сходных между собой [2]. Но одна раса — *E. foetida foetida* имеет типичные поперечные полосы на сегментах, а другая — *E. foetida andrei* не имеет таковых и более красного цвета. В тесте используют *E. foetida foetida*, однако возможно использование и другой расы.

Для опытов берут взрослых червей (в возрасте от двух месяцев) и живой массой от 300 до 600 мг.

7.3 Выполнение теста

7.3.1 Тест с фильтровальной бумагой

Рекомендуются плоскдонные стеклянные колбы с плоским дном или другие стеклянные сосуды, высотой 8 см и диаметром 3 см с плоским дном, стенки которых покрывают фильтровальной бумагой, нарезанной таким образом, чтобы ее края частично перекрывали друг друга.

Тестируемое вещество известной концентрации растворяют в дистиллированной воде (если растворимость вещества не менее 1000 мг/л) или в наиболее подходящем органическом растворителе

(ацетоне, хлороформе, гексане). 1 мл раствора капают пипеткой в колбу и испаряют растворитель (операция может быть повторена для достижения требуемого количества осадка вещества). Контрольный сосуд должен быть аналогично обработан 1 мл дистиллированной воды или используемого органического растворителя. После высушивания 1 мл дистиллированной воды переносят в другой сосуд для смачивания бумаги, который накрывают стеклянным колпаком или полимерной пленкой с небольшим отверстием.

Предварительный тест предшествует более точному скрининговому тесту. Он может быть следующим:

Количество тестируемого вещества на фильтровальной бумаге	Концентрация раствора тестируемого вещества
1,0 мг/см ²	$7 \cdot 10^{-2}$ г/мл
0,1 мг/см ²	$7 \cdot 10^{-3}$ г/мл
0,01 мг/см ²	$7 \cdot 10^{-4}$ г/мл
0,001 мг/см ²	$7 \cdot 10^{-5}$ г/мл
0,0001 мг/см ²	$7 \cdot 10^{-6}$ г/мл

Для основного скринингового теста необходимо использовать пять и более уровней геометрического ряда концентраций. Для каждой концентрации — 10 повторностей, помещая одного червя в сосуд. Более одного червя помещать не рекомендуется, т. к. гибель одного червя может оказать неблагоприятное воздействие на других, находящихся с ним в сосуде. Точность, полученных при тестировании данных, может быть увеличена доведением количества повторностей до 20. Дождевые черви перед использованием их в тесте должны содержаться в течение 3 часов на влажной фильтровальной бумаге, чтобы удалить содержимое их кишечника. Затем их промывают и слегка подсушивают. Во время теста сосуды должны находиться в горизонтальном положении на каком-либо подносе. Температуру во время теста поддерживают в пределах (20 ± 2) °С. Первые 48 ч сосуды держат в затемненном месте, а по прошествии 72 ч оценивают гибель червей. Червь считается погибшим, если он не реагирует на легкие механические раздражения, производимые по направлению от головы к хвосту.

7.3.2 Тест с искусственной почвой

Желателен предварительный тест, который определяет диапазон концентраций вещества и включает следующий ряд концентраций: 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100; 1000 мг/кг (тестируемого вещества в сухой искусственной почвенной смеси). Для основного теста необходимо использовать пять концентраций геометрического ранжированного ряда.

Тест с искусственной почвой и тестируемым веществом необходимо проводить следующим образом: непосредственно перед тестированием эмульсию или дисперсию химиката в дистиллированной воде смешивают с искусственным субстратом или равномерно разбрызгивают по его поверхности. Если тестируемое вещество нерастворимо в воде, оно может быть растворено в подходящем органическом растворителе (ацетоне, гексане или хлороформе), после чего растворителю дают возможность испариться. Если вещество не растворяется, его дисперсию или эмульсию в количестве, соответствующем 750 г искусственной почвы (влажной массы), смешивают с 10 г мелкого кварцевого песка, после чего полученную смесь прибавляют к 740 г влажного искусственного субстрата. Так готовят смесь для каждого тестируемого сосуда. В качестве растворителей химических веществ могут использоваться только сильно летучие вещества. Перед тестированием растворитель должен испариться. Количество испарившейся воды из искусственной смеси должно быть адекватно восполнено.

В каждый сосуд добавляют 750 г влажной искусственной почвы и тестируемое вещество, после чего на поверхность помещают 10 промытых дождевых червей, которые адаптируются в течение 24 ч в искусственном субстрате (без тестируемого вещества). Сосуды накрывают пластиковой пленкой для предотвращения пересыхания содержимого и выдерживают 14 дней.

Рекомендуются четыре повторности для каждой тестируемой концентрации химического вещества. В каждом тесте используют четыре контрольных сосуда, причем искусственный субстрат обрабатывают растворителем, используемым для тестируемых сосудов. Продолжительность теста 14 дней (определение гибели проводят на 7-й и 14-й дни). Температура проведения теста (20 ± 2) °С. Необходимо контролировать червей в тестируемой смеси в течение всего теста. Гибель подопытных червей определяют, высыпая содержимое сосуда на стеклянную плоскую пластину (поднос), затем проводят выборку червей из субстрата и определяют их состояние по реакции на механические раздражения, производимые от головы к хвосту. После оценки гибели в срок 7 дней, черви и смесь искусственной почвы с

химикатом помещают в контейнер. Данные о червях с какими-либо патологиями (в том числе поведенческими) фиксируют и отмечают в отчете. В конце теста необходимо оценить влажность субстрата.

8 Данные и отчет о проведении теста

8.1 Обработка результатов

Данные зависимости гибели от концентрации тестируемого вещества отражают в виде графика, по которому определяют медиану летальной концентрации (LC_{50}) и ее доверительные интервалы [3]. Применяют также другие методы пробит-анализа. Если при двух последовательных концентрациях тестируемого вещества гибель составляет 0 % и 100 % гибели, эти два значения концентрации являются достаточными, чтобы определить диапазон, в котором находится LC_{50} .

8.2 Отчет о проведении теста

Отчет о тесте должен включать в себя следующую информацию:

- тестируемое вещество: химическая формула, способ применения;
- тестируемые черви: возраст, условия содержания и кормления, источник приобретения;
- условия теста: описание, детали отклонения от рекомендуемых условий и материалов;
- информация о растворителе, примененном в тесте.

Результаты теста:

- средняя живая масса — число живых червей до начала и в конце теста;
- описание явных физических или поведенческих патологических изменений у тестируемых животных;
- метод определения LC_{50} с ссылкой на все использованные и полученные данные теста;
- графическое отражение зависимости эффекта от концентрации;
- гибель червей в контроле;
- гибель для вещества сравнения и тестируемого вещества;
- влажность и pH искусственной почвы перед началом и в конце теста;
- наивысшая концентрация, не вызвавшая гибели;
- самая низкая концентрация, вызвавшая 100 % гибель.

Приложение А
(обязательное)

Кормление и разведение тестовых организмов

Eisenia foetida может выращиваться с использованием различных видов отходов животного происхождения. Рекомендуется выращивать их в смеси конского или коровьего навоза и торфа, смешанных в пропорции 50 : 50; возможно также использование навоза других животных. Водный экстракт смеси должен иметь pH около 7,0, обладать низкой электропроводностью (менее 6,0 миллिसименс) и не быть чрезмерно загрязненным аммиаком или мочой. Для крупномасштабного содержания червей идеальны деревянные ящики размером 50 × 50 × 15 см с плотно подогнанными крышками, в которых возможно получение более чем 1000 червей за шесть недель. Для производства достаточного количества червей на 20 кг навоза вносят 1 кг червей. В таких условиях черви достигают живой массы более 1 г каждый. Применяют червей выровненных по возрасту и массе, лучше произведенных из коконов, которые выбирают из емкости с половозрелыми червями в течение 3—4 недель. После выведения из коконов черви созревают 7—8 недель при температуре 20 °С и могут использоваться в опыте.

Библиография

- [1] M. B. Bouche, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique (1972)
- [2] C. A. Edwards and J. R. Lofty, *Biology of Earthworms*. 2nd Edition, Chapman and Hall, London (1977)
- [3] J. T. Litchfield and F. Wilcoxon, *Journal of Pharmacol. Exper. Ther.* 96. 99—113 (1949)
- [4] C. E. Stephan, in *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F. L. Mayer and J. L. Hamelink) pp. 66-84, ASTM STR 634, American Society for Testing and materials (1977)
- [5] C. A. Edwards, *Development of a Standardized Laboratory Method for Assessing the Toxicity of Chemical Substances to Earthworms*, Report EUR 8714EN, Commission of the European Communities (1983)
- [6] *The Analysis of Agricultural Materials*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book 427, HMSO, London (1981)

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, оценка острой токсичности, дождевые черви

Редактор *К.С. Савинова*
Технический редактор *Е.В. Беспрозванная*
Корректор *М.М. Малахова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 05.02.2015. Подписано в печать 20.02.2015. Формат 60,84 × 84 $\frac{1}{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,65. Тираж 31 экз. Зак. 929.