



جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۸۶۹۶-۲

چاپ اول

ISIRI

8696-2

1st.edition

**کیفیت آب – تعیین میزان سمیت حاد کشنده
مواد موجود در آب برای ماهیان آب شیرین –
قسمت دوم : روش آزمون نیمه ثابت**

**Water quality – Determination of
the acute lethal toxicity of
substances in water to a freshwater
part 2: semi-static method**

« بسمه تعالی »

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد. پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادات در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ و منتشر می گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره (۵) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردها کالاهای صادراتی و درجه بندی آنها اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران : کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

دفتر مرکزی : تهران - ضلع جنوبی میدان ونک - صندوق پستی : ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج: ۰۲۶۱-۲۸۰۶۰۳۱-۸

تلفن مؤسسه در تهران: ۰۲۱-۸۸۷۹۴۶۱-۵

دورنگار: کرج ۰۲۶۱-۲۸۰۸۱۱۴ - تهران ۰۲۱-۸۸۸۷۰۸۰-۸۸۸۷۱۰۳

بخش فروش - تلفن: ۰۲۶۱-۲۸۰۷۰۴۵ - دورنگار: ۰۲۶۱-۲۸۰۷۰۴۵

پیام نگار: Standard @ isiri.or.ir

بهاء ۱۶۲۵ ریال

- Headquarters:** Institute Of Standards And Industrial Research Of Iran
P.O.Box : 31585-163 Karaj – IRAN
- Tel (Karaj):** 0098 (261) 2806031-8
- Fax (Karaj):** 0098 (261) 2808114
- Central Office:** Southern corner of Vanak square, Tehran
P.O.Box : 14155-6139 Tehran-IRAN
- Tel (Tehran):** 0098 21 8879461-5
- Fax (Tehran):** 0098 21 8887080, 8887103
- Email:** Standard @ isiri.or.ir
- Price:** 1625 RLS

کمیسیون استاندارد "کیفیت آب- تعیین میزان سمیت ماد کشنده مواد موجود در آب برای ماهیان آب شیرین - قسمت دوم : روش آزمون نیمه ثابت"

رئیس

نیک پور قنواتی ، یداله
(دکترای شیمی)

سمت یا نمایندگی

دانشگاه علوم دریائی خرمشهر

اعضاء

اسدزاده ، علی
(دکترای دامپزشکی)

سمت و سازمان

سازمان شیلات ایران

پهلوان یلی ، مرتضی
(فوق لیسانس شیلات)

سازمان شیلات ایران

زارعی ، ماندانا
(فوق لیسانس بیولوژی)

دانشگاه علوم دریایی خرمشهر

فلاح، مهین
(لیسانس میکروبیولوژی)

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان خوزستان

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

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

مرادی ، نادر
(فوق لیسانس شیمی)

اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی شهرستان خرمشهر

یاوری ، وحید
(دکترای بیولوژی ماهیان دریا)

دانشگاه علوم دریایی خرمشهر

دبیر

حسین زاده ، فرشته

اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی شهرستان خرمشهر

(لیسانس مهندسی شیمی - صنایع غذایی)

فهرست مندرجات

صفحه

ب	پیش گفتار
پ	مقدمه
۱	هدف و دامنه کاربرد
۱	اساس آزمایش
۲	موجودات آزمایشی و واکنش گر ها
۴	وسایل
۴	محیط آزمایش
۵	روش کار
۷	بیان نتایج
۱۰	گزارش آزمایش
۱۱	پیوست الف- شاخص های محیطی برای حفظ و تولید مثل ماهی مخطط- اطلاعاتی
۱۳	پیوست ب- فرم پیشنهادی برای ثبت اطلاعات- اطلاعاتی

پیش گفتار

استاندارد کیفیت آب- تعیین میزان سمیت حاد کشنده مواد موجود در آب برای ماهیان آب شیرین- قسمت دوم: روش آزمون نیمه ثابت که توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در پانصد و هشتاد و هشتمین اجلاس کمیته ملی استاندارد مورخ ۱۳۸۵/۱۰/۱۲ مورد تصویب قرار گرفته اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استاندارد های ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوطه مورد توجه قرار خواهد گرفت. برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد.

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استانداردهای ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

منبع و مأخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1-DIN ISO 7346-2 : 1998 Water quality- Determination of the acute lethal toxicity of substances in water to a freshwater fish part 2(semi static method).

مقدمه

سه بخش این استاندارد ملی ایران، روش های سنجش میزان سمیت حادکشنده مواد برای ماهی گورخری (مخطط)^۱ شرح داده است. اما باید تأکید گردد، که پیشنهاد این ماهی دلیل بر عدم استفاده از گونه های دیگر ماهی نمی باشد. روش های ارائه شده می تواند با تغییرات مناسب، برای مثال: تغییر کیفیت آب و تغییر شرایط دمایی آزمایش، برای دیگر گونه های ماهی آب شیرین، شور و لب شور مورد استفاده قرار گیرد.

در بین سه بخش این استاندارد، می توان از این سه روش، یعنی روش ثابت (ماندابی)^۲، نیمه ثابت (نیمه جریان دار) و گردش (جاری)^۳، یکی را انتخاب کرد. آزمایش آزمون ثابت که در بخش اول این استاندارد شرح داده شده است و در آن محلول تغییر نمی کند دارای این امتیاز است، که نیاز به ابزار آلات ساده دارد و نیازی به معرف های زیادی ندارد، هر چند که موادی که در ظرف آزمایش هستند ممکن است در طول مدت زمان آزمایش کاهش یافته و همچنین کیفیت کلی آب کاهش یابد. استفاده از روش گردش شرح داده شده در بخش سوم این استاندارد ملی ایران که در آن محلول آزمایشی مرتباً تعویض می گردد، احتیاج به تجهیزات پیچیده تر دارد، ولیکن مشکلات مطرح شده را برطرف می کند.

در روش نیمه ثابت شرح داده شده در قسمت دوم این استاندارد محلول های آزمایش هر ۲۴ یا ۴۸ ساعت یکبار عوض می شود (این روش حد واسط روش های دیگر است).

روش گردشی رامی توان برای اکثر انواع مواد، شامل مواد ناپایدار در آب استفاده کرد، اما غلظت مواد آزمایشی را تا حد امکان باید مشخص کرد. روش ثابت، محدود به مطالعه موادی است که غلظت آزمایش شده آنها طی دوره آزمایش نسبتاً ثابت باقی بماند. روش نیمه ثابت برای مطالعه موادی است که می توان غلظت آنها را طی آزمایش با تجدید محلول ها هر ۲۴ یا ۴۸ ساعت یکبار ثابت نگهداشت، برای مواد بسیار ناپایدار یا فرار در نظر گرفتن تمهیدات ویژه ضروری است. برای تسهیل آماده سازی و حفظ غلظت های موادی که ممکن است در غلظت های نزدیک به غلظت حلالیت طبیعی آنها در آب کشنده باشد، می توان طبق موارد ذکر شده در روش های سه گانه این استاندارد، مقدار اندکی نیز ماده حلال به محلول آزمایشی افزود.

1- *Brachydanio rerio* Hamilton- Buchanan (Teleostei, Cyprinidae).

2- Static method

3- Semi-static method

4- Flow-through method

کیفیت آب- تعیین میزان سمیت مادکشنده مواد موجود در آب

برای ماهیان آب شیرین

قسمت دوم: روش آزمون نیمه ثابت

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین و ارائه یک روش نیمه ثابت 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 ماهی گورخری (مخطط) می باشد. این روش برای بررسی سطوح مختلف سمیت حاد کشنده هر ماده برای ماهی گورخری، در شرایط این آزمایش، قابل استفاده است و برای استفاده از گونه های دیگر نیز کاربرد دارد.

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

یادآوری ۲- این روش رami توان با اعمال اصلاحاتی در شرایط آزمایش بویژه با تغییر کمیت و کیفیت آب مورد استفاده برای رقیق کردن غلظت ها و دمای محیط آزمایشی، برای سایر گونه های ماهیان آب شیرین، دریایی و لب شور، مورد استفاده قرار داد.

۲ اساس آزمایش

تعیین غلظت ماده، تحت شرایط معین که برای ۵۰ درصد از کل جمعیت مورد آزمایش از ماهی گورخری که به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و برای آب جاری ۷۲ و ۹۶ ساعت، در معرض آن ماده و آب با کیفیت ثابت بوده اند، کشنده باشد. این غلظت های کشنده متوسط بانام های $LC^{۵۰}$ ، $LC^{۲۵}$ ، $LC^{۵۰}$ ، $LC^{۷۵}$ ، $LC^{۵۰}$ ، $LC^{۷۵}$ ، $LC^{۵۰}$ ، $LC^{۷۵}$ باشد. مشخص شده اند. این روش، در دو مرحله به شرح زیر انجام می گیرد:

1- *Brachydanio ririo* Hamiltin Buchanan (Teleostei, Cyprinidae).

2- Lethal Concentration

الف- در آزمایش مقدماتی حدود تقریبی^۱ متوسط غلظت کشنده مواد مشخص می شود، که این امر به تعیین دامنه غلظت ها در آزمایش نهایی کمک می کند.

ب- آزمایش نهایی که نتایج آن قابل گزارش دادن می باشد.

هنگامی که غلظت اندازه گیری شده دارای اختلاف کمتری معادل ۲۰ درصد با غلظت اسمی باشد یعنی غلظت اندازه گیری شده از ۸۰ و ۱۲۰ درصد غلظت اسمی به ترتیب کمتر یا بیشتر نباشد میتوان هر کدام از آن غلظتها (غلظت اسمی و یا غلظت اندازه گیری شده) را به عنوان غلظت LC ۵۰ گزارش نمود.

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 می شود غلظت ماده شیمیایی مورد آزمایش به میزان قابل ملاحظه ای کاهش یافته است، در چنین حالتی بدون توجه به اینکه تحلیل شیمیایی داده ها وجود داشته یا نداشته باشد، نمی توان برای تعریف LC ۵۰ از این روش آزمایش استفاده کرد. در این موارد ارزش و اعتبار آزمایش و نتایج آن ضرورتاً نقض نمی شود بلکه تنها میتوان مقدار شاخص LC ۵۰ را بصورت $x \text{ mg/l} \leq$ عنوان نمود که مقدار x نیز با توجه به غلظت های اسمی مورد استفاده در آزمایش تعیین می شود.

۳ موجدات آزمایشی و واکنش گرها

۳-۱ واکنش گرها باید خلوص بالایی داشته باشند و آب مورد استفاده برای آماده سازی محلول، آب مقطر یا آب یون زدایی شده، یا آبی با خلوص معادل آن باشد.

۳-۲ موجد مورد آزمایش

گونه مورد آزمایش باید از خانواده کپور ماهیان از زرده ماهیان استخوانی که به عنوان ماهی گورخری (مخطط) معروف است، باشد. هر ماهی مورد آزمایش باید 50 ± 30 mm طول داشته باشد، که در اصل با وزن $1/3 \pm 0/3$ gr مطابقت دارد. آنها باید همه از یک جمعیت انتخاب شده باشند و در هر حالت حداقل برای مدت ۷ روز پیش از انجام آزمایش در آب مورد استفاده برای آزمایش تحت شرایط کیفی آب ورژیم نوری مشابه با شرایط آزمایش نگهداری شده باشند و به طور مداوم هوادهی شوند (طبق بند ۳-۲).

ماهیان باید تا ۲۴ ساعت 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، ماهی های 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.

۳-۲ روش استاندارد جهت تهیه آب مورد آزمایش

pH آب آزمایش، باید $7/8 \pm 0/2$ و سختی آن تقریباً ۲۵۰ (میلی گرم بر لیتر) بر حسب کربنات کلسیم باشد.

غلظت نمک های حل شده در این آب، باید بصورت جدول زیر باشند:

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

جدول ۱- غلظت نمک های مل شده

هوادهی آب باید به اندازه ای باشد که غلظت اکسیژن محلول حداقل به ۹۰ درصد مقدار اشباعی برسد. pH باید در حد ثابت $7/8 \pm 0/2$ نگهداشته 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 شده است، نباید پیش از آغاز آزمایش، هوادهی بیشتری روی آن انجام شود.

۳-۳ مملول 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 یون زدایی شده، تهیه شود. برای تهیه و آماده سازی محلول های ذخیره و راحتی انتقال آنها به ظروف آزمایشگاهی و برای مواد با حلالیت کم و همگن نمودن محلولها 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 آنها در محلول آزمایشی نباید از $0/1 \text{ gr/l}$ یا $0/1 \text{ ml/l}$ بیشتر باشد. وقتی از حلال استفاده می شود، دوشاهد برای کنترل لازم است، یک ظرف شامل حلال با حداکثر غلظت استفاده شده و دیگری بدون حلال یا ماده آزمایشی.

۳-۴ مملول های آزمایش

محلول های آزمایش با اضافه کردن مقدار مناسبی از محلول ذخیره آزمایشی به آب موجود در محیط آزمایش درست می شود، تا غلظت مناسب به دست آید. توصیه می شود، که در هنگام تهیه محلول آزمایش با آب مقطر یا آب یون زدایی شده، نباید بیش از ۱۰۰ میلی لیتر از محلول ذخیره را برای ده لیتر از آب رقیق کننده به کار برد.

1-Stock Solutions

۲- بر حسب چگالی حلال هر کدام که بیشتر است باید مبنای قرار گیرد.

۴ وسایل

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

۴-۱ ظروف آزمایش

ظروف آزمایش با گنجایش مناسب (که ممکن است بر حسب نیاز بیش از ۱۰ لیتر گنجایش داشته باشند) و می بایست دارای سطح زیادی باشند که امکان تبادل هوا و محلول آزمایش به آن (در حدود ۸۰۰ سانتی متر مربع برای ۱۰ لیتر از محیط آزمایش وجود داشته باشد) و مجهز به درپوشی محکم باشند. حجم ظروف آزمایشگاهی باید کافی باشد، به طوری که، برای هر گرم ماهی ۱ لیتر آب مورد استفاده قرار گیرد، و این نسبت نباید در طول مدت انجام آزمایش افزایش یابد. پیش از استفاده، این ظروف باید 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 باروش مناسبی درجه حرارت محلول آزمایش و آب مخزن را تا 1 ± 23 درجه سلسیوس تنظیم کند.

۴-۳ تور ملاقه ای

این تور از نایلون یا دیگر موادی 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 محلول ها، نگهداری ماهی و تمام فعالیت ها و آزمایش ها باید در فضایی انجام شوند، که هوای آن عاری از مقادیر مضر مواد آلاینده موجود باشد. ضمناً باید از هرگونه مزاحمت ناخواسته یا پیش بینی نشده که رفتار ماهیان را تغییر دهد، جلوگیری کرد. تمام آزمایش ها باید در روشنایی طبیعی آزمایشگاه با دوره نوری ۱۲ تا ۱۶ ساعت در روز، انجام گیرد.

یادآوری ۱- برای جلوگیری از هر نوع اختلال و آسیب ناخواسته که ممکن است رفتار ماهیان را تغییر دهد، احتیاط به عمل آید.

۶ روش کار

۶-۱ شرایط ماهی

هرگاه تغییری در جمعیت ماهیان، مشاهده شد باید به روش مشخص شده در این استاندارد ملی ایران و با استفاده از یک ماده شیمیایی مرجع مناسب مانند: دی کرومات پتاسیم ($K_2Cr_2O_7$) آزمایش تعیین سمیت انجام شود. نتایج این قبیل آزمایش ها باید با نتایج آزمایشاتی که پیش تر در همان آزمایشگاه انجام شده است

همخوانی داشته باشد. ماهی نمونه نباید پیش از آن مورد آزمایش قرار گرفته باشد، و دمای آب مخازن باید در دمای $23 \pm 1^\circ\text{C}$ درجه سلسیوس، ثابت نگهداشته شود.

۶-۲ آزمایش تعیین حد سمیت

با استفاده از روش کار شرح داده شده در این استاندارد ملی ایران، برای مشخص کردن اینکه LC_{50} در ۹۶ ساعت، بیشتر از غلظت ماده مورد نظر در حالت انحلال طبیعی است، می توان یک مرحله آزمایش تعیین حد سمیت را در شرایط آزمایشگاه و در غلظت های حلالیت طبیعی در آب و حتی 100 mg/l انجام داد. در صورتی که ماهیان در آزمون سمیت نمیرند، انجام آزمایش های دیگر ضرورت ندارد. برای انجام آزمایش تعیین حداکثر غلظت و همچنین برای شاهد، از تعداد ۱۰ ماهی استفاده کنید.

یادآوری ۱- نظریه دو جمله ای نشان می دهد، که وقتی از تعداد ۱۰ ماهی استفاده می شود، بدون هیچ گونه مرگ و میری با اطمینان ۹۹/۹ درصد LC_{50} در مدت زمان ۹۶ ساعت بیش از غلظت حد آزمایش است. در صورت بروز مرگ و میر در ماهی، مطالعه کامل بندهای ۶-۳ و ۶-۴، ضروری است و در صورت مشاهده اثرات ماده سمی، مشاهدات را باید ثبت و گزارش نمود.

۶-۳ آزمایش مقدماتی (اولیه)

حداقل $2/5$ لیتر و ترجیحاً ۵ لیتر آب به هر کدام از شش ظرف آزمایش اضافه کرده و لزوماً برای تنظیم غلظت اکسیژن حل شده به مقدار حداقل ۹۰ درصد اشباعی آن، هوا داده شوند برای تهیه محلول های آزمایش مقدار مناسبی از محلول ذخیره ماده آزمایش را طوری به ۵ ظرف آزمایش اضافه کنید که از رابطه بازه غلظت های لگاریتمی^۲ به عنوان مثال: 1000 mg/l ، 100 mg/l ، 10 mg/l ، 1 mg/l ، $0/1 \text{ mg/l}$ ، بدست آید.

به ظرف ششم چیزی اضافه نشود تا به عنوان ظرف شاهد به کار برده شود درجه حرارت محلول ها باید در محدوده دمای $23 \pm 1^\circ\text{C}$ درجه سلسیوس تنظیم و حفظ شده و طی آزمایش نباید بیش از حد مجاز

1-Binomial theory

2-Geometric rang

هوادهی شوند. در هر ظرف تعداد ۳ ماهی قرار داده شود. بعد از گذشت ۲۴ یا ۴۸ ساعت محلول های آزمایشی تازه ای در ظرف های جدید آزمایشی تهیه کرده و بی درنگ ماهی زنده را به آن منتقل شود. تا پایان آزمایش مقدماتی این کار هر ۲۴ یا ۴۸ ساعت یک بار تکرار شود. حداقل ۲ بار در روز، تعداد ماهی مرده و غلظت اکسیژن حل شده در هر ظرف را یادداشت کرده و ماهیان مرده برداشته شود. اگر داده های کافی برای تخمین دامنه غلظت های مورد نیاز برای آزمایش نهایی، وجود نداشته باشد، آزمایش مقدماتی (اولیه) با گروه غلظت های جایگزین، تکرار شود.

یادآوری ۲- منظور از بازه غلظت های لگاریتمی وجود رابطه لگاریتمی یا تصاعد هندسی در بین غلظت های یک ماده است.

۶-۴ آزمایش نهایی

حداقل پنج غلظت انتخاب شده، برای مثال: 1 mg/l ، 2 mg/l ، 4 mg/l ، 8 mg/l ، $10/5 \text{ mg/l}$ اما این مجموعه باید شامل پایین ترین مقدار غلظت کشنده تمام ماهی هادر آزمایش مقدماتی و بالاترین غلظت غیر کشنده در مدت

زمان ۹۶ ساعت نیز باشد. این مجموعه منتخب غلظت ها باید احتمال به دست آمدن درصد مرگ و میر ماهی از صفر تا ۱۰۰ درصد را در حداقل دو غلظت فراهم کند، که برای تخمین LC₅₀ با استفاده از روش صحیح لازم است. در بعضی موارد، ممکن است به دامنه محدود تریا وسیعتری از غلظت ها برای فراهم کردن اطلاعات، نیاز باشد. ظرف آزمایش را برداشته و در هر کدام به عنوان مثال: ۱۰ لیتر آب آزمایش استاندارد ریخته شود، در ظرف شاهد چیزی اضافه نشود، اما در بقیه آنها به ترتیب مقادیر مختلفی از محلول ذخیره مورد نیاز برای تهیه غلظت های مورد نظر از ماده انتخاب شده برای آزمایش، اضافه شود. در صورت استفاده از حلال آلی برای حل کردن ماده، ظرف کنترل دوم را با آب آزمایش استاندارد که محتوی حداکثر غلظت حلال به کار رفته است، تهیه شود. در زمان تنظیم محلول آزمایش باید در دمای $1 \pm 23^{\circ}\text{C}$ درجه سلسیوس باشد و حداقل تعداد ۷ ماهی در هر ظرف قرار داده شود. با استفاده از یک تورریز 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 - ۳) و هر ماهی که در زمان انتقال به ظروف، افتاده یا آسیب دیده کنار گذاشته شود. تمام ماهیان طی مدت زمان ۳۰ دقیقه به ظروف اضافه شوند. بعد از گذشت ۲۴ یا ۴۸ ساعت محلول های آزمایشی تازه را در ظرف های جدید آماده کرده و ماهی های زنده بلافاصله به آنها منتقل شده و این کار هر ۲۴ یا ۴۸ ساعت یک بار تکرار شود. حداقل ۲ بار در روز، تعداد ماهی مرده و غلظت اکسیژن حل شده در هر ظرف را یادداشت کرده و ماهیان مرده برداشته شود. اگر داده های کافی برای تخمین دامنه غلظت های مورد نیاز برای آزمایش نهایی، وجود نداشته باشد، آزمایش مقدماتی (اولیه) با گروه غلظت های جایگزین، تکرار شود.

محلول ها نباید زیاده‌واهی شوند، حداقل یک بار در روز طی دوره آزمایش تعداد ماهی های مرده در ظرف ثبت شود. هر چه سریع تر ماهی مرده از ظرف برداشته شود و دفعات مشاهده بیشتر گردد. برای مثال: حد متوسط دوره زندگی ماهی در هر غلظت محاسبه شود، و هرگونه رفتار غیر طبیعی ماهی زیر نظر گرفته شود. در صورت ثابت بودن ماده در طول دوره، تا حد امکان غلظت ماده آزمایشی در ظروف آزمایش حداقل در ابتدا و انتهای آزمایش، اندازه گیری شود. غلظت اکسیژن محلول، مقدار pH و دمای هر ظرف حداقل یکبار در روز و در آغاز و پایان آزمایش، اندازه گرفته شود. تغییرات دما و pH محلول های آزمایش، نباید بیش از $1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ باشند. فرم پیشنهادی مناسب برای ثبت اطلاعات در پیوست ب این استاندارد ارائه شده است. این کار باید هر ۲۴ یا ۴۸ ساعت یک بار تکرار شود. برای جلوگیری از انتقال ماده آزمایشی بین ظروف آزمایشی توسط تورملاقه ای (بند ۴-۳) باید انتقال ماهی ابتدا از غلظت های پایین شروع شده و به ترتیب به غلظت های بالاتر منتقل شود.

۷ بیان نتایج

۷-۱ صمت

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 اشباعی باشد.

۷-۱-۲ غلظت ماده آزمایش در طی آزمایش کاهش نیافته باشد.

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

۷-۱-۴ نسبت رفتار غیر طبیعی در ماهیان ظرف شاهد نباید بیشتر از ۱۰ درصد، یایک ماهی در هر مخزن باشد.

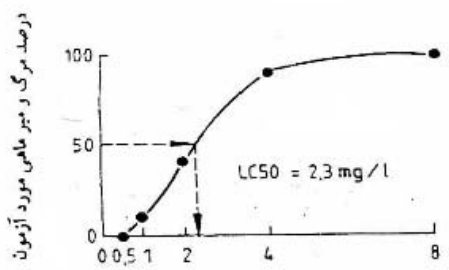
۷-۱-۵ میزان LC ۵۰ در مدت زمان ۲۴ ساعت برای یک ماده شیمیایی به عنوان مثال: دی کرومات پتاسیم برای مخزن ماهی بانتهای به دست آمده قبلی، در همان آزمایشگاه همخوانی داشته باشد.

۷-۲ برآورد LC ۵۰

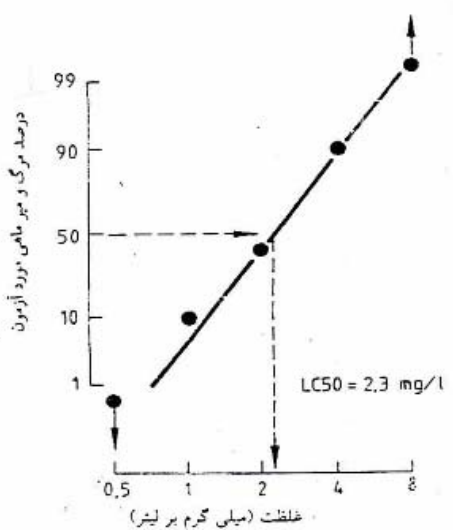
از آنجائی که برآورد نموداری از LC ۵۰ مناسب به نظر میرسد، این کار را می توان با ترسیم نمودار و قرار دادن درصد مرگ و میر ماهی در برابر غلظت ماده آزمایش نشان داد. در این نمودار مرگ و میر ماهی به صورت درصد بیان می شود.

رابطه بین میزان درصد مرگ و میر ماهی و غلظت به صورت یک نمودار سیگموئیدی است که با استفاده از این نمودار از روی ۵۰ درصد مرگ و میر ماهی به غلظت LC ۵۰ دست می یابیم (شکل ۱ را ببینید و به آن مراجعه کنید).
بهتر است اطلاعات روی کاغذ شرطرنجی با محورهای لگاریتمی و در مقیاسهای مناسب رسم شود. اطلاعات رسم شده به این شکل، باید یک رابطه خطی را نشان دهند که بتوان به روش بالا LC ۵۰ را از آن به دست آورد. (شکل ۲ را ببینید و به آن مراجعه کنید).

در صورت وجود رایانه تجزیه و تحلیل صحیح تری می تواند انجام گیرد. در صورت عدم وجود اطلاعات کافی برای برآورد کردن LC ۵۰ در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت و در صورت امکان ۷۲ و ۹۶ ساعت، حداقل غلظتی که در آن صد درصد مرگ و میر ماهی رخ داده باشد و حداکثر غلظتی که در مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت هیچ مرگ و میری در ماهی ها نبوده باشد، ثبت شود. این غلظت ها محدوده ای را که احتمالاً LC ۵۰ در آن قرار دارد، نشان خواهند داد.



غلظت (میلی گرم بر لیتر)



شکل ۲- نمودار لگاریتمی LC50

۸ گزارش آزمایش

گزارش آزمایش باید دارای آگاهی های زیر باشد:

- ۸-۱ روش آزمایش طبق استاندارد ملی ایران ۲-۸۶۹۶: سال ۱۳۸۶
- ۸-۲ خواص شیمیایی ماده مورد آزمایش و هرگونه اطلاعات موجود اضافی در رابطه با آن (مانند: حلالیت در آب، فرار بودن، ضریب تقسیم آب بر حسب اکتان و سرعت تجزیه).
- ۸-۳ روش آماده سازی آب رقیق سازی، محلول ذخیره و محلول آزمایش.
- ۸-۴ تمام داده های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مربوط به آزمایش که در این قسمت از استاندارد ملی مشخص نشده، شامل جزئیات شرایط سازگاری ماهی و وزن ماهیان بر حسب گرم در لیتر.
- ۸-۵ اطلاعاتی به شرح زیر که در ارزیابی به صحت آزمایش باید در نظر گرفته شود:
 - ۸-۵-۱ غلظت اکسیژن.
 - ۸-۵-۲ مرگ و میر مشاهده شده در ماهیان شاهد.
 - ۸-۵-۳ نسبت رفتار غیر طبیعی در ماهی شاهد.
 - ۸-۵-۴ LC_{۵۰} ماده (ماده شیمیایی مورد استفاده).
- ۸-۶ فهرست جدول بندی شده که نشان دهنده غلظت اسمی ماده آزمایش شده (بارزیابی های تحلیلی شیمیایی موجود) و کل درصد مرگ و میر ماهی در هر ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از آغاز آزمایش باشد.
- ۸-۷ مقدار LC_{۵۰} و محدوده های اطمینان آن در ۲۴h، ۴۸h، ۷۲h، ۹۶h از ماده آزمایشی و روش محاسبه و روش آنالیز شیمیایی به کار برده شده، نیز نوشته شود.
- ۸-۸ شیب منحنی و در صورت امکان محدوده ۹۵ درصد اطمینان آن.
- ۸-۹ هرگونه واکنش غیر معمولی ماهی در طول آزمایش و هر نوع تأثیر خارجی تولید شده توسط ماده آزمایش.
- ۸-۱۰ نمایش نموداری رابطه (پاسخ-غلظت).
- ۸-۱۱ هرگونه جدول از شیوه عمل مشخص شده در استاندارد ملی ایران ۲-۸۶۹۶: سال ۱۳۸۶ و دلیل آن.

پیوست الف

شأنصهای ممیطی برای مفا و تولید مثل ماهی گور فری

(اطلاعاتی)

الف-۱ کلیات

این گونه ماهی بومی ساحل کورومندل در هندوستان است که با جریان های آبی در آنجا سازش یافته است. این گونه ماهی آکواریومی شناخته شده است. بنابراین اطلاعات مربوط به روشهای پرورش این گونه را می توان در کتاب های مرجع استاندارد در مورد پرورش ماهی گرمسیری یافت. اخیراً زیست شناسی این گونه ماهی توسط لالی^۱ بررسی شده است. طول این ماهی به ندرت از ۴۵ میلی متر بیشتر میشود. بابدنی استوانه ای با ۷ تا ۹ خط افقی آبی تیره بر روی پوستی نقره ایی این خطوط به باله های دمی و مخرجی می رسند و پشت ماهی سبز زیتونی است. نرها چسبیده تر از ماده ها هستند و رنگشان طلایی درخشنده است. ماده ها به رنگ نقره ای ترو شکمی متورم به ویژه قبل از تخم ریزی دارند.

الف-۲ شأنصهای ممیطی

این ماهی قابلیت تحمل دما و pH و سختی آب رادار است. اکسلراد^۲ گفته است که دامنه دمایی بین ۱۵/۵ تا ۲۳/۳ درجه سلسیوس و pH ۷/۲ تا ۶/۶ است. این ماهی در آب با سختی بالای ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر بحسب کربنات کلسیم و pH ۷/۷ تا ۸/۲ تولید مثل کرده و پرورش داده می شود. درجه حرارت در $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ درجه سلسیوس حفظ شده و برای ترغیب به تخم ریزی تا $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ افزایش داده شود.

الف-۳ مواد و روشها

این ماهی براحتی در مخازن شیشه ایی با گنجایش ۷۰ لیتر تخم ریزی میکند. بعد بچه ماهی ها به مخزنی با گنجایش ۲۰۰ لیتر منتقل می شوند. از آنجایی که ماهی های بالغ تخم خوارند، روش حفظ تخم ها و بچه ماهی ها ضروری است. یک روش که با موفقیت انجام شده، این است که ماهیهای بالغ را در قفس های شبکه ایی محبوس کرده و به هنگام تخم ریزی ماده ها، تخم ها از شبکه به ته مخزن سرازیر شده و از دسترس ماهیهای بالغ دور می مانند. قفسه های شبکه ایی از پلاستیکی، که اندازه شبکه^۳ هر یک به اندازه ۳ میلی متر و به ابعاد تقریبی ۲۵۰ میلی متر در ۲۵۰ میلی متر در ۸۰ میلی متر ساخته می شود.

1-LAAL, H.W. The biology and use of zebra fish (*Brachydanio rerio*) in fisheries research

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

3-mesh

این شبکه ها به لبه های مخزن متصل شده به طوری که تمام لبه بالایی قفس بالای آب است و قسمت شبکه ای ۶۰ میلی متر در آب فرو می رود برای تمیز کردن آب نباید از سیستم تصفیه شنی استفاده کرد چون باعث از بین رفتن تخم ها می شود، مخزن باید ۸ ساعت در روز نوردهی شود.

الف-۴ شرایط پرورش

این مرحله تقریباً دو هفته به طول می انجامد. نرها و ماده ها جدا شده و به آنها غذای زنده داده می شود که شامل کرم های سفید، دافینیا و آرتمیا است. برای پرورش، هر ۳۰ ماهی در یک مخزن ۷۰ لیتری قرار داده می شوند. در پایان هفته دوم، نرها رنگ طلایی درخشانده و ماده ها باردار هستند. (ماده ها باشکمی پراز تخم، متورم به نظری رسند)

الف- ۵ مرحله تولید مثل

مخزن تخم ریزی را می توان به روش زیر آماده کرد:

یک مخزن خالی را برای ۴۸ ساعت با آب آشامیدنی به دمای ۲۷ درجه سلسیوس پر کرده و به یک قفس پلاستیکی در داخل تانک آب قرار داده به طوریکه تالبه فاصله داشته باشد و فضای حدود یک لیتر برای شنای ماهیان در نظر گرفته شود. ۶ ماده را صبح هنگام در سبد قرار داده و به آنها آرتمیای خشک و منجمد خوراند می شود. سپس ۹ نر را اول شب به آنها اضافه کرده و یک بار دیگر قبل از خاموش کردن چراغها به آنها غذا داده می شود. تخم ریزی در نور صبحگاهی القا شده و بعد از روشن شدن چراغها پس از ۴ ساعت این کار تمام می شود. تخم ها که چسبنده نیستند از شبکه پایین افتاده و از دسترس ماهی های بالغ دور می ماند. به هنگام تمام شدن کار تخم ریزی، ماهی های بالغ برداشته شده و به بیچه ماهی ها اجازه داده می شود که از تخم بیرون آیند.

الف- ۶ رشد بیچه ماهی ها

بیچه ماهی ها در ۴ تا ۵ روز از تخم خارج شده و برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت به دیواره های مخزن چسبیده باقی می مانند. بعد از شروع شنا کردن با تکه های کوچک ماهی تغذیه می شوند. بعد از ۳ هفته به آنها آرتمیای داده شده و رشد آنها سریع تر می شود، بعد از یک ماه به مخازن ۲۰۰ لیتری منتقل داده شده و به آنها مخلوطی از جگروغذای آماده داده می شود. ماهیان طی سه ماه از نظر جنسی بالغ شده و طول آنها به ۳/۵ سانتی متری می رسد. باید گفت که در برخی گونه های معین در مرحله رشد اختلالات رشدی قابل ملاحظه ای مشاهده شده است. مطالعات بعدی نشان می دهد که رژیم غذایی عامل این نقص ها است و ماهی گورخری به ویژه به این عامل حساس است (دیگر گونه ها به هنگام تغذیه با همان خوراک به طور طبیعی تولید مثل می کنند).

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)							
عوامل موثر				زمان از شروع آزمایش(ساعت)			
غلظت اکسیژن محلول بر حسب درصد ASV							
PH							
دما							
تعداد ماهی مرده							
آب رقیق شده				حلال			
میلی لیتر بر لیتر							
عوامل موثر				زمان از شروع آزمایش(ساعت)			
غلظت اکسیژن محلول بر حسب درصد ASV							
PH							
دما							
تعداد ماهی مرده							
شماره ظرف آزمایش				حلال			
اندازه گیری یا محاسبه اولیه غلظت ماده آزمایشی							
عوامل موثر				زمان از شروع آزمایش(ساعت)			
غلظت اکسیژن محلول بر حسب درصد ASV							
PH							
دما							
تعداد ماهی مرده							

ICS: 13.060.70

صفحة : ١٣
