

---

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 (LC<sub>50</sub>):** 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<sub>50</sub> 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/м<sup>2</sup>;
- искусственный почвенный субстрат, приготовленный следующим образом:
  - 10 % сфагнового сухого и тонко растертого торфа (pH 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 %).

pH 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 —  $(20 \pm 2)$  °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 плоскодонные 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 <sup>2</sup>                                    | 7 · 10 <sup>-2</sup> г/мл                   |
| 0,1 мг/см <sup>2</sup>                                    | 7 · 10 <sup>-3</sup> г/мл                   |
| 0,01 мг/см <sup>2</sup>                                   | 7 · 10 <sup>-4</sup> г/мл                   |
| 0,001 мг/см <sup>2</sup>                                  | 7 · 10 <sup>-5</sup> г/мл                   |
| 0,0001 мг/см <sup>2</sup>                                 | 7 · 10 <sup>-6</sup> 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]. Приемлемы 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 рН 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 $\frac{1}{8}$ . Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,65. Тираж 31 экз. Зак. 929.

---

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)