
**Suyun keyfiyyəti - *Daphnia magna* Straus
(Cladocera, Crustacea) hərəkətliliyinin
inhibəsinin təyini - Kəskin toksiklik testi**

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

LAYIHE

Ön söz.....	iv
Giriş.....	v
1 Əhatə dairəsi.....	1
2 Normativ istinadlar.....	1
3 Terminlər və təriflər.....	1
4 Prinsip.....	2
5 Test mühiti.....	2
6 Reagentlər, sınaq orqanizmləri və media.....	3
7 Aparat və materiallar.....	4
8 Nümunələrin müalicəsi və hazırlanması.....	5
Su, tullantı və ya tullantı sularından nümunələrin götürülməsi, daşınması, saxlanması və təmizlənməsi üçün xüsusi ehtiyat tədbirlərin sınaqdan keçirilməli olan sulu ekstrakt nümunələri.....	5
8.1 Sınaq ediləcək maddələrin məhlullarının hazırlanması.....	6
9 Prosedur.....	6
9.1 General.....	6
9.2 İlkin sınaq.....	7
9.3 Qəti test.....	7
9.4 Dafnia magna həssaslığını və prosedura uyğunluğunu yoxlayın.....	7
9.5 Limit testi.....	8
10 Nəticələrin təfsiri və etibarlılığı.....	8
10.1 EC ₅₀ -nin qiymətləndirilməsi.....	8
10.2 Etibarlılıq meyarları.....	8
11 Expression of results.....	8
12 Test hesabatı.....	8
Əlavə A (məlumatlandırıcı) Elendt M4 mühitinin hazırlanması.....	10
Əlavə B (məlumatlandırıcı) 1000 mq/l konsentrasiyada bir maddənin tullantı suyu və ya ehtiyat məhlulu ilə Dafnia magnanın hərəkətliliyinin inhibe edilməsinin qrafik təyini nümunəsi.....	13
Əlavə C (informative) Biblioqrafiya.....	16
Əlavə D (informative) Dafnia magnanın yatmış yumurta istehsalı üçün becərilməsi.....	17
Əlavə E (informative) Dəqiq məlumatlar.....	19
Əlavə F (informative) Durulaşma səviyyəsi D — Müəyyən etmək üçün seyreltmə seriyasının hazırlanması qapaq 20	
Biblioqrafiya.....	22

Ön söz

ISO (Beynəlxalq Standartlaşdırma Təşkilatı) milli standartlar orqanlarının (ISO üzv qurumlarının) dünya üzrə federasiyasıdır. Beynəlxalq Standartların hazırlanması işi adətən ISO-nun texniki komitələri vasitəsilə həyata keçirilir. Texniki komitənin yaradıldığı mövzu ilə maraqlanan hər bir üzv qurum həmin komitədə təmsil olunmaq hüququna malikdir. ISO ilə əlaqədə olan dövlət və qeyri-hökumət təşkilatları da işdə iştirak edirlər. ISO bütün elektrotexniki standartlaşdırma məsələlərində Beynəlxalq Elektrotexniki Komissiya (IEC) ilə sıx əməkdaşlıq edir.

Beynəlxalq standartlar ISO/IEC Direktivlərinin 2-ci hissəsində verilmiş qaydalara uyğun olaraq hazırlanır.

Texniki komitələrin əsas vəzifəsi Beynəlxalq Standartları hazırlamaqdır. Texniki komitələr tərəfindən qəbul edilmiş Beynəlxalq Standartların layihələri səsvermə üçün üzv orqanlara göndərilir. Beynəlxalq Standart kimi dərc edilməsi üçün səs verən üzv qurumların ən azı 75%-nin təsdiqi tələb olunur.

Bu sənədin bəzi elementlərinin patent hüquqlarının predmeti ola biləcəyi ehtimalına diqqət yetirilir. ISO bu cür patent hüquqlarının hər hansı və ya hamısının müəyyən edilməsinə görə məsuliyyət daşımır.

ISO 6341 Texniki Komitə tərəfindən hazırlanmışdır ISO/TC 147, Su keyfiyyəti, Alt Komitə SC 5, Bioloji üsullar.

Bu dördüncü nəşr texniki cəhətdən yenidən işlənmiş üçüncü nəşri (ISO 6341:1996) ləğv edir və əvəz edir. O, həmçinin ISO 6341:1996/Cor Texniki Korreksiyanı özündə birləşdirir. 1:1998.

Giriş

Bu Beynəlxalq Standart kimyəvi maddələrin, suların və tullantı sularının *Dafnia magna* Straus su birəsinə kəskin toksikliyinə müəyyən edilməsi proseduru müəyyən edir.

Suyun keyfiyyətinə zərərli təsirlərin qiymətləndirilməsi bir neçə ildir ki, bioloji sınaqların aparılmasını əhatə edir. Xərçəngkimilər ekotoksikoloji nöqteyi-nəzərdən maraqlıdır, çünki onlar ilkin istehlakçılardır və su ekosistemlərində zooplanktonun əsas komponentidir.

Bu Beynəlxalq Standartda müəyyən edilmiş sınaq su birəsinin *Dafnia magna* Straus-un 24 saat və ya 48 saat ərzində (istifadəçilərin və ya dövlət orqanlarının tələbindən asılı olaraq) bu Beynəlxalq Standartda göstərilən şərtlər altında sınaq nümunəsinə məruz qaldıqdan sonra immobilizasiyasının müəyyən edilməsini əhatə edir.

LAYIHE

Suyun keyfiyyəti - *Dafnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) hərəkətliliyinin inhibəsinin təyini - Kəskin toksiklik testi

XƏBƏRDARLIQ — Bu Beynəlxalq Standartdan istifadə edən şəxslər normal laboratoriya təcrübəsi ilə tanış olmalıdırlar. Bu sənəd, əgər varsa, onun istifadəsi ilə bağlı bütün təhlükəsizlik problemlərini həll etməyi nəzərdə tutmur. Müvafiq təhlükəsizlik və sağlamlıq təcrübələrini qurmaq və hər hansı milli tənzimləmə şərtlərinə uyğunluğu təmin etmək istifadəçinin məsuliyyətidir.

ƏHƏMİYYƏTLİ — Sınaqların bu Beynəlxalq standartda uyğun aparılması tamamilə vacibdir. Standart müvafiq ixtisaslı işçilər tərəfindən həyata keçirilməlidir.

1 Əhatə dairəsi

Bu Beynəlxalq Standart *Dafnia magna* üçün kəskin toksikliyin təyini üçün metodu müəyyən edir (Cladocera, Crustacea).

Bu üsul tətbiq olunur:

- sınaq şəraitində həll olunan və ya dayanıqlı vəziyyətdə saxlanıla bilən kimyəvi maddələr
- sınaq şərtləri altında dayandırılma və ya dispersiya;
- sənaye və ya kanalizasiya tullantıları;
- təmizlənmiş və ya təmizlənməmiş tullantı suları;
- aqueous extracts and leachates;
- şirin su (yerüstü və qrunut suları);
- şirin su çöküntülərinin eluatları;
- şirin su çöküntüsünün məsamə suyu.

1 Normativ istinadlar

Aşağıdakı sənədlər tam və ya qismən bu sənəddə normativ olaraq istinad edilir və onun tətbiqi üçün zəruridir. Tarixli istinadlar üçün yalnız istinad edilən nəşr tətbiq edilir. Tarixsiz istinadlar üçün istinad edilən sənədin ən son nəşri (hər hansı düzəlişlər daxil olmaqla) tətbiq edilir.

ISO 5667-16:1998, *Suyun keyfiyyəti — Nümunə götürmə — Part 16 Nümunələrin biotestinə dair*

təlimat ISO 5814, *Suyun keyfiyyəti — Həll olunmuş oksigenin təyini — Elektrokimyəvi zond*

üsulu ISO 10523, *Suyun keyfiyyəti — pH-ın təyini*

2 Terminlər və təriflər

Bu sənədin məqsədləri üçün aşağıdakı terminlər və təriflər tətbiq edilir.

3.1

nəzarət dəstəsi

nəzarət həllini ehtiva edən təkrarlar seriyası

ЛАЗИНИ

3.2

nəzarət həlli

sınaq altında olan nümunəsiz sınaq mühiti

3.3

immobilizasiya

sınaq və nəzarət məhlullarının zəif qarışdırdıqdan sonra 15 saniyə ərzində orqanizmlərin üzə bilməməsi, hətta antenalarını hərəkət etdirə bilsələr belə.

3.4

EC₅₀

test meyarına uyğun olaraq orqanizmlərin 50%-nə təsir göstərdiyi konsentrasiya [ISO

15088:2007,^[1] 3.3]

3.5

yeni doğulmuş

yeni doğulmuş və ya yeni doğulmuş fərd

QEYD Bu Beynəlxalq Standartda yeni doğulmuş uşaq 24 saat yaşlı birinci dövr dafniadır.

[ISO 20665:2008,^[3] 3.6]

3.6

sınaq dəstəsi

eyni sınaq məhlulu ilə doldurulmuş təkrarlar seriyası

[ISO 20665:2008,^[3] 3.8]

4 Prinsip

24 saat və ya 48 saat ərzində məruz qalmış dafnia magnanın 50%-ni hərəkətsizləşdirən ilkin konsentrasiyanın (yeni sınağın əvvəlində mövcud olan konsentrasiyanın) bu Beynəlxalq Standartda müəyyən edilmiş şərtlər altında müəyyən edilməsi. Effektiv ilkin inhibitor konsentrasiyası kimi tanınan bu konsentrasiya 24 saat EC₅₀ və ya 48 saat EC₅₀ olaraq təyin edilmişdir.

Bütün dafnia magnanı hərəkətsizləşdirən sınaqdan keçirilmiş ən aşağı konsentrasiyanın və heç bir dafnia magnanı hərəkətsizləşdirməyən sınaqdan keçirilmiş ən yüksək konsentrasiyanın göstəricisi arzuolunandır və EC₅₀-nin müəyyən edilə bilmədiyini hallarda faydalı məlumat verir.

Test bir və ya iki mərhələdə aparılır:

- qəti toksiklik testində yoxlanılacaq konsentrasiyaların diapazonunu müəyyən edən və 24 saat EC₅₀ və ya 48 saat EC₅₀-nin təxmini qiymətini verən ilkin sınaq;
- ilkin sınaq zamanı verilən təxmini dəyər kifayət etmədikdə aparılan, 24 saat EC₅₀ və ya 48 saat EC₅₀-nin hesablanmasına imkan verən, 0 % və 100 % immobilizasiyaya uyğun konsentrasiyaları təyin edən qəti sınaq;

Bu Beynəlxalq Standartda göstərilən üsul kimyəvi maddələrin biosınağı üçün istifadə olunarsa, sınaq həddi 100 mq/l və ya daha aşağı konsentrasiyada aparıla bilər ki, bu zaman maddə həll olunur və ya sınaq şərtlərinə uyğun olaraq sabit dispersiyada olur. (bax 9.5). Faydalı məlumat verirsə, maddə həll olunan və ya sabit dispersiyada olduğu müddətcə 100 mq/l-dən yuxarı konsentrasiyalarda da limit testi aparıla bilər.

5 Test mühiti

Bu Beynəlxalq Standartda göstəriləndiyi kimi orqanizmlərin təyini ya qaranlıqda, ya da 16 saat + 8 saat işıqlı + qaranlıq fotoperiod altında, temperatura nəzarət edilən otaqda və ya sınaq zamanı (20 ± 2) ° C-də inkubatorada aparılmalıdır.

Sınaq atmosferi dafnia magna üçün zəhərli buxarlardan və ya tozlardan təmizlənməlidir. Fotoparçalana bilən kimyəvi maddələr qaranlıqda və ya müəyyən edilmiş fotoperiodla minimal işıqlandırma və ya müvafiq olaraq minimal qırmızı işıqlandırma ilə sınaqdan keçirilməlidir.

Nəzarət vasitələrinin (3.1) istifadəsi həmçinin testin zəhərli toz və buxarlardan təmizlənmiş atmosferdə aparıldığını yoxlamağa imkan verir.

6 Reagentlər, sınaq orqanizmləri və mühitlər

Başqa cür göstərilməyibse, yalnız tanınmış analitik dərəcəli reagentlərdən istifadə edin.

a. **Test orqanizmləri.** Test orqanizmləri müəyyən çoxalma şəraitində atsiklik partenogenez yolu ilə əldə edilmiş *Dafnia magna* Strausun (Cladocera, Crustacea) yenidoğulmuşlarıdır, müəyyən çoxalma şəraitində atsiklik partenogenez yolu ilə əldə edilir (bax Əlavə C).

Sınaq üçün istifadə olunan heyvanlar 24 saatdan az olmalıdır və ilk nəsillər olmamalıdır. *Dafnia magna* sağlam nəsildən olmalıdır, ölüm göstəricisi 2 gün ərzində $\pm 20\%$, erkək, epippiya və ya rəngsiz heyvanların olması kimi heç bir əlamətlər göstərməməli və birinci balaların əmələ gəlməsində heç bir gecikmə olmamalıdır. Qravid dişiləri təcrid edin və 24 saat ərzində yeni doğulmuş körpələri toplayın.

Mövcud şəraitləri sınaq şəraitindən əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənirsə, ana heyvanları və nəsilləri stressə salmamaq üçün bir nəslin təxminən bir həftə sınaq şəraitlərinə uyğunlaşdırılması tövsiyə olunur.

*Dafnia magna*nın yaşı və *dafnia magna* kulturasının mənbəyi (mümkünsə, klonu da daxil olmaqla) sınaq hesabatında göstərilməlidir, çünki *dafnia magna*nın toksikantlara həssaslığına kultura mənbəyi təsir edə bilər.

Dafnia magna, həmçinin Əlavə D-də təsvir olunduğu kimi xərçəngkimilərin laboratoriya kulturalarından alınmış epippiyanın yumurtadan çıxmasından yarana bilər və ya ixtisaslaşmış şirkətdən alınabilir.1) Epippiyadan doğulmuş yenidoğulmuşlar bu Beynəlxalq Standartda verilmiş bütün etibarlılıq meyarlarına cavab verərsə onlar birbaşa sınaq orqanizmləri kimi istifadə oluna bilərlər.

b. **Təmiz su**, keçiricilik $10 \mu\text{S}/\text{sm}$ -dən aşağıdır.

c. **Durulaşma və kultivasiya suyu.**

i. **General.** Təbii su (yerüstü və ya qrunt suları), bərpa edilmiş su və ya xlordan təmizlənmiş kran suyu kultivasiya və durulaşma suyu kimi qəbul edilir, əgər *dafnia magna* kultivasiya, aklimasiya və sınaq müddətində stress əlamətləri göstərmədən yaşayırsa bu sular Beynəlxalq Standartda göstərilən bütün meyarlara və şərtlərə uyğun olduqda istifadə edilə bilər. PH 6 ilə pH 9 aralığında, codluğu 140 mq/l ilə 275 mq/l arasında olan sular (CaCO_3 kimi) tövsiyə olunur.

Laboratoriyada *dafnia magna*nın ehtiyat kulturaları üçün M4 mühiti (bax. Əlavə A) da istifadə edilə bilər.

M4 mühiti (Əlavə A) ikivalentli metal ionları olan nümunələr üçün durulaşma suyu kimi istifadə edilməməlidir. Bu mühitdə olan EDTA belə ionların bioavailability azalda bilər, nəticədə aşkar toksiklik azalır. Bundan əlavə, eyni səbəbdən, M4 mühiti naməlum tərkibli nümunələr üçün durulaşma suyu kimi istifadə edilməməlidir.

QEYD Əgər sınaq əvvəlki üç paragrafda təsvir edilənlərdən fərqli xüsusiyyətlərə malik durulaşma suyunun istifadəsini tələb edən məqsədlər üçün aparılırsa, sınaq hesabatında istifadə edilən sintetik durulaşma suyunun əsas xüsusiyyətlərini qeyd edin.

Nümunə olaraq, tələblərə cavab verən durulaşma suyunun hazırlanması aşağıda təsvir edilmişdir.

Məlum miqdarda reagentləri təmiz suda həll edin (6.2) Hazırlanmış durulaşma suyunun pH dəyəri $7,8 \pm 0,5$, codluğu $225 \pm 50 \text{ mq/l}$ (CaCO_3 kimi ifadə edilir), molyar nisbəti $4 + 1$ -ə yaxın $\text{Ca} + \text{Mg}$ olmalıdır və həll olunmuş oksigen konsentrasiyası 7 mq/l -dən yuxarı olmalıdır.

6.3.2-6.3.5-də göstərilən məhlulları hazırlayın.

- 1) MicroBioTests Inc., Mariakerke, Belçika, uygun t chizatçı n munesidir. Bu m lumat bu s n din istifad chil rinin rahatlıđı u un verilmiřdir v  bu t chizatçıının ISO t r find n t sdiđini t şkil etmir.

LAYIHƏ

- i. **kalsium xlorid məhlulu.** 11,76 q kalsium xlorid dihidratı ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) təmiz suda (6.2) həll edin və təmiz su ilə (6.2) 1 l-ə çatdırın.
- ii. **Maqnezium sulfat məhlulu.** 4,93 q maqnezium sulfat heptahidratı ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) həll edin (6.2) və təmiz su ilə (6.2) 1 litrə qədər çatdırın.
- iii. **Natrium bikarbonat məhlulu.** 2,59 q natrium bikarbonatı (NaHCO_3) təmiz suda (6.2) həll edin və təmiz su ilə (6.2) 1 l-ə çatdırın..
- iv. **Kalium xlorid məhlulu.** 0,23 q kalium xlorid (KCl) təmiz suda (6.2) həll edin və təmiz su ilə (6.2) 1 litrə qədər artırın.
- v. **Qarışdırmaq.** Dörd məhluldan (6.3.2-6.3.5) hər birinin 25 ml-ni qarışdırın və təmiz su ilə (6.2) 1 litrə qədər artırın.

Həll edilmiş oksigen konsentrasiyası doyma səviyyəsinə çatana və pH sabitləşənə qədər durulaşma suyu havalandırılmalıdır. Lazım gələrsə, natrium hidroksid (NaOH) məhlulu və ya xlorid turşusu (HCl) əlavə etməklə pH-ı $7,8 \pm 0,5$ -ə tənzimləyin. Bu şəkildə hazırlanmış durulaşma suyu istifadə etməzdən əvvəl əlavə havalandırılmamalıdır.

- a. **stinad maddəsi.** Kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) tövsiyə olunur.

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ kanserojen, inhalyasiya yolu ilə zəhərli maddə olduğundan istinad maddənin ehtiyat məhlulunun hazırlanması üçün müəyyən konsentrasiyalı $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ hazır məhluldan istifadə laboratoriya şəraitində zəhərli tozun inhalyasiya riskini azalda bilər.

- b. **Natrium hidroksid məhlulu**, məs. $[\text{NaOH}] = 1 \text{ mol/l}$.

- c. **Xlorid turşusu**, məs. $[\text{HCl}] = 1 \text{ mol/l}$.

7 Aparat və materiallar

Adi laboratoriya aparatları və xüsusilə aşağıdakılar.

- a. **Temperaturla idarə olunan otaq və ya kamera.**
- b. **Həll edilmiş oksigen ölçmə aparatı.**
- c. **Kimyəvi cəhətdən inert materialdan və kifayət qədər tutumlu mədəni qablar, məs. 2 l şüşə qablar.**
- d. **Kimyəvi cəhətdən inert materialdan və kifayət qədər tutumlu sınaq qabları, məs. şüşə sınaq boruları və ya stəkanlar.**
- e. **Heyvanları tutmaq üçün kifayət qədər diametrlili, yalnız kiçik həcmli mühitdən nümunə götürməyə imkan verən sınaq orqanizmlərindən nümunə götürmək üçün pipet..**

Sonunda ampul olan inert plastik materialdan mikropipetlər əməliyyatlar üçün çox uyğundur.

f. ISO 5667-16-da göstərilirdiyi kimi nümunə toplama şüşələri.

Yetkin orqanizmləri ehtiyat kulturasına köçürmək və balaları böyüklərdən ayırmaq üçün müvafiq ələklər (məsələn, ələk 1,0 mm və 0,3 mm).

2) Titrisol kalium dikromat məhlulu kommersiyada mövcud olan uyğun məhsulun nümunəsidir. Bu məlumat bu sənədin istifadəçilərinin rahatlığı üçün verilmişdir və bu məhsulun ISO tərəfindən təsdiqini təşkil etmir.

8 Nümunələrin təmizlənməsi və hazırlanması

a. Sınaq ediləcək su, tullantı və ya sulu ekstrakt nümunələrinin götürülməsi, daşınması, saxlanması və təmizlənməsi üçün xüsusi ehtiyat tədbirləri

Nümunələrin götürülməsi, daşınması və saxlanması ISO 5667-16-da göstəriləyi kimi həyata keçirilməlidir.

Toksiklik testini mümkün qədər tez, nümunə toplanandan sonra 12 saat ərzində aparın. Əgər bu vaxt intervalına riayət etmək mümkün deyilsə, nümunəni 0 °C-dən 5 °C-yə qədər soyudun və nümunəni 24 saat ərzində sınaqdan keçirin. Əgər 72 saat ərzində sınağı həyata keçirmək mümkün deyilsə, nümunə götürdükdən sonra mümkün qədər tez dondurula və dərin dondurulmuş vəziyyətdə saxlanıla bilər (aşağıda).

-18 °C) toplandıqdan sonra 2 ay ərzində sınaqdan keçirmək üçün (bax: ISO 5667-16:1998, Maddə 5).

Dondurulmuş nümunələri tam əridikdən sonra dərhal sınaqdan keçirin, məs. maksimum 30 ° C temperaturda su vannasında. Nümunələri əritmək üçün mikrodalğalı sobadan istifadə etməyin.

Sınaq zamanı analiz ediləcək nümunəni əl ilə silkələməklə homojenləşdirin. Nümunədə asılı qeyri-üzvi və ya üzvi bərk maddələrin yüksək konsentrasiyası filtrlə qidalanan dafnia magna üçün zərərli ola bilər. Bu müdaxilənin kompensasiyası bulanıqlığın nümunə müalicəsi ilə edilə bilər. Lazım gələrsə, konteynerdə maksimum 2 saat dayanmasına icazə verin və nümunə, məs. pipetdən istifadə edərək lazımi miqdarda supernatantı çıxararaq, pipetin ucunu sınaq konteynerinin bölməsinin mərkəzində və çökmüş maddələrin səthi ilə mayenin səthi arasında yarı yolda saxlamaqla. Əgər süzülmüş supernatantın xam nümunəsinin sınaqdan keçməsi ehtimalı varsa (qalıq dayandırılmış maddənin, protozoaların, mikroorqanizmlərin və s. olması səbəbindən), məsələn, 10 dəqiqə 5 000 q-da sentrifüqa edin və ya xam və ya süzülmüş nümunəni süzün. . Supernatantın qalığı toksikliyi yoxlayın. İstifadə olunacaq filtrin xüsusi növü, filtrlərdən keçən nəzarət mühiti ilə sınaqla yoxlanılmalıdır.

QEYD Bəzi filtrlər və aparatlar, bəzən filtrlərə əlavə edilən nəmləndirici maddələrə görə ölçülə bilən toksiklik əlavə edə bilər. Filtir kağızı həmçinin zəhərli maddələri udmaq və onları nümunə filtratından çıxara bilər.

Bu üsullardan hər hansı biri ilə əldə edilən nümunə sınaq üçün təqdim edilən nümunədir.

Adətən nümunənin və ya hazırlanmış sınaq konsentrasiyalarının havalandırılması tələb olunmur. Əgər və yalnız həll olunmuş oksigen <40% doyma, nümunənin və ya bütün sınaq məhlullarının müvafiq üsullarla ən çoxu 20 dəqiqə əvvəlcədən havalandırılmasıdır, məs. havalandırma və ya qarışdırma həyata keçirilə bilər. Hər hansı bir supersaturasiya aradan qaldırılmalıdır.

pH (ISO 10523-də göstəriləyi kimi) və həll olunmuş oksigen konsentrasiyasını (ISO 5814-də göstəriləyi kimi) ölçün və bu dəyərləri sınaq hesabatında qeyd edin.

Test məhlullarının və ya nümunənin hər hansı bir ön havalandırması barədə məlumat verin.

Sınaqlar sınaq nümunəsinin pH tənzimlənməsi olmadan aparılmalıdır.

Test qruplarının pH (3.6) testin əvvəlində və sonunda ölçülür və hesabat verilir.

Bununla belə, bəzi hallarda sınaq məhlulunun son pH-ı seçilmiş konsentrasiya diapazonuna və seyreltmə suyunun və ya sınaq nümunəsinin bufer tutumu nəticəsində sınaq nümunəsinin orijinal pH-dan əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənə bilər. Zəhərli təsirlər pH-nın orqanizmlərin yaşaması ilə uyğun olmayan konsentrasiyalarda (yəni, pH 6,0-dan pH 9,0 diapazonundan kənar) müşahidə olunarsa, sınaq(lar) sınaq nümunəsinin pH tənzimlənməsi ilə təkrarlana bilər.

ƏHƏMİYYƏTLİ — pH-nın tənzimlənməsi nümunənin təbiətini dəyişə bilər.

Əgər pH tənzimlənəcəksə, seçilmiş durulaşma suyunun (6.3) pH-a uyğunlaşdırılması tövsiyə olunur. 5%-dən çox olmayan həcm fraksiyasını məhdudlaşdırmaq üçün xlorid turşusu (6.6) və ya natrium hidrokسيد (6.5) məhlullarının konsentrasiyasını seçin.

Əgər pH tənzimlənməsi nəticəsində dayandırılmış maddə ilə bağlı problem yaranarsa, asılmış maddəni ISO 5667-16-da göstəriləyi kimi qalan nümunədən ayırın. Hər hansı bir pH tənzimlənməsi sınaq hesabatına daxil edilməlidir.

Əvvəlcədən işlənmiş nümunənin temperaturunu sınaq temperaturuna uyğunlaşdırın.

b. Sınaq ediləcək maddələrin məhlullarının hazırlanması

i. Ehtiyat məhlullarının hazırlanması

İstifadə zamanı müəyyən edilmiş həcmdə sdurulaşma suyunda (6.3) məlum miqdarda maddəni həll etməklə sınaqdan keçiriləcək maddənin ehtiyat məhlulunu hazırlayın. Bununla belə, əgər maddənin ehtiyat məhlulu müəyyən şərtlər altında sabitdirsə, onu əvvəlcədən hazırlamaq və bu şərtlərdə saxlamaq olar.

Test mühitində az həll olunan maddələr üçün ISO 5667-16-da verilmiş spesifikasiyalara baxın.

Mümkün qədər həlledicilərin, emulqatorların və ya dispersantların istifadəsindən çəkinmək lazımdır. Bununla belə, bu cür birləşmələr bəzi hallarda uyğun konsentrasiya edilmiş ehtiyat məhlulu istehsal etmək üçün tələb oluna bilər. Uyğun həlledicilər, emulqatorlar və dispersantlar üçün göstərişlər İstinad [4]-də verilmişdir. Test dizaynı və məlumatların qiymətləndirilməsi ilə bağlı xüsusi mülahizələr lazımdır (ISO/TS 20281[2]).

ii. Sınaq məhlullarının hazırlanması

Hazır məhlulları (8.2.1) durulaşdırılmış suya (6.3) müəyyən edilmiş miqdarda əlavə etməklə sınaq məhlulunu hazırlayın (bax 9.1).

Test sınaqdan keçiriləcək nümunənin ən azı beş konsentrasiyasından ibarət olmalıdır. Təhlil ediləcək nümunənin xarakterindən (kimyəvi maddələr, tullantılar, sular və ya ekstraktlar) və analiz növündən (aralıq tapşırığı və ya qəti) asılı olan ayırma əmsalı ilə həndəsi sıra daxilində durulaşmaları seçin.

Kimyəvi maddələrlə diapazonun müəyyən edilməsi sınağı üçün seriyalı durulaşmalar üçün ayırma əmsalı adətən 10-dur (ardıcıl iki durulaşma arasında bir sıra böyüklük fərqi).

Təmizlənmiş və ya təmizlənməmiş tullantı suları, şirin sular, məsamə suyu və ya ekstraktlar üçün adətən durulaşmalar arasında 2-lik bir ayırma əmsalı həyata keçirilir (yəni əvvəlki durulaşmanın yarıya durulaşması).

Ən aşağı səmərəsiz durulaşma (LİD) təyini üçün durulaşma seriyasının hazırlanması Əlavə F-də təsvir edilmişdir. Sınağın məqsədindən və sınaq nəticələrinə dair statistik tələblərdən asılı olaraq, konsentrasiyaları həndəsi və ya loqarifmik sıralarda olan digər durulaşma sxemləri də uyğun ola bilər.

Kimyəvi maddələr üzrə qəti sınaq üçün qatılma seriyaları 3,2-dən çox olmayan ayırma əmsalı ilə hazırlanır.

Dik konsentrasiya-cavab əyriləri gözlənilirsə, 2,2-dən çox olmayan ayırma əmsalından istifadə etmək tövsiyə olunur.

Hər bir durulaşdırma dörd təkrarda bir nəzarət (3.1) ilə dörd təkrarda aparılır.

Suda zəif həll olunan maddələr ultrasəs cihazları və ya dafnia magna üçün aşağı toksiki həlledicilərdən istifadə etməklə uyğun vasitələrlə təmiz suda və ya durulaşmış suda birbaşa həll oluna və ya dağıla bilər. Həlledicilərdən yalnız EC₅₀ test maddəsinin həll olunma qabiliyyətindən çox olduqda istifadə edilməlidir. Həlledicidən istifadə edilərsə, son sınaq məhlulunda həlledicinin konsentrasiyası 0,1 ml/l-dən çox olmamalıdır və iki nəzarət məhlulu, biri həlledicisiz, digəri həlledicinin maksimum konsentrasiyasına daxil edilməlidir. Həlledicilərlə kimyəvi maddələr üçün sınaq dizaynına dair xüsusi tələbləri nəzərdən keçirin, məsələn, ISO/TS 20281-ə uyğun olaraq əlavə həlledici nəzarət və statistik qiymətləndirmələr. [2]

9 Prosedur

a. General

Test məhlulu (8.2.2) və distillə suyu (6.3) ilə durulaşma seriyası hazırlayın.

Test məhlulunun (8.2.2) artan həcmələrini durulaşma suyu (6.3) ilə birləşdirin ki, sınaq üçün istənilən konsentrasiyaları əldə edin və sınaq qablarına köçürün.

Məsələn, (20 ± 2) °C sınaq və məhlul temperaturu əldə etmək üçün qabları bir temperaturda yerləşdirin.

Bu temperatura çatan kimi dafnia magnanı pipetka (7.5) ilə sınaq qablarına daxil edin, mümkün qədər az inkubasiya mühiti əlavə edin və xərçəngkimləri suyun altına buraxın.

Ən azı 20 heyvan, nümunənin hər biri beş heyvandan ibarət dörd qrupa bölünərək, hər bir sınaq konsentrasiyasında və nəzarət üçün istifadə edilməlidir. Hər bir heyvan üçün ən azı 2 ml sınaq məhlulu verilməlidir (yəni, hər bir test qabına beş dafniya üçün 10 ml həcm).

Hər bir sınaq seriyası üçün sınaq məhlullarının həcminə bərabər olan durulaşma suyunun həcminə (6.3) malik nəzarəti hazırlayın və sınaq məhlullarında olduğu kimi eyni sayda dafnia magna daxil edin. Əgər həlledici maddələri həll etmək və ya dağıtmaq üçün istifadə olunursa, istifadə olunan maksimum konsentrasiyada (yəni 0,1 ml/l-dən çox olmayan) tərkibində həlledici olan durulaşma suyu ilə ikinci nəzarəti hazırlayın.

Sınaq zamanı heyvanlara yem verilməməli və sınaq qabları temperatura nəzarət edilən otaqda və ya kamerada (7.1) (20 ± 2) °C temperaturda saxlanılmalıdır. Sınaq orqanizminin reaksiyalarının müşahidələri məruz qalma müddətinin sonunda aparılır.

24 saat və ya 48 saat sınaq müddətinin sonunda hər bir qabda hərəkətsiz dafnia maqnasını sayın. Mayenin 15 saniyə yumşaq çalxalanmasından sonra üzə bilməyənlər, antenalarını hərəkət etdirə bilsələr belə, hərəkətsiz hesab olunurlar.

0%-dən 100%-ə qədər immobilizasiya verən konsentrasiya diapazonunu təyin edin və dafnia magnanın davranışında anomaliyaları (məsələn, süstlük, səthdə üzən, anormal fırlanma və ya dövrə vurma) qeyd edin.

b. ilkin sınaq

Bu test qəti testin aparılacağı konsentrasiyalar diapazonunu təyin etməyə imkan verir. Bu məqsədlə ehtiyat məhlulunun və ya nümunənin yalnız bir sıra konsentrasiyalarından (ümumiyyətlə həndəsi irəliləyişlə seçilir) istifadə edin. Hər bir test konsentrasiyasına beş dafnia magna məruz qalmalıdır və heç bir təkrarlama tələb olunmur. Nümunə Əlavə B-də verilmişdir. Sınağın məqsədindən və sınaq nəticələrinə dair statistik tələblərdən asılı olaraq, həndəsi və ya loqarifmik sıralarda konsentrasiyaları olan digər durulaşma formaları da uyğun ola bilər.

c. Qəti test

Bu test müxtəlif konsentrasiyalarla hərəkətsiz olan dafnia magna faizini 24 saat EC_{50} və ya 48 saat EC_{50} və ya LID dəyəri (bax Əlavə F) müəyyən edir.

EC_{50} dəyərinin hesablanması üçün seçilmiş konsentrasiya diapazonunun 10% ilə 90% arasında ən azı üç faiz immobilizasiya ilə nəticələnməsi arzu edilir. Konsentrasiya diapazonlarının seçim nümunələri Əlavə B-də verilmişdir.

Hər bir konsentrasiya və hər bir nəzarət üçün ən azı 20 dafnia magna istifadə edin, nümunə dörd təkrara bölünür, hər sınaq konteynerində beş heyvan var.

Hərəkətsizləşdirilmiş dafnia magnanın hesablanmasından dərhal sonra nəzarət partiyası (3.1) və ən çox konsentratlaşdırılmış sınaq partiyası (3.6) ilə sınaq qablarında həll olunmuş oksigen konsentrasiyasını (bax: ISO 5814) ölçün (zəruri olduqda, bütün qabların içindəkiləri həll olunmuş oksigen tərkibini dəyişdirməmək üçün müvafiq ehtiyat tədbirləri alaraq, bu konsentrasiyaya uyğun gələn bir konteynerə tökün).

Ən çox konsentrasiya edilmiş sınaq partiyasında həll olunmuş oksigen konsentrasiyası (9.3-də göstəriləyi kimi ölçülür) 2 mq/l-dən aşağı düşərsə, həll edilmiş oksigen konsentrasiyası onların tələb olunan 2 mq/l minimum konsentrasiyaya cavab verib-vermədiyini yoxlamaq üçün digər sınaq partiyalarında ölçülməlidir. Həll edilmiş oksigen konsentrasiyası 2 mq/l-dən aşağı olan hər hansı sınaq partiyaları yekun hesablamalar üçün nəzərə alınmır.

d. Dafnia magna həssaslığının və prosedura uyğunluğunun yoxlanması with

Sınaqların yerinə yetirilməsindən sonra bir ay ərzində dafnia magnanın həssaslığını yoxlamaq üçün durulaşdırılmış sudan (6.3) istifadə edərək kalium dikromatın (6.4) 24 saat EC_{50} -ni təyin edin.

Sınaq hesabatında 24 saat EC₅₀-ni qeyd edin (nəzərə alın ki, o, yalnız bu birləşmənin toksikliyi ifadə edir və dafnia magnanın digər məhsullara həssaslığını təmsil etmir).

9.3-də təsvir olunduğu kimi yoxlama aparın. Kalium dikromatın 24 saatlıq EC₅₀ göstəricisi 0,6 mq/l ilə 2,1 mq/l aralığından kənara çıxarsa, sınaq prosedurunun ciddi şəkildə tətbiq olunduğunu yoxlayın.

e. Limit testi

Limit sınağı (4-cü bənd və Əlavə F-ə baxın) 9.1-də təsvir olunan prosedurdan istifadə etməklə 20 dafnia magna ilə aparılır. Testin sonunda immobilizasiya faizi 10%-dən çox olarsa, tam tədqiqat aparılmalıdır. Müşahidə olunan hər hansı anormal davranış qeyd alınmalıdır.

10 Nəticələrin təfsiri və etibarlılığı

a. EC₅₀ –nin qiymətləndirilməsi

24 saat və ya 48 saat testin sonunda istifadə edilən dafnia magnanın ümumi sayına nisbətə hər konsentrasiya üçün immobilizasiya faizini hesablayın. 24 saat EC₅₀ və ya 48 saat EC₅₀-ni müvafiq statistik metodla müəyyən edin (İstinadlar [4][5]) {Qauss loqarifmik diaqramında probit analizi, hərəkətli ortalama, binomial üsullar və ya qrafik qiymətləndirmə (İstinad [6])}.

Test maddənin konsentrasiyası testin əvvəlində və sonunda minimum olaraq ən yüksək və ən aşağı sınaq konsentrasiyasında ölçülməlidir. Nəticələrin ölçülmüş konsentrasiyalara əsaslanması tövsiyə olunur. Bununla belə, əgər sınaq maddəsinin konsentrasiyasının sınaq boyu nominal və ya ölçülmüş ilkin konsentrasiyanın ±20%-i daxilində qənaətbəxş şəkildə saxlanıldığını nümayiş etdirmək üçün sübutlar varsa, o zaman nəticələr nominal və ya ölçülmüş ilkin qiymətlərə əsaslanıla bilər..

Məlumatlar kifayət deyilsə və ya EC₅₀-nin hesablanması tələb olunmursa, 100% immobilizasiyaya uyğun gələn minimum konsentrasiyanı və 0% immobilizasiyaya uyğun gələn maksimum konsentrasiyanı qeyd edin.

Nəzarətdə və hər bir sınaq konsentrasiyasında immobilizasiyanın orta faizini qeyd edin.

b. Etibarlılıq meyarı

Testin sonunda aşağıdakı şərtlər yerinə yetirilərsə, nəticələri etibarlı hesab edin:

- idarəetmə vasitələrinin immobilizasiya faizi 10%-dən az və ya ona bərabərdir;
- kalium dikromatın 24 saatlıq EC₅₀ göstəricisi 0,6 mq/l ilə 2,1 mq/l aralığındadır.

11 Nəticələrin ifadəsi

EC₅₀ və 0 % və 100 % immobilizasiyaya uyğun olan dəyərləri ifadə edin:

- tullantılar, sular, eluatlar və ya ekstraktlar halında faizlə;
- kimyəvi maddələrə gəldikdə, litr üçün milliqramla.

QEYD Məlumatlar digər vahidlərdə də bildirilə bilər.

Müəyyən edilərsə, LID dəyərini bildirin (Əlavə F-ə baxın).

12 Test hesabatı

Bu sınaq hesabatında ən azı aşağıdakı məlumatlar olmalıdır:

- bu Beynəlxalq Standarta (ISO 6341:2012) istinadla birlikdə istifadə edilən sınaq metodu;

- b) nümunənin (müalicədən əvvəl) və ya sınaqdan keçirilən kimyəvi maddntam eyniləşdirilməsi üçün tələb olunan bütün məlumatlar.
- c) Nümunələrin hazırlanması üsulları:
- 1) tullantı suları, sular, eluatlar v ekstraktlar üçün nümunələrin saxlanma üsulu və müddəti, ilkin nümunənin pH və həll olunmuş oksigen konsentrasiyası, lazım olduqda nümunənin dekantasiyas, filtrasiyası və ya sentrifuqalanmas tlri; və pH-n mümkün tənzimlənməsi həyata keçirilmişdir,
 - 2) kimyəvi maddələr üçün ehtiyatın v sınaq məhlullarının hazırlanma üsulu;
- d) istifadə edilən dafnia magnanın mnyi v kulturunun ya da daxil olmaqla, bu Beynəlxalq Standartda müəyyən edilmiş sınaq ilə baql bütün bioloji, kimyəvi və fiziki məlumatlar;
- e) 24 saat EC₅₀ və ya 48 saat EC₅₀ şəklində sınaq nəticələri, hesablama metodu və mümkünsə 95% etibar həddi; maddələrin kimyəvi analizi zamanı istifadə edilən üsul;
- f) eger aparlbsa, limit testinin nəticələri;
- g) 100 % immobilizasiyaya uyqln gələn minimum sınaqdan keçirilmiş konsentrasiya və 24 saat və ya 48 saat ərzində 0 % immobilizasiyaya uyqln gələn maksimum sınaqdan keçirilmiş konsentras;
- h) sınaq şəraitində dafnia magnanın hər hansı anormal davranışı (məsələn, süstlük, səthdə zn, anormal fırlanma və ya dvr vurma);
- i) bu Beynəlxalq Standartda göstərilməyən hər hansı əməliyyat təfərrüatları v nəticələrə təsir göstərə bilən hadisələr;
- j) etalon kimyəvi maddə (9.4) ilə əldə edilmiş nəticələr, habelə istinad snaqlnn tarixi;
- k) etibarlılıq meyarlarının (10.2) yerinə yetirildiyini sübut edən məlumatlar;
- l) sınaq laboratoriyasının adı və ünvanı, snaql aparn şəxslər və hesabatı təsdiq edən şəxs.

Əlavə A (məlumatlandırıcı)

Eləndt M4 mühitinin hazırlanması

A.1 Ümumi

Bu əlavədə fond məhlullarından istifadə etməklə M4 mühitinin hazırlanması üçün bir variant verilir.

A.2 İz elementləri

Təmiz suda (6.2) hər bir fərdi mikroelement üçün ayrıca ehtiyat məhlulu (bir məhlul I) hazırlayın. Bu müxtəlif ehtiyat məhlullarından (ehtiyat məhlullar I) Cədvəl A.1-də sadalanan 13 mikroelementi ehtiva edən ikinci tək məhlul (ehtiyat məhlul II) hazırlayın.

A.3 M4 orta

Cədvəl A.2-yə uyğun olaraq ehtiyat məhlulu II, makro-qida elementləri və vitaminlərdən istifadə edərək M4 mühitini hazırlayın.

Cədvəl A.3-də göstərilədiyi kimi, 1 l təmiz suya (6.2) üç vitamin əlavə etməklə birləşdirilmiş vitamin ehtiyatı məhlulunu hazırlayın.

Dondurulmuş vitamin ehtiyatını kiçik hissələrdə saxlayın. İstifadədən qısa müddət əvvəl vitaminləri mühitə əlavə edin.

Tam mühiti hazırlayarkən duzların çökməsinin qarşısını almaq üçün ehtiyat məhlullarının alikotlarını təxminən 500 ml-dən 800 ml-ə qədər təmiz suya əlavə edin (6.2), sonra 1 l-ə qədər durulaşdırın.

Cədvəl A.1 — Eləndt M4 mühiti üçün I və II ehtiyat həlləri

Ehtiyat məhlul(lar) I (tək maddə)	Təmiz suda konsentrasiya (6.2) mq/l	Konsentrasiya (M4 mühitinə münasibətdə)	Qarışıq məhlul II hazırlamaq üçün təmiz suya aşağıdakı həcmdə məhlul I əlavə edin. (6.2) ml/l
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 fold	1,0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7 210	20 000 fold	1,0
LiCl	6 120	20 000 fold	1,0
RbCl	1 420	20 000 fold	1,0
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3 040	20 000 fold	1,0
NaBr	320	20 000 fold	1,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 260	20 000 fold	1,0
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20 000 fold	1,0
ZnCl ₂	260	20 000 fold	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20 000 fold	1,0
KI	65	20 000 fold	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 fold	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 fold	1,0
Na ₂ EDTA·2H ₂ O ^a	5 000	2 000 fold	
FeSO ₄ ·7H ₂ O ^a	1 991	2 000 fold	
<p>^a a Həm Na₂EDTA, həm də FeSO₄ məhlulları ayrı-ayrılıqda hazırlanır, sonra birlikdə tökülür və dərhal avtoklavlanır. Bu verir:</p> <p>Fe-EDTA məhlul^b 1 000 dəfə 20,0</p> <p>^b 5 000 mq Na₂EDTA*2H₂O təmiz suda (6.2) həll edin və təmiz su ilə 500 ml-ə çatdırın. 1 991 mq FeSO₄*7H₂O-nu həll edin təmiz su (6.2) və təmiz su ilə 500 ml-ə qədər hazırlayın. Birlikdə tökün və dərhal avtoklav edin. Bu məhlulu qaranlıqda saxlayın.</p> <p>^c</p>			

Cədvəl A.2 — II məhluldan, makro-nutrientlərdən və vitaminlərdən istifadə etməklə M4 mühitinin hazırlanması

Stok həlləri	Təmiz suda konsentrasiya (6.2) mq/l	Konsentrasiya (M4 mühitinə münasibətdə)	M4 mühitini hazırlamaq üçün əlavə edilmiş məhlulun həcmi ml/l
Stok məhlulu II (birləşdirilmiş iz elementləri)		20dəfə	50
Makro-qida ehtiyatı məhlulları (tək maddə)			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	293 800	1 000 qat	1,0
MgSO ₂ ·7H ₂ O	246 600	2 000 qat	0,5
KCl	58 000	10 000 qat	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000 qat	1,0
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50 000	5 000 qat	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000 qat	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 qat	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000 qat	0,1
Combined vitamin stock	—	10 000 qat	0,1

Cədvəl A.3 — Vitamin ehtiyatı məhlulunun tərkibi

Vitamin	Konsentrasiya mq/l	Konsentrasiya (M4 mühitinə münasibətdə)
Tiamin hidroxlorid	750	10 000 qat
Siyankobalamin (B ₁₂)	10	10 000 qat
Biotin	7,5	10 000 qat

Əlavə B (məlumatlandırıcı)

1000 mq/l konsentrasiyada bir maddənin tullantı suyu və ya ehtiyat məhlulu ilə Dafnia magna'nın hərəkətliliyinin inhibə edilməsinin qrafik təyini nümunəsi.

QEYD Nümunə sınaq borularından istifadə edilən prosedura aiddir.

B.1 Nəticələr

Cədvəl B.1 və B.2-yə baxın.

Cədvəl B.1 — İlkin testin nəticəsi

Konsentrasiya %	Mobil Dafnia magna
90	0
35	0
10	0
3,5	0
1	0
0,35	5
0,1	5
0,035	5
0,01	5

Beləliklə, qəti testin aparılacağı konsentrasiyalar diapazonu 0,35%-dən 1%-ə qədərdir.

Cədvəl B.2 — Qəti testin nəticəsi

Konsentrasiya %	№-li borudakı mobil Dafnia magna sayı.				N ^a	P ^b
	1	2	3	4		
0 (nəzarət)	5	5	5	5	20	0
0,35	5	5	3	4	17	15
0,48	2	3	4	3	12	40
0,62	3	1	1	2	7	65
0,80	1	0	2	1	4	80
1,0	0	1	0	0	1	95

^a Testin sonunda hər konsentrasiyada mobil Dafnia magna sayı.

^b Hər konsentrasiyada immobilizasiya olunmuş Dafnia magna faizi.

B.2 24 saat EC₅₀-nin təyini

Qrafikdə interpolyasiya ilə (bax Şəkil B.1), 24 saat EC₅₀ 0,55 % təşkil edir..

Tullantı suları üçün bu kimi ifadə edilir:

$$24 \text{ saat } EC_{50} = 0,55 \%$$

və ya

$$24 \text{ saat } EC_{50} = 5,5 \text{ ml/l}$$

Kimyəvi maddə üçün bu kimi ifadə edilir:

$$24 \text{ saat } EC_{50} = \frac{0,55 \times 1000}{100} = 5,5 \text{ mg/l}$$

Qrafikdən EC_{50} , EC_{16} və EC_{84} qiymətləri interpolyasiya yolu ilə əldə edilə bilər. Aşağı inam həddi (95 %), T_0 , daha sonra kimi qiymətləndirilə bilər:

$$T_0 = \frac{EC_{50}}{f_{EC_{50}}}$$

və yuxarı inam həddi (95 %), T_1 , kimi:

$$T_1 = EC_{50} \cdot f_{EC_{50}}$$

burada inam intervallarını əldə etmək üçün vurma/bölmə əmsalı, $f_{EC_{50}}$, aşağıdakı kimi verilir:

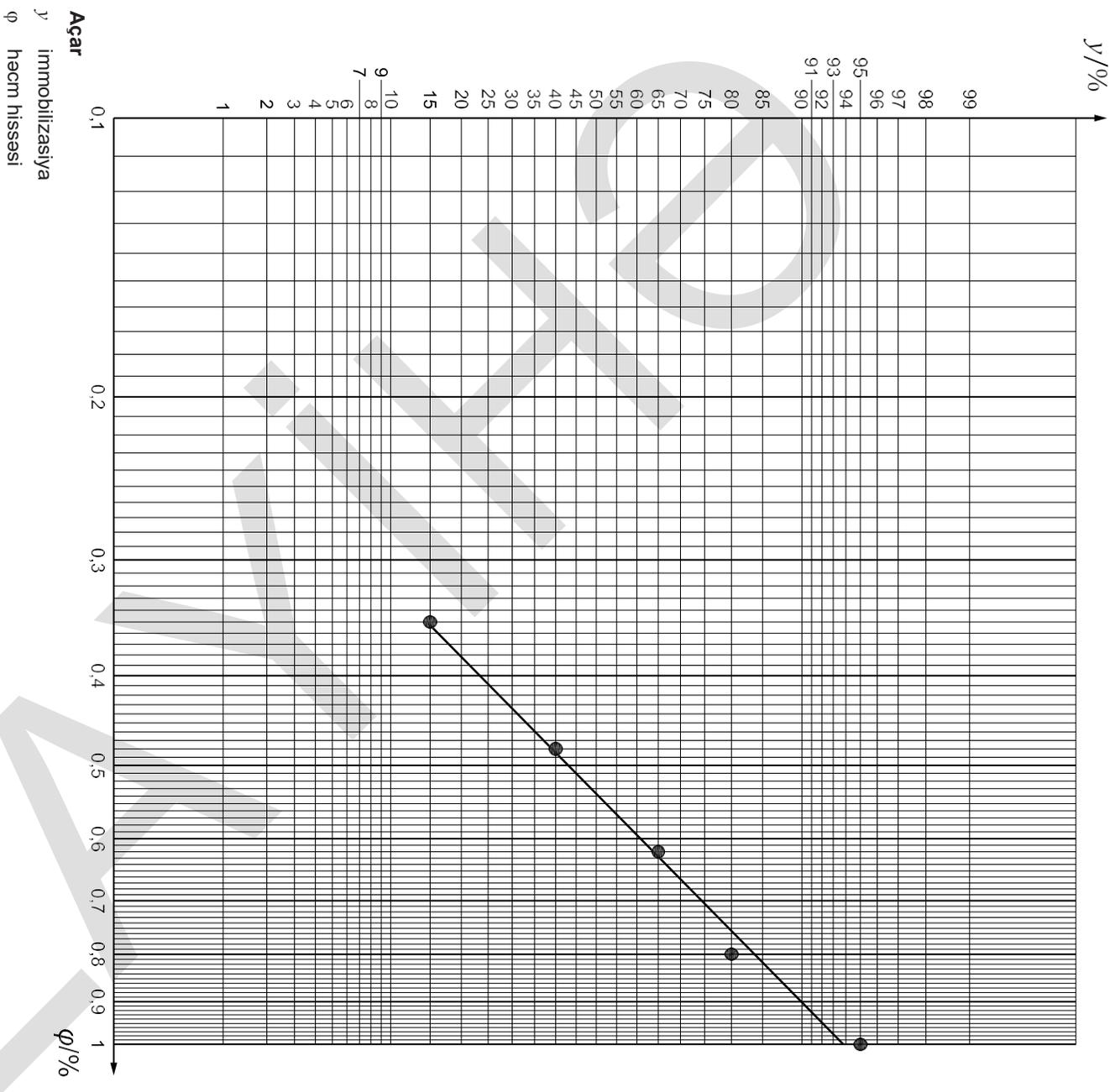
$$f_{EC_{50}} = S^{(2,77/\sqrt{N'})}$$

burada

S ilə verilmiş yamac əmsalıdır:

$$S = \left(\frac{EC_{84} + EC_{50}}{EC_{50} + EC_{16}} \right)^{1/2}$$

N' 16%-dən 84%-ə qədər olan intervalda məruz qalmış orqanizmlərin ümumi sayıdır.



Şəkil B.1 — Regressiya eyrəsi (Gauss loqarifmik şkalası)

Əlavə C (məlumatlandırıcı)

Heyvandarlıq üçün ümumi tövsiyələr

Ehtiyat kulturunun yüklənməsi litr başına 25-50 heyvan olmalıdır. Onlar kütləvi ehtiyatlarda saxlanılmalıdır.

QEYD Sınaqda istifadə ediləcək yükləməyə oxşar ehtiyat mədəniyyətinin yüklənməsi tövsiyə olunur. Məsələn, litr başına 25 heyvandan ibarət ehtiyat yükü təxminən 200 ml sınaq məhlulunda beş heyvanın təkrarını istifadə edən sınaq rejimləri üçün uyğun olardı.

Dafniyanın ehtiyat kulturası laboratoriya kulturundan təzə hazırlanmış birhüceyrəli yaşıl yosunlarla qidalanmalıdır. Qida yosunları eksponensial böyümə mərhələsində olmalıdır. Yosun mədəniyyətləri deqradasiya təsiri göstərmədən böyüdükə istifadə edilə bilər. Yığılmış yosunları uzun müddət otaq temperaturunda saxlamaq olmaz, çünki o zaman deqradasiya prosesləri baş verir. Onlar qaranlıqda soyuducuda saxlanıla bilər və ya bu yosunlarla qidalanan dafniya mədəniyyətləri hələ də sağlam və yaxşı reproduksiya vəziyyətində olduğu müddətcə dondurula bilər. Qida həddindən artıq dozada qəbul edilməməlidir. Dafnia ehtiyatlarının hər orqanizm üçün gündə 0,1 mq-dan 0,2 mq-a qədər karbon səviyyələri ilə qidalanması tövsiyə olunur. Yosunların böyüməsi mühitin dafniyanın anbar mədəniyyətinə köçürülməsinin qarşısını almaq üçün yosunların böyüməsi mühitindən ayrılması və dafniya mədəniyyət mühitində yenidən dayandırılması tövsiyə olunur. Heyvandarlıq üçün müntəzəm qulluq lazımdır. Orta həftədə ən azı 2-3 dəfə dəyişdirin. Yetkinləri yeni mühitlə təmiz bir qaba köçürün və yenidoğulmuşları ehtiyatdan ayırın. Exuviae, ölü və/və ya rəngsiz heyvanları və yem qalıqlarını çıxarın.

Dafnia magnanın anbar kultivasiyası diffuz gün işığının 16 saat + 8 saat işıqlı + qaranlıq fotoperiodu və ya süni gündüz işığı altında aparılmalıdır. Sınaq atmosferi (20 ± 2) °C-də olmalı və dafnia magna üçün zəhərli buxar və ya tozlardan təmizlənməlidir.

Seçilmiş dafnia magna mədəniyyəti üsulları üçün İstinadlara [8]–[12] baxın.

Əlavə D (məlumatlandırıcı)

Dafnia magna-nın yatmış yumurta istehsalı üçün becərilməsi

D.1 Dafnia magnanın həyat dövrü (bax Şəkil D.1)

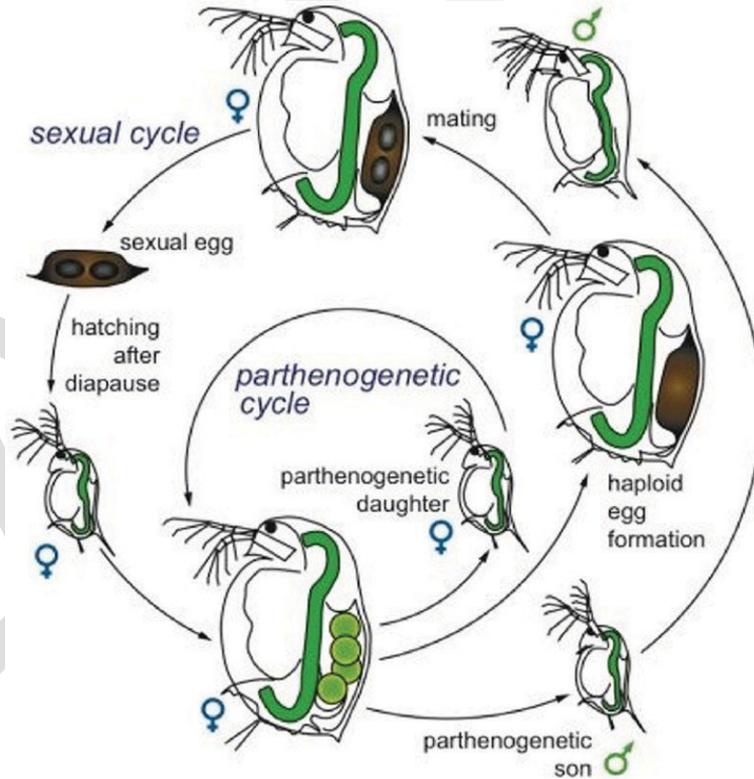
Təbiətdə dafnia magna aseksual yolla olduğu kimi cinsi yolla da çoxala bilər.

Bununla belə, yaxşı saxlanılan anbar mədəniyyətlərində çoxalma yalnız cinsi yolla baş verir, (diploid) dişilərin istehsalı ilə. Yetkin dafniyalar dorsal bala kamerasında inkişaf edən və canlı nəsillər verən partenogenetik yumurtalar istehsal edir.

Gənc dafniya yumurta istehsal etməyə başlamazdan əvvəl ardıcıl yetkinlik dövründə böyüyür.

Xüsusi ekoloji şəraitdə (elmi ədəbiyyatda "stressorlar" adlandırılır) dafniya aseksualdan cinsi çoxalma üsuluna keçir, bununla da (haploid) erkəklər, həmçinin mayalanma tələb edən (haploid) yumurtalar əmələ gəlir.

Dişilər daha sonra iki mayalanmış yumurtanın (yuxusuz yumurta adlanır) yerləşdirildiyi qoruyucu dorsal qabıq (epippium adlanır) istehsal edir.



Şəkil D.1 - Dafnia magnanın həyat dövrü
(istinad [7], müəllif hüququ sahibinin icazəsi ilə çoxaldılır)

Ephippium dişinin növbəti tükənməsində atılır və adətən batır.

Yumurtalar adətən "oddadavamlı fazadan" keçir (bir neçə ay çəkə bilər) bu müddət ərzində yumurtalar yeni doğulmuş balanın doğulmasına səbəb olan embrion inkişafı tetikləyən stimullara cavab vermir (bacarmır).

D.2 Dafnia magnanın yatmış yumurta istehsalı üçün becərilməsi

Magnanın cinsi çoxalma rejimini tetikleyen xüsusi ətraf mühit şəraiti yatmış yumurtaları əldə etmək üçün laboratoriyada simulyasiya edilə bilər. Ehippia toksiklik testləri üçün canlı bioloji material əldə etmək üçün analizlərin icrası zamanı saxlanıla və çıxarıla bilər.

Yumurta istehsal etmək üçün daphnia kulturaları tələb olunan epippiya sayından asılı olaraq istənilən növ test qabına və istənilən həcmdə quraşdırıla bilər.

Orqanizmlər laboratoriya ehtiyat kulturaları ilə eyni şəkildə becərilir və qidalanır. Eyni dafnia ştamlarını yatmış yumurtaların istehsalı üçün istifadə edilə bilər.

Kulturalar ətraf mühitin temperaturunda 12L:12D işıq dövrü ilə 100 daphnia/l-dən 200 dafnia/l-ə qədər olan populyasiya sıxlığı ilə başlanıla bilər.

Kifayət qədər qida olduqda, mədəniyyətlərdə populyasiya sıxlığı tədricən artır və 1000 dafnia/l-dən 2000 dafnia/l-ə çata bilər.

Aseksual çoxalmadan cinsi çoxalmaya keçid əsasən iki dəyişən tərəfindən tetiklənir: canlının sıxlığı (sıxlıq) və qida çatışmazlığı.

Bu iki dəyişən üçün dəqiq rəqəmlər və cinsi çoxalmaya keçidə çatmaq üçün lazım olan vaxt tamamilə xüsusi "öz" becərmə şəraitindən asılıdır və eksperimental olaraq müəyyən edilməlidir.

Cinsi çoxalmanın başlanğıcı, erkəklərin (dişilərdən daha kiçik olan), eləcə də epippium daşıyan dişilərin görünəcəyi mədəniyyətlərin müntəzəm mikroskopik müşahidələri ilə tapıla bilər.

Dişilər epippiumunu atdıqdan sonra, ikincisi kultivasiya qabının dibində toplanıla bilər.

Ehippia soyuducuda (4 °C-də) qaranlıqda, kran suyu və ya yenidən hazırlanmış təbii su ilə borularda saxlanılmalıdır.

"Odadavamlı faza" (D.1.-də göstərilmişdir) nəzərə alaraq, müvəffəqiyyətli inkubasiya əldə etmək üçün yatan yumurtalar məhsul yığıldıqdan sonra təxminən 3 ay saxlanılmalıdır. Yumurtalar düzgün saxlanılarsa, hətta 1-2 ildən sonra canlı yenidoğulmuşlar əldə edilə bilər.

D.3 Efippiyanın yumurtadan çıxması

Cinsi yumurtaların embrion inkişafının başlanğıcı üçün təbiətdə iki əsas tetikleyici işıq və temperaturdur. Laboratoriya şəraitində cinsi yumurtaların yenidoğulmuşlara inkişafı üçün vaxt təxminən 72 saat çəkir.

Yenidoğulmuşları əldə etmək üçün ehippia daphnia ehtiyat kulturaları üçün nəzərdə tutulmuş eyni mühitdən ibarət Petri qabına köçürülməlidir.

Petri qabı 6 000 lx davamlı işıqlandırma altında (20 ± 1) °C temperaturda 72 saat inkubasiya edilməlidir.

D.4 Keyfiyyətə nəzarət testi

Hərəkətsiz yumurtalardan çıxan dafnia magna yenidoğulmuşlar laboratoriya kulturalarından götürülmüş sınaq orqanizmləri üçün bu Beynəlxalq Standartda göstərilən bütün meyarlara və şərtlərə uyğun olmalıdır.

Buna görə də, kalium dikromat ilə keyfiyyətə nəzarət testləri epippiyadan çıxan yenidoğulmuşlarla aparılmalı və 24 saatlıq EC₅₀ 0,6 mq/l ilə 2,1 mq/l aralığında olmalıdır (bax 9.4) (İstinad [7]).

Əlavə E (məlumatlandırıcı)

Dəqiq məlumatlar

Avropa Birlikləri Komissiyasının səlahiyyəti altında 1978-ci ildə aşağıdakı maddələr üçün laboratoriyalararası sınaq aparılmışdır:

- tetrapropilenbenzolsulfon turşusu (TPBS №1);
- natrium tetrapropilenbenzensulfonat (TPBS No 2);
- kalium 2,4,5-triklorofenoksiasetat (2,4,5-T kalium duzu).

Sonuncu maddə, aşağı toksikliyə və suda az həll olmasına baxmayaraq, ISO 6341:1996-da təsvir edilən metodun əhatə dairəsi həddində hesab edilən maddə ilə bağlı nəticələr əldə etmək üçün daxil edilmişdir.

1994-cü ildə iştirakçı üzvlərdən 1978-ci ildən bəri aparılan sınaqlardan kalium dikromat haqqında 24 saatlıq EC₅₀ məlumatlarını təqdim etmələri tələb olundu. Bu məlumatlar istinad toksikant həssaslığının məqbul diapazonunu hesablamaq üçün istifadə edilmişdir.

Bələdçi olaraq, bu laboratoriyalararası sınaqların nəticələri (ISO 5725-2[13]-ə uyğun olaraq qiymətləndirilir. Cədvəl E.1-də ümumiləşdirilmişdir.

Cədvəl E.1 — Dəqiq məlumatlar

Maddə	İştirak edən laboratoriyaların sayı	Ləğv edilən laboratoriyaların sayı	İstifadə olunan nəticələrin sayı	Orta 24 saat EC ₅₀ mq/l	Standart sapma			
					Təkrarlanma qabiliyyəti		Təkrarlanma qabiliyyəti	
					Mütləq	Dəyişiklik əmsalı%	Mütləq	Dəyişiklik əmsalı %
K ₂ Cr ₂ O ₇	36	2	1 697	1,12	0,06	5	0,56	50
TPBS No. 1	36	4	108	27,45	3,95	14,4	8,32	30
TPBS No. 2	31	4	84	27,02	3,24	12	9,51	35
2,4,5-T kalium duzu	32	4	72	772,25	64,5	8,3	277,8	35,9

Əlavə F (məlumatlandırıcı)

Durulaşma səviyyəsi D - LID-in təyini üçün durulaşma seriyasının hazırlanması

F.1 Prinsip

Tullantı suyunu dərəcələndirilmiş durulaşma vasitəsi ilə sınaqdan keçirərkən heç bir inhibə və ya testə xas dəyişkənliyi aşmayan cüzi təsirlərin müşahidə olunmadığı sınaqdan keçirilmiş ən konsentratlı sınaq partiyası D ən aşağı təsirsiz durulaşma (LİD) kimi ifadə edilir. Bu durulaşma sınaq partiyasında tullantı suyunun həcm hissəsinin qarşılıqlı dəyəri kimi ifadə edilir [məs. tullantı suyunun tərkibi 4-də 1-dir sə (25% həcm hissəsi) qatılma səviyyəsi D = 4].

Hər durulaşma səviyyəsi və nəzarət üçün təkrarlara bərabər paylanmış ən azı 10 dəfə istifadə edin.

F.2 Nümunənin hazırlanması

Nümunələri 8.1-ə uyğun olaraq hazırlayın.

Hazırlandıqdan sonra nümunəni əl ilə silkələmək və ya maqnit qarışdırıcı ilə qarışdırmaqla homojenləşdirin.

Lazım olan durulaşma seriyasını hazırlayın. Cədvəl F.1-ə uyğun durulaşma seriyası tövsiyə olunur. Dərəcəli durulaşma vasitəsi ilə hazırlanır və iki həndəsi seriyanı (D = 2, 4, 8, 16 və s. və D = 3, 6, 12, 24 və s.) birləşdirir.

Cədvəl F.1 — Durulaşma seriyasının hazırlanması

Durulaşma	Durulaşma səviyyəsi D	Su nümunəsi (8.1) ml	Durulaşma suyu (6.3) ml
Nəzarət konteyneri			100
Test konteyneri			
1 də 1	1	100	—
2 də 1	2	50	50
3 də 1	3	33,33	66,67
4 də 1	4	25,0	85,0
6 da 1	6	16,67	83,33
8 də 1	8	12,5	87,5
12 də 1	12	8,33	91,67
16 da 1	16	6,25	93,75
24 də 1	24	4,17	95,83
32 də 1	32	3,13	96,87

QEYD Nümunənin seyreltmə seriyasının tərkibi (paralel təyinatlar üçün ümumi həcm, məs. 100 ml).

F.3 Prosedur

Testi 9-cu bəndə uyğun olaraq həyata keçirin.

F4 Neticələrin ifadəsi

11-ci bəndə uyğun olaraq nəticələri ifadə edin.

Test nəticəsi dafniyaların ən azı 90%-nin hərəkətli olduğu D (LIDD) üçün ən aşağı sınaqdan keçirilmiş dəyərdir. Bu durulaşma səviyyəsi nəticə olaraq müəyyən edilir.

LAYIHLƏ

Bibliography

Bibliografiya

- [1] ISO 15088:2007, *Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs* (Danio rerio)
- [1] ISO 15088:2007 *Suyun keyfiyyəti - Tullantı suyunun zebra balığı yumurtalarına kəskin toksikliyin təyini* (Danio rerio)
- [2] ISO/TS 20281:2006, *Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*
- [2] ISO/TS 20281:2006 *Su keyfiyyəti - Ekotoksosite məlumatlarının statistik şərhinə dair təlimat*
- [3] ISO 20665:2008, *Water quality — Determination of chronic toxicity to Ceriodaphnia dubia*
- [3] ISO 20665:2008 *Su keyfiyyəti - Ceriodaphnia dubia üçün xroniki toksikliyin təyini*
- [4] ENVIRONMENT DIRECTORATE. *Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2000. [OECD Series On Testing And Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6.] Available (viewed 2012-07-27) at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono\(2000\)6&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono(2000)6&doclanguage=en)
- [4] ƏTRAF MÜHİTƏ MÜDDRƏT. Çətin maddələrin və qarışıqların suda toksiklik sınaqlarına dair təlimat sənədi. Paris: İqtisadi Əməkdaşlıq və İnkişaf Təşkilatı, 2000. [OECD Seriyası Sınaq və Qiymətləndirmə No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6.] Əlçatandır (baxış tarixi: 27-07-2012): [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono\(2000\)6&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono(2000)6&doclanguage=en)
- [5] ENVIRONMENT DIRECTORATE. *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2006. [OECD Series On Testing And Assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18.] Available (viewed 2012-07-27) at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono\(2006\)18&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono(2006)18&doclanguage=en)
- [5] ƏTRAF MÜHİTƏ MÜDDRƏTİ. Ekotoksosite məlumatlarının statistik təhlilində mövcud yanaşmalar: Tətbiq üçün təlimat. Paris: İqtisadi Əməkdaşlıq və İnkişaf Təşkilatı, 2006. [OECD Seriyası Sınaq və Qiymətləndirmə No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18.] Əlçatandır (baxış tarixi: 27-07-2012): [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono\(2006\)18&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono(2006)18&doclanguage=en)
- [6] LITCHFIELD J.T. JR., WILCOXON F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1949, **96**, pp. 99–113
- [6] LITCHFIELD J.T. JR., WILCOXON F. *Doza effektiv təcrübələrin qiymətləndirilməsinin sadələşdirilmiş üsulu*. *J. Farmakol. Exp. Orada.* 1949, **96**, səh. 99–113
- [7] EBERT D. *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia* [Internet]. Bethesda, MD: US National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, 2005. Available (viewed 2012-07-27) from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2036/>
- [7] EBERT D. Daphniyada parazitizmin ekologiyası, epidemiologiyası və təkamülü [Internet]. Bethesda, MD: ABŞ Milli Tibb Kitabxanası, Milli Biotexnologiya Məlumat Mərkəzi, 2005. Əldə edilə bilər (27-07-2012): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2036/>
- [8] EPS1/RM/14:2000, *Biological test method: Reference method for determining acute lethality of effluents to Daphnia magna*. Available (viewed 2012-07-27) from: <http://www.ec.gc.ca/Publications/default.asp?lang=En&xml=F5504960-43B1-4CD5-B49C-2D1B1050AAC8>
- [8] EPS1/RM/14:2000, Bioloji sınaq metodu: Dafnia magna-ya tullantı sularının kəskin ölümcüllüyünü təyin etmək üçün istinad metodu: <http://www.ec.gc.ca/Publications/default.asp?lang=En&xml=F5504960-43B1-4CD5-B49C-2D1B1050AAC8> ünvanından (27-07-2012-ci il tarixində baxılıb) mövcuddur
- [9] GREENE J.C., BARTELS C.L., WARREN-HICKS W.J., PARKHURST B.R., LINDER G.L., PETERSON S.A., MILLER, W.E. (1988). *Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites*. Corvallis,

OR: US Environmental Protection Agency, 1988. 102 p. (Report No: EPA/600/3-88/029.)

- [9] GREENE J.C., BARTELS C.L., WARREN-HICKS W.J., PARKHURST B.R., LINDER G.L., PETERSON S.A., MILLER, W.E. (1988). Təhlükəli tullantı sahələrinin qısamüddətli toksiklik müayinəsi üçün protokollar. Corvallis, OR: ABŞ Ətraf Mühitin Mühafizəsi Agentliyi, 1988. 102 s. (Hesabat №: EPA/600/3-88/029.)
- [10] OFFICE OF TOXIC SUBSTANCES. *Daphnid acute toxicity test*. Washington, DC: U.S Environmental Protection Agency, 1982. (Document EG-1/ES-I.)
- [10] ZƏHƏRLİ MADDƏLƏR OFİSİ. Daphnid kəskin toksiklik testi. Vaşinqton, DC: ABŞ Ətraf Mühitin Mühafizəsi Agentliyi, 1982. (Sənəd EG-1/ES-I.)
- [11] PELTIER W.G., WEBER C.I., editors. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*, 3rd edition. Cincinnati, OH: US Environmental Protection Agency. 231 p. (Report EPA 600/4-85-013.)
- [11] PELTIER W.G., WEBER C.I., redaktorlar. Şirin su və dəniz orqanizmləri üçün çirkab suların kəskin toksikliyinə ölçülməsi üsulları, 3-cü nəşr. Cincinnati, OH: ABŞ Ətraf Mühitin Mühafizəsi Agentliyi. 231 səh. (Report EPA 600/4-85-013.)
- [12] POSTMA J.F., DE VALK S., DUBBELDAM M., MAAS J.L., TONKES M., SCHIPPER C.A. *et al.* Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2002, **53** pp. 226-237
- [12] POSTMA J.F., DE VALK S., DUBBELDAM M., MAAS J.L., TONKES M., SCHIPPER C.A. və b. Şirin su və dəniz orqanizmləri ilə bioanalizlərdə çəşdirici amillər. *Ekotoksikol. Ətraf. Saf.* 2002, 53 səh. 226-237
- [13] ISO 5725-2, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*
- [13] ISO 5725-2, *Ölçmə üsullarının və nəticələrinin dəqiqliyi (həqiqiliyi və dəqiqliyi) - 2-ci hissə: Standart ölçmə metodunun təkrarlanma və təkrarlanma qabiliyyətinin müəyyən edilməsi üçün əsas üsul*

LAYIHE

LAYKIHØ