



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۸۶۹۶-۳

چاپ اول

ISIRI

8696-3

1st. edition

کیفیت آب - تعیین میزان سمیت حاد کشنده
مواد موجود در آب برای ماهیان آب شیرین -
قسمت سوم: روش آزمون گردشی

**Water quality – Determination of
the acute lethal toxicity of substances to a
freshwater fish
part 3: Flow-through method**

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوبی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹
تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱
دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳
کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۳۱۵۸۵-۱۶۳
تلفن: ۸-۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶۱)
دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)
پیام نگار: standard@isiri.org.ir
وب‌گاه: www.isiri.org
قسمت فروش، تلفن: ۲۸۱۸۹۸۹ (۰۲۶۱)، دورنگار: ۲۸۱۸۷۸۷ (۰۲۶۱)
بها: ۱۵۰۰ ریال

Institute of Standards and Industrial Research of IRAN
Central Office: No.1294 Valiaser Ave. Vanak corner, Tehran, Iran
P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 88879461-5
Fax: +98 (21) 88887080, 88887103
Headquarters: Standard Square, Karaj, Iran
P.O. Box: 31585-163
Tel: +98 (261) 2806031-8
Fax: +98 (261) 2808114
Email: standard@isiri.org.ir
Website: www.isiri.org
Sales Dep.: Tel: +98(261) 2818989, Fax.: +98(261) 2818787
Price: 1500 Rls.

به نام خدا

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱ کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی^۳ (OIML) است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی^۵ (CAC) در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان قسمتیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) و وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد این گونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) و وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

* مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

¹ International organization for Standardization

² International Electro technical Commission

³ International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)

⁴ Contact point

⁵ Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد « کیفیت آب - تعیین میزان سمیت
حاد کشنده مواد موجود در آب برای ماهیان آب شیرین - قسمت
سوم: روش آزمون گردشی »

رئیس:

سمت / نمایندگی
دانشگاه شهید چمران - دانشکده دامپزشکی

فضل آراء، علی
(دکترای تخصصی)

دبیر:

اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی شهرستان
خرمشهر

حسین زاده، فرشته
(لیسانس مهندسی شیمی - صنایع غذایی)

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سازمان شیلات ایران

اسد زاده، علی
(دکترای دامپزشکی)

سازمان شیلات ایران

پهلوان یلی، مرتضی
(فوق لیسانس شیلات)

دانشگاه علوم دریایی خرمشهر

زارعی، ماندانا
(فوق لیسانس بیولوژی)

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان
خوزستان

فلاح، مهین
(لیسانس میکروبیولوژی)

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای
عمان

محبی نودر، سیده لیلی
(فوق لیسانس بیولوژی ماهیان دریا)

اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی شهرستان
خرمشهر

مرادی، نادر
(فوق لیسانس شیمی)

دانشگاه علوم دریایی خرمشهر

یاوری، وحید
(دکترای بیولوژی ماهیان دریا)

عنوان

صفحه

ج	آشنایی با مؤسسه استاندارد	
د	کمیسیون فنی تدوین استاندارد	
و	پیش گفتار	
ز	مقدمه	
۱	هدف و دامنه کاربرد	۱
۱	اساس آزمایش	۲
۲	موجودات آزمایشی و واکنشگرها	۳
۳	وسایل	۴
۴	محیط آزمایش	۵
۴	روش کار	۶
۶	بیان نتایج	۷
۷	گزارش آزمون	۸
۱۰	پیوست الف- شاخص های محیطی برای حفظ و تولید مثل ماهی مخطط- اطلاعاتی	
۱۲	پیوست ب- فرم پیشنهادی برای ثبت اطلاعات- اطلاعاتی	

پیش‌گفتار

استاندارد " کیفیت آب- تعیین میزان سمیت حاد کشنده مواد موجود در آب برای ماهیان آب شیرین- قسمت سوم: روش آزمون گردشی " که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در هفتصد و نود و هفتمین اجلاس کمیته ملی استاندارد مورخ ۱۳۷۸/۹/۲۰ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

1- DIN ISO 7346-3: 1998 Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances in water to a freshwater fish part 3 (Flow-through method).

مقدمه

سه قسمت این استاندارد ملی ایران، روش‌های سنجش میزان سمیت حادکشنده مواد را برای ماهی گورخری (مخطط)^۱ شرح داده است. اما باید تأکید گردد، که پیشنهاد این ماهی دلیل بر عدم استفاده از گونه‌های ماهی نمی‌باشد. روش‌های ارائه شده می‌تواند با تغییرات مناسب، برای مثال: تغییر کیفیت آب و تغییر شرایط دمایی آزمایش، برای دیگر گونه‌های ماهی آب شیرین، شور و لب‌شور مورد استفاده قرار گیرد.

در بین سه قسمت این استاندارد، می‌توان از این سه روش، یعنی روش ثابت^۲ (ماندابی)، نیمه‌ثابت^۳ (نیمه‌جریان‌دار) و گردشی^۴ (جاری)، یکی را انتخاب کرد. آزمایش آزمون ثابت که در قسمت اول این استاندارد شرح داده شده است، در آن محلول تغییر نمی‌کند و دارای این امتیاز است که از ابزارآلات ساده استفاده شده و احتیاج به معرف‌های زیادی ندارد. همچنین ممکن است مواد موجود در ظرف آزمایش در طول مدت زمان آزمون کم شده و کیفیت کلی آب نیز کاهش یابد. استفاده از روش گردشی شرح داده شده در قسمت سوم این استاندارد که در آن محلول آزمایشی مرتباً جایگزین می‌گردد، مشکلات مطرح شده را برطرف می‌کند ولی احتیاج به تجهیزات پیچیده تری دارد.

در روش نیمه‌ثابت شرح داده شده در قسمت دوم این استاندارد محلول‌های آزمایش هر ۲۴h یا ۴۸h یک بار عوض می‌شود (این روش حد واسط روش‌های دیگر است).

روش گردشی را می‌توان برای اکثر انواع مواد، شامل مواد ناپایدار در آب استفاده کرد، اما غلظت مواد آزمایشی را تا حد امکان باید مشخص نمود. روش ثابت، محدود به مطالعه موادی است که غلظت آزمایش شده آن‌ها طی دوره آزمایش نسبتاً ثابت باقی بماند. روش نیمه‌ثابت برای مطالعه موادی است که می‌توان غلظت آن‌ها را طی آزمایش با تجدید محلول‌ها هر ۲۴h یا ۴۸h یک بار ثابت نگه داشت، برای مواد بسیار ناپایدار یا فرار در نظر گرفتن تمهیدات ویژه ضروری است. برای تسهیل آماده‌سازی و حفظ غلظت موادی که ممکن است در غلظت‌های نزدیک به حلالیت آبی کشنده باشند، می‌توان طبق موارد ذکر شده در روش‌های سه‌گانه این استاندارد، مقدار اندکی نیز ماده حلال به محلول آزمایشی افزود.

۱-Brachydanio rerio Hamilton- Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)

۲-Static method

۳-Semi-static method

۴-Flow-through method

کیفیت آب - تعیین میزان سمیت حاد کشنده مواد موجود در آب برای ماهیان آب شیرین - قسمت سوم: روش آزمون گردشی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین یک روش گردشی برای سنجش سمیت حاد و کشنده هر ماده پایدار، غیر فرار، مجزا و محلول در آب تحت شرایط ویژه برای یک گونه ماهی آب شیرین تحت نام عمومی ماهی گورخری (مخطط)^۱ می‌باشد.

این روش برای بررسی گستره وسیعی از مواد سمی برای ماهی گورخری، در شرایط این آزمون و همچنین برای بررسی گونه‌های دیگر کاربرد دارد.

یادآوری ۱- نتایج به دست آمده به تنهایی برای مشخص کردن استانداردهای کیفی آب و برای حمایت‌های زیست محیطی کافی نیست. همچنین در این روش می‌توان از سایر گونه‌های ماهیان آب شیرین نیز به عنوان موجودات مورد آزمایش، استفاده کرد.

یادآوری ۲- این روش را می‌توان با اعمال اصلاحاتی در شرایط آزمایش به ویژه با تغییر کمیت و کیفیت آب مورد استفاده برای رقیق کردن غلظت‌ها و دمای محیط آزمایشی، برای سایر گونه‌های ماهیان و آب شیرین، دریایی و لب شور مورد استفاده قرار داد.

۲ اساس آزمایش

تعیین غلظت متوسط ماده، تحت شرایط معین که برای ۵۰ درصد از کل جمعیت مورد آزمایش از ماهی گورخری که به مدت ۲۴ h، ۴۸ h، ۷۲ h و ۹۶ h، در معرض آن ماده و آب با کیفیت ثابت بوده‌اند، کشنده باشد. این غلظت‌های کشنده متوسط را با نام‌های LC_{۵۰}^۲ - ۲۴h، LC_{۵۰} - ۴۸h، LC_{۵۰} - ۷۲h، LC_{۵۰} - ۹۶h مشخص می‌سازند. این روش، در دو مرحله به شرح زیر انجام می‌گردد:

الف- در آزمایش مقدماتی حدود تقریبی متوسط غلظت کشنده مواد مشخص می‌شود، که منجر به تعیین دامنه غلظت‌ها در آزمایش نهایی می‌شود.

ب- آزمایش نهایی که نتایج آن به تنهایی قابل گزارش باشند.

وقتی شواهد برای نشان دادن اینکه غلظت اندازه‌گیری شده در سراسر آزمایش بطور نسبی ثابت باقی بماند (یعنی در حدود ۲۰٪ غلظت اسمی) می‌توان هر کدام از غلظت‌های اندازه‌گیری شده یا اسمی را برای تعیین LC_{۵۰} مورد استفاده قرار دهید.

جایی که غلظت‌های اندازه‌گیری شده به طور نسبی ثابت باقی بماند اما کمتر از ۸۰٪ یا بیشتر از ۱۲۰٪ مقدار اسمی باشد، این غلظت‌های اندازه‌گیری شده در تعیین LC_{۵۰} مورد استفاده قرار بگیرد.

1-Brachvdanio ririo Hamiltin Buchanam(Telrostri, Cyprinidae)

۲-Lethal concentration

وقتی که شواهد کافی در دسترس نباشد که غلظت ماده مورد آزمایش در هر مرحله از آزمون در سطح قابل قبول ذکر شده ثابت باقی مانده است یا وقتی که فرض شود غلظت ماده شیمیایی مورد آزمایش به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یابد، درچنین حالتی بدون توجه به اینکه داده‌هایی برای تجزیه شیمیایی وجود داشته یا نداشته باشد، نمی‌توان برای تعریف LC₅₀ از این روش آزمایش استفاده کرد. در این موارد ارزش و اعتبار آزمایش و نتایج آن ضرورتاً نقض نمی‌شود بلکه تنها می‌توان مقدار شاخص LC₅₀ را بصورت $\leq x \text{ mg/l}$ عنوان نمود که مقدار x نیز با توجه به غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش تعیین شود.

۳ موجودات آزمایشی و واکنشگرها

۳-۱ خلوص واکنشگرها باید مشخص باشد و آب مورد استفاده برای آماده سازی محلول، آب تقطیرشده بوسیله لوازم شیشه‌ای یا آب یون‌زدایی شده، یا آبی با خلوص معادل آن باشد.

۳-۲ موجود مورد آزمایش

گونه مورد آزمایش باید از خانواده کپورماهیان از رده ماهیان استخوانی که معروف به ماهی گورخری (مخطط) باشد. هر ماهی مورد آزمایش باید (30 mm ± 5mm) طول داشته باشد، که در اصل با وزن 1 g ± 0.3 g مطابقت دارد. آن‌ها باید همه از یک جمعیت انتخاب شده باشند و در هر حالت حداقل برای مدت 7 روز پیش از انجام آزمایش در آب مورد آزمون تحت شرایط کیفی آب و رژیم نوری مشابه با شرایط آزمایش نگهداری شده باشند و به طور مداوم هوادهی شوند (طبق بند ۳-۲).

ماهیان باید تا 24 h قبل از آغاز آزمایش با رژیم غذایی معمولی تغذیه شوند. ماهیان مورد آزمایش باید کاملاً سالم و بدون هر نوع عیب و یا بیماری آشکار باشند. ضمناً این ماهیان نباید در طول مدت آزمایش و/یا به مدت دو هفته پیش از آن تحت هیچ گونه درمان بیماری قرار گرفته باشند. پس از انجام آزمایش، ماهی‌های زنده باقیمانده باید به روش مناسب، معدوم شوند. شرایط محیطی برای نگهداری و تولید مثل ماهی گورخری در پیوست الف این استاندارد ارائه شده است.

۳-۳ روش استاندارد جهت تهیه آب مورد آزمایش

pH آب آزمایش باید 7.8 ± 0.2 و سختی آن تقریباً 250 mg/l بر حسب کربنات کلسیم باشد. غلظت نمک‌های حل شده در این آب، باید به صورت جدول زیر باشند:

جدول ۱- غلظت نمک‌های حل شده

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	فرمول شیمیایی نمک
۲۹۴	CaCl ₂ .H ₂ O
۱۲۳/۳	MgSO ₄ . 7H ₂ O
۶۳	NaHCO ₃
۵/۵	KCl

هوادهی آب باید به اندازه‌ای باشد که غلظت اکسیژن محلول حداقل به ۹۰ درصد مقدار اشباعی (ASV)^۱ برسد.

pH باید در حد ثابت $7/8 \pm 0/2$ نگه داشته شود و در صورت لزوم pH محلول با اضافه کردن محلول هیدروکسید سدیم یا اسید هیدروکلریک، تنظیم شود. بنابراین، آبی که به این طریق آماده می شود، نباید پیش از آغاز آزمایش، تحت هوادهی بیشتری قرار گیرد.

۳-۴ محلول های ذخیره^۱ مواد مورد آزمایش

محلول ذخیره ماده مورد آزمایش، باید با حل کردن مقدار مشخصی از آن در حجم معینی آب مقطر یا آب یونزدایی شده، تهیه شود. جهت پایداری ماده مورد آزمایش، محلول ذخیره باید به طور متناوب در زمان آزمایش تهیه شود. برای تهیه و آماده سازی محلول های ذخیره و راحتی انتقال آن ها به ظروف آزمایشگاهی و برای مواد با حلالیت کم و همگن نمودن محلول ها می توان از وسایل فراصوتی و حلال های آلی با سمیت کم برای ماهی، کمک گرفت. در صورت استفاده از چنین حلال های آلی، غلظت آن ها در محلول آزمایشی نباید از $0/1$ g/l یا $1/1$ ml/l^۲ بیشتر باشد. وقتی از حلال استفاده می شود، دو دسته شاهد به عنوان کنترل لازم است، شامل

یک ظرف حاوی حلال با حداکثر غلظت استفاده شده و دیگری بدون حلال یا ماده آزمایشی می باشد.

۳-۵ محلول های آزمایش

محلول های آزمایش با اضافه کردن مقدار مناسبی از محلول ذخیره آزمایشی به آب موجود در محیط آزمایش تا به دست آمدن غلظت مناسب درست شود. توصیه می شود که در هنگام تهیه محلول آزمایش با آب مقطر یا آب یونزدایی شده نباید بیش از 100 ml از محلول ذخیره را برای 10 l از آب رقیق کننده به کاربرد.

۴ وسایل

مواد سازنده وسایل آزمایشگاهی نسبت به تمام مایعاتی که در تماس با ماهی هستند باید بی اثر بوده و بر روی مواد آزمایش قابلیت جذب مؤثری نداشته باشد (منظور از وسایل، تجهیزات آزمایشگاهی معمولی و موارد زیر می باشد).

۴-۱ ظروف آزمایش

ظروف آزمایش باید با اشکال مختلف متناسب با خصوصیات ماده مورد آزمایش و میزان دقت لازم انتخاب گردد. برای مواد فرار یک سیستم بسته، مورد نیاز است. وقتی ماده شیمیایی غیر فرار مورد آزمون قرار گیرد، می توان درپوش آن را برداشت. حجم ظروف آزمایشگاهی باید کافی باشد، به طوری که برای هر $1/5$ gr ماهی 11 آب مورد استفاده قرار گیرد، و این نسبت نباید در طول مدت انجام آزمایش افزایش یابد. ظروف باید پیش از استفاده با دقت با مواد شوینده غیر یونی تمیز شوند (برای پاک سازی موادی که انتظار می رود جذب دیواره های مخزن شده اند، باید عملیات شستشو با مواد اسیدی و حلال هم انجام شود).

۴-۲ وسیله کنترل دما

این وسیله باید بتواند با روش مناسبی درجه حرارت محلول آزمایش و آب مخازن را تا $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ تنظیم کند.

۴-۳ تجهیزات جایگزین کننده یا تجدید کننده محلول ها

این وسایل عبارتند از: همزن و مخلوط‌کن که قادر به ثابت نگه داشتن غلظت مورد نیاز از نمونه مورد آزمایش در ظرف نگهداری آزمایش با نوسان در حدود ۲۰٪ ثابت باشد. همچنین قادر به تعویض محلول آزمایش در ظرف آزمون به میزانی که به اندازه کافی از کاهش غلظت اکسیژن به زیر ۶۰٪ مقدار اشباعی جلوگیری کند، نیز باشد.

۴-۴ تور ملاقه‌ای

این تور از نایلون یا دیگر مواد بی اثر شیمیایی برای استفاده در ظروف شاهد و دیگر ظروف شرح داده شده در بند ۴-۱، ساخته شده است.

۵ محیط آزمایش

آماده سازی و ذخیره محلول‌ها، نگهداری ماهی و تمام فعالیت‌ها و آزمایش‌ها باید در محیطی انجام شوند، که هوای آن عاری از مقادیر مضر مواد آلاینده موجود باشد. ضمناً باید از هر گونه مزاحمت ناخواسته یا پیش‌بینی نشده که رفتار ماهیان را تغییر دهد، جلوگیری کرد. برای جلوگیری از هر نوع اختلال و آسیب ناخواسته که ممکن است رفتار ماهیان را تغییر دهد، احتیاط به عمل آید. تمام آزمایش‌ها باید در روشنایی طبیعی آزمایشگاه با دوره نوری ۱۲ h تا ۱۶h در روز، انجام گیرد.

۶ روش کار

۶-۱ شرایط ماهی

هرگاه تغییری در جمعیت ماهیان مشاهده شد، به روش مشخص شده در این استاندارد و با استفاده از یک ماده شیمیایی مرجع مناسب مانند: دی کرومات پتاسیم ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) آزمایش تعیین سمیت را باید انجام دهید. نتایج این آزمایش‌ها باید با نتایج آزمایش‌هایی که پیش‌تر در همان آزمایشگاه انجام شده است، هم‌خوانی داشته باشد. ماهی مورد آزمایش نباید قبلاً مورد آزمایش قرار گرفته باشد. دمای آب مخازن را باید در دمای $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ثابت نگهدارید.

۶-۲ آزمایش تعیین حد سمیت

با استفاده از روش کار شرح داده شده در این استاندارد، برای مشخص کردن اینکه LC_{50} در ۹۶ h، بیشتر از غلظت ماده مورد نظر در حالت انحلال طبیعی است، می‌توان یک مرحله آزمایش تعیین حد سمیت را در محدوده‌ای از حلالیت آبی تحت شرایط آزمایشگاه و در غلظت 100 mg/l یا کمتر انجام داد. در صورتی که ماهیان در آزمون سمیت نمیرند، انجام آزمایش‌های دیگر ضرورت ندارد. آزمایش تعیین حد سمیت را با ۱۰ عدد ماهی شاهد انجام دهید.

یادآوری - نظریه دو جمله ای^۱ دلالت بر این دارد، که از تعداد ۱۰ ماهی، بدون هیچ گونه مرگ و میری با اطمینان ۹۹٫۹٪ LC۵۰ در مدت زمان ۹۶ h بیش از غلظت حد آزمایش استفاده شود. در صورت بروز مرگ و میر در ماهی، مطالعه کامل بندهای ۳-۶ و ۴-۶ ضروری است و در صورت مشاهده اثرات ماده سمی، مشاهدات را باید ثبت و گزارش دهید.

۳-۶ آزمایش مقدماتی

۳-۶-۱ در صورت امکان، برای آزمایش مقدماتی روش گردشی (جاری)، از همان محدوده غلظت، تعداد ماهی در غلظت محلول مورد آزمون و روش مشاهدات ماهی که در بند ۳-۶-۲ برای آزمون متناوب که در قسمت آزمون مقدماتی روش ثابت، شرح داده شده است، استفاده کنید.

۳-۶-۲ حداقل ۱/۵ و ترجیحاً ۵۱ آب به هر کدام از شش ظرف آزمایش اضافه کرده و لزوماً برای تنظیم غلظت اکسیژن حل شده به مقدار حداقل ۹۰ درصد به آن هوای اشباع داده شود. برای تهیه محلول‌های آزمایش مقدار مناسبی از محلول ذخیره ماده آزمایش را طوری به ۵ ظرف آزمایش اضافه کنید که از تغییرات غلظت، یک تصاعد هندسی^۲ بدست آید. به عنوان مثال: ۱۰۰۰ mg/l، ۱۰۰ mg/l، ۱۰ mg/l و ۱ mg/l.

به ظرف ششم چیزی اضافه نکنید تا به عنوان ظرف شاهد به کار برده شود. درجه حرارت محلول‌ها باید در محدوده دمای $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ تنظیم و حفظ شود و طی آزمایش نباید بیش از حد مجاز هوادهی شوند. در هر ظرف تعداد ۳ ماهی قرار دهید. حداقل ۲ بار در روز، تعداد ماهی مرده و غلظت اکسیژن حل شده در هر ظرف را یادداشت کنید و ماهیان مرده را بردارید. اگر داده‌های کافی برای تخمین دامنه غلظت‌های مورد نیاز برای آزمایش نهایی، وجود نداشته باشد، آزمایش مقدماتی با محدوده‌های متناوبی از غلظت تکرار کنید.

۴-۶ آزمایش نهایی

حداقل پنج غلظت تحت یک تصاعد هندسی انتخاب کنید، برای مثال: ۱ mg/l، ۲ mg/l، ۴ mg/l، ۸ mg/l و ۱۰ mg/l. اما این مجموعه باید شامل پایین‌ترین مقدار غلظت کشنده تمام ماهی‌ها در آزمایش مقدماتی و بالاترین غلظت غیر کشنده در مدت زمان ۹۶ h نیز باشد. این مجموعه منتخب غلظت‌ها باید احتمال به دست آمدن درصد مرگ و میر ماهی از صفر تا ۱۰۰ درصد را در حداقل دو غلظت از سری هندسی فراهم کند، که برای تخمین LC۵۰ با استفاده از روش صحیح لازم است. در بعضی موارد، ممکن است به دامنه محدودتر یا وسیع‌تری از غلظت‌ها برای فراهم کردن اطلاعات، نیاز باشد. حداقل شش ظرف آزمایش را فراهم کرده و به همه آن‌ها به جز یک (یا دو) ظرف به ترتیب حجم‌های مناسبی از یکی از سری‌های محلول‌های آزمون اضافه کنید، تا محدوده خاصی از غلظت ماده ای که برای انجام آزمون انتخاب شده است، به دست آید. یکی از ظروف باقیمانده را با آب رقیق استاندارد به عنوان شاهد پر کنید. در صورت استفاده از حلال آلی برای حل کردن یا پخش ماده، ظرف کنترل (شاهد) دوم را با آب رقیق کننده استاندارد که محتوی حلال آلی کافی برای به دست آوردن ماکزیمم غلظت حلال در هر یک از محلول‌های آزمون، تهیه کنید. وقتی دمای محلول آزمایش در $23 \pm 1^\circ\text{C}$ تنظیم شد، حداقل تعداد ۷ ماهی در هر ظرف قرار دهید.

۱- Binominal theory

۲- Geometric range

یادآوری - اگر ظروف ۱۱ استفاده شود، دو ظرف شاهد با آب رقیق کننده و تحت شرایط مقتضی هر دو با حلال استفاده شوند.

با استفاده از یک تور ریز از جنس ماده بی اثر، ماهیان به طور تصادفی از مخزن انتخاب شده و به طور تصادفی و بلافاصله در ظروف آزمایشی قرار داده شوند، (طبق بند ۴-۴) و هر ماهی که در زمان انتقال به ظروف، افتاده یا آسیب دیده کنار گذاشته شود. تمام ماهیان طی مدت زمان ۳۰ min به ظروف اضافه شوند. تجهیزات را برای جایگزینی محلول آزمایش (طبق بند ۳-۴) به میزان ۲۵l در روز یا به صورت پیوسته یا در فواصل کوتاه مدت تنظیم کنید. این میزان جایگزینی می تواند به ۱۲l در روز نیز کاهش یابد به طوری که غلظت اکسیژن حل شده در محلول خروجی بیشتر از ۶۰٪ مقدار اشیاعی باقی بماند.

محلول مورد آزمایش که برای جایگزینی استفاده می شود قبل از اضافه کردن به تجهیزات آزمایشگاهی، باید در دمای ۲۳°C تنظیم و نگه داری شود.

حداقل یک بار در روز طی دوره آزمایش تعداد ماهی های مرده در ظرف ثبت شود. ماهی مرده سریع از ظرف برداشته و دفعات مشاهده بیشتر شود. برای مثال: حد متوسط دوره زندگی ماهی در هر غلظت محاسبه و هرگونه رفتار غیر طبیعی ماهی زیر نظر گرفته شود. در صورت امکان، غلظت های ماده آزمایشی در محلول های ذخیره و محلول های خروجی از ظروف آزمون حداقل در ابتدا و انتهای آزمایش، اندازه گیری شود. غلظت اکسیژن محلول، pH و دمای محلول خروجی از هر ظرف آزمون حداقل یک بار در روز و در ابتدا و انتهای آزمایش اندازه گیری شود. فرم پیشنهادی مناسب برای ثبت اطلاعات در پیوست ب این استاندارد ارائه شده است.

۷ بیان نتایج

۷-۱ صحت

در صورت انجام و تایید موارد ذیل، می توان نتایج را صحیح دانست:

۷-۱-۱ در طول دوره آزمایش حداقل غلظت اکسیژن محلول ۶۰ درصد مقدار اشیاعی باشد.

۷-۱-۲ غلظت ماده آزمایش که مجهول است (یا انتظار می رود) در طی آزمایش کاهش نیافته باشد.

۷-۱-۳ درصد مرگ و میر ماهیان تحت کنترل نباید بیشتر از ۱۰٪ یا یک ماهی در هر مخزن باشد.

۷-۱-۴ نسبت رفتار غیر طبیعی در ماهیان تحت کنترل نباید بیشتر از ۱۰٪، یا یک ماهی در هر مخزن باشد.

۷-۱-۵ میزان LC₅₀ در مدت زمان ۲۴ h برای ماده شیمیایی مرجع (به عنوان مثال: دی کرومات پتاسیم) برای مخزن ماهی با نتایج به دست آمده قبلی، در آزمایشگاه مشابه همخوانی داشته باشد.

۷-۲ تخمین LC₅₀

از آنجایی که برآورد نموداری از LC₅₀ مناسب به نظر می رسد، این کار را می توان با ترسیم نمودار مرگ و میر (که به صورت درصد ماهی مورد آزمون در هر ظرف آزمون بیان می شود) در برابر غلظت ماده آزمایش نشان داد.

در صورت استفاده از مقیاس خطی برای محورها یک رابطه سیگموئیدی ایجاد می شود که از آن می توان LC50 را با درون یابی غلظت مورد انتظار که سبب ۵۰٪ مرگ و میر می شود بدست آورد. (به شکل ۱ مراجعه کنید). بهتر است اطلاعات روی کاغذ شطرنجی با محورهای لگاریتمی و در مقیاس های مناسب رسم شود. اطلاعات رسم شده به این شکل، باید یک رابطه خطی را نشان دهند که بتوان به روش بالا LC50 را از آن به دست آورد (به شکل ۲ مراجعه کنید).

در جایی که شیب با محدوده اطمینان ۹۵٪ و LC50 مورد نیاز باشد، این داده های آماری برای بیان نتایج، پیشنهاد می شود. داده ها می تواند به صورت نموداری مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرد.

در صورت وجود رایانه تجزیه و تحلیل صحیح تری می تواند انجام گیرد. در صورت عدم وجود اطلاعات کافی برای تخمین LC50 در مدت زمان ۲۴ h و ۴۸ h و در صورت امکان ثبت ۷۲ h و ۹۶ h، حداقل غلظتی که در آن ۱۰۰٪ مرگ و میر ماهی رخ داده باشد و حداکثر غلظتی که در مدت زمان ۲۴ h، ۴۸ h، ۷۲ h و ۹۶ h ۰٪ مرگ و میری در ماهی ها نبوده باشد، ثبت شود. این غلظت ها محدوده ای را که احتمالاً LC50 در آن قرار دارد، خواهند داد.

۸ گزارش آزمایش

گزارش آزمایش باید دارای آگاهی های زیر باشد:

۸-۱ روش آزمایش طبق استاندارد ملی ایران ۳-۸۶۹۶ : سال ۱۳۸۷؛

۸-۲ خواص شیمیایی ماده مورد آزمایش و هر گونه اطلاعات موجود اضافی در رابطه با آن (مانند: حلالیت در آب، فرار بودن، ضریب تفکیک اکتانول/آب، سرعت تخریب)؛

۸-۳ روش آماده سازی آب رقیق کننده، محلول ذخیره و محلول آزمایش، شامل توصیف جزئیات تجهیز محلول جایگزین یا محلول مرجع آن؛

۸-۴ تمام داده های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مربوط به آزمایش که در این استاندارد مشخص نشده، شامل جزئیات شرایط سازگاری ماهی مورد آزمون و وزن آن بر حسب g/l؛

۸-۵ اطلاعاتی به شرح زیر که در ارزیابی صحت آزمایش باید در نظر گرفته شود:

۸-۵-۱ غلظت اکسیژن محلول؛

۸-۵-۲ مرگ و میر مشاهده شده در ماهیان شاهد؛

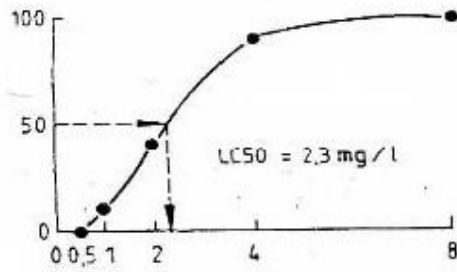
۸-۵-۳ نسبت رفتار غیر طبیعی در ماهی شاهد؛

۸-۵-۴ LC50 ماده مرجع؛

۸-۶ فهرست جدول بندی شده که نشان دهنده غلظت اسمی ماده آزمایش شده (با مقادیر تحلیلی شیمیایی در دسترس)، و درصد کلی مرگ و میر ماهی در هر ۲۴ h، ۴۸ h و ۷۲ h پس از آغاز آزمایش باشد؛

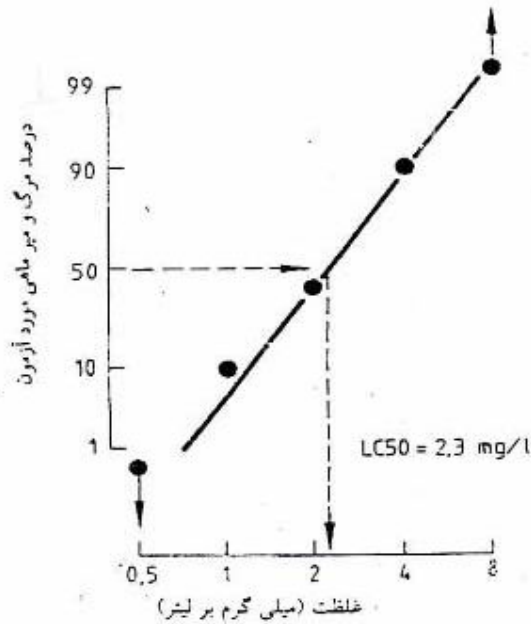
- ۷-۸ مقدار LC۵۰ و محدوده‌های اطمینان آن، در صورت امکان در ۲۴h، ۴۸h، ۷۲h و ۹۶h از ماده آزمایش؛
مرجع باید برای روش محاسباتی و روش تحلیلی شیمیایی که کاربردیست، ساخته شود؛
- ۸-۸ شیب منحنی غلظت واکنشی (و در صورت امکان محدوده ۹۵ درصد اطمینان آن)؛
- ۹-۸ نمایش نموداری رابطه غلظت واکنشی؛
- ۱۰-۸ هرگونه واکنش غیرمعمولی ماهی تحت شرایط آزمایش و هر نوع تأثیر خارجی چشمگیر تولید شده
توسط ماده آزمایش؛
- ۱۱-۸ هرگونه انحراف از شیوه عمل مشخص شده در استاندارد ملی ایران ۳-۸۶۹۶: سال ۱۳۸۷ و دلیل آن؛

درصد مرگ و میر ماهی مورد آزمون



غلظت (میلی گرم بر لیتر)

شکل ۱- نمودار خطی LC₅₀



غلظت (میلی گرم بر لیتر)

شکل ۲- نمودار لگاریتمی LC₅₀

پیوست الف

(اطلاعاتی)

شاخص‌های زیست محیطی برای حفظ و تولید مثل ماهی گورخری

الف-۱ کلیات

این گونه ماهی، بومی ساحل کورومندل در هندوستان است که با جریان‌های آبی آنجا سازش یافته است. این گونه ماهی آکواریومی شناخته شده است. بنابراین اطلاعات مربوط به روش‌های پرورش این گونه را می‌توان در کتاب‌های مرجع استاندارد در مورد پرورش ماهی گرمسیری یافت. اخیراً در زیست‌شناسی این گونه ماهی توسط لالی^۱ مورد بازبینی قرار گرفته است. طول این ماهی معمولاً کمتر از ۴۵ml با بدنی استوانه‌ای با ۷ خط تا ۹ خط افقی آبی تیره بر روی پوستی نقره‌ای می‌باشد که این خطوط به باله‌های دمی و مخرجی می‌رسند و پشت ماهی سبز زیتونی است. نرها باریک‌تر از ماده‌ها هستند و رنگشان طلایی درخشان است. ماده‌ها رنگ نقره‌ای‌تر و شکمی متورم به ویژه قبل از تخم‌ریزی دارند.

الف-۲ شاخص‌های زیست محیطی

این ماهی قابلیت تحمل دما و pH و سختی آب را دارد. اکسلراد^۲ دامنه دمایی بین ۱۵/۵°C تا ۳۳/۳°C و pH ۶/۶ تا ۷/۲ پیشنهاد کرده است. این ماهی در آب با سختی بالای ۳۰۰ mg/l بر حسب کربنات کلسیم و pH ۷/۲ تا ۷/۷ تولید مثل کرده و پرورش داده می‌شود. درجه حرارت در ۱(±۲۶)°C حفظ شده و برای ترغیب به تخم‌ریزی تا ۱(±۲۷)°C افزایش داده می‌شود.

الف-۳ مواد و روشها

این ماهی به راحتی در مخازن شیشه‌ای با گنجایش ۷۰l تخم‌ریزی می‌کند. بعد بچه ماهی‌ها به مخزنی با گنجایش ۲۰۰l منتقل می‌شوند. از آنجایی که ماهی‌های بالغ تخم‌خوارند، روش حفظ تخم‌ها و بچه ماهی‌ها ضروری است. یک روش که با موفقیت انجام شده، این است که ماهی‌های بالغ را در قفس‌های توری محبوس کرده و به هنگام تخم‌ریزی ماده‌ها، تخم‌ها از توری به ته مخزن سرازیر شده و از دسترس ماهی‌های بالغ دور می‌مانند. قفسه‌های توری از پلاستیکی هستند، که اندازه هر یک از چشمه‌های^۳ آن ۳ mm و به ابعاد تقریبی ۲۵۰mm در ۲۵۰mm در ۸۰mm، ساخته می‌شود. این قفس‌ها به لبه‌های مخزن متصل شده به طوری که تمام لبه بالایی قفس بالای آب است و قسمت شبکه توری ۶۰mm در آب فرو می‌رود برای تمیز کردن آب نباید از سیستم تصفیه شنی استفاده کرد چون باعث از بین رفتن تخم‌ها می‌شود، مخزن باید ۸ در روز نوردهی شود.

^۱-LAALE,H.W.The biology and use of zebra fish(Brachydanio rerio) in fisheries research Aliterature review.J.Fish Biol.(1977)

^۲-AXELROD, H.P Breeding Aquarium Fishes Book 1.F.T.H Publication,1967

^۳-mesh

الف-۴ شرایط پرورش

این مرحله تقریباً دو هفته به طول می‌انجامد. نرها و ماده‌ها جدا شده و به آنها غذای زنده داده می‌شود که شامل کرم‌های سفید، دافینیا و آرتمیا است. برای پرورش، هر ۳۰ ماهی در یک مخزن ۷۰l قرار داده می‌شوند. در پایان هفته دوم، نرها رنگ طلایی درخشنده و ماده‌ها باردار هستند. (ماده‌ها با شکمی پر از تخم، متورم به نظر می‌رسند)

الف-۵ مرحله تولید مثل

مخزن تخم ریزی را می‌توان به روش زیر آماده کرد:

یک مخزن خالی را برای ۴۸ h با آب آشامیدنی به دمای 27°C پر کرده و به یک قفس پلاستیکی در داخل تانک آب قرار داده به طوری که تا لبه فاصله داشته باشد و فضایی حدوداً ۱ برای شنای ماهیان در نظر گرفته شود. ۶ ماده را صبح هنگام درسید قرار داده و به آن‌ها آرتمیای خشک و منجمد^۱ خوراند می‌شود. سپس ۹ نر را اول شب به آن‌ها اضافه کرده و یک بار دیگر قبل از خاموش کردن چراغ‌ها به آنها غذا داده می‌شود تخم ریزی در نور صبحگاهی القا شده و بعد از روشن شدن چراغ‌ها پس از ۴ h این کار تمام می‌شود. تخم‌ها که چسبنده نیستند از توری پایین افتاده و از دسترس ماهی‌های بالغ دور می‌ماند. به هنگام تمام شدن کار تخم ریزی، ماهی‌های بالغ برداشته شده و به بچه ماهی‌ها اجازه داده می‌شود که از تخم بیرون آیند.

الف-۶ رشد بچه ماهی‌ها

بچه ماهی‌ها در ۴ تا ۵ روز از تخم خارج شده و برای ۲۴ h تا ۴۸ به دیواره‌های مخزن چسبیده باقی می‌مانند. بعد از شروع شنا کردن با تکه‌های کوچک غذای ماهی تغذیه می‌شوند. بعد از ۳ هفته به آنها آرتمیا داده شده و رشد آن‌ها سریع‌تر می‌شود، بعد از یک ماه به مخازن ۲۰۰l منتقل شده و به آن‌ها مخلوطی از جگر و غذای آماده داده می‌شود. ماهیان طی سه ماه از نظر جنسی بالغ شده و طول آن‌ها به ۳٫۵ cm می‌رسد. باید گفت که در برخی گونه‌های معین در مرحله رشد اختلالات رشدی قابل ملاحظه‌ای مشاهده شده است. مطالعات بعدی نشان می‌دهد که رژیم غذایی عامل این نقص‌ها است و ماهی گورخری به ویژه به این عامل حساس است (دیگر گونه‌ها به هنگام تغذیه با همان خوراک به طور طبیعی تولید مثل می‌کنند).

پیوست ب
فرم پیشنهادی برای ثبت اطلاعات
(اطلاعاتی)

کاربر:	آزمایشگاه:								
تاریخ شروع آزمایش:	شماره نمونه::								
	ماده آزمایشی:								
	درجه خلوص:								
	ناصافی:								
در صورت امکان فرمول شیمیایی ترکیبات تشکیل دهنده جهت آزمایش مشخص شود									
غلظت محلول ذخیره (میلی گرم بر لیتر)	روش آماده سازی محلول ذخیره								
حداکثر غلظت حلال در ظرف آزمایش بر حسب (میلی لیتر بر لیتر)									
روش تجزیه و تحلیل شیمیایی									
ظروف شاهد (فقط حاوی آب رقیق شده)									
زمان از شروع آزمایش (h)	عوامل موثر								
<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>									غلظت اکسیژن محلول بر حسب درصد ASV PH دما تعداد ماهی مرده
<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>									آب رقیق شده حلال میلی لیتر بر لیتر
زمان از شروع آزمایش (h)	عوامل موثر								
<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>									غلظت اکسیژن محلول بر حسب درصد ASV PH دما تعداد ماهی مرده
<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>									شماره ظرف آزمایش حلال اندازه گیری یا محاسبه اولیه غلظت ماده آزمایشی میلی لیتر بر لیتر
زمان از شروع آزمایش (h)	عوامل موثر								
<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>									غلظت ماده مورد آزمایش mg/L غلظت اکسیژن محلول بر حسب درصد ASV PH دما تعداد ماهی مرده

ICS: 13.060.70

صفحة : ١٢
