

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه سیستم مدیریت ایزو با هدف بهبود مستمر عملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی بر آن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگار کنید...





جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran  
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران  
۱۵۶۳۱  
چاپ اول  
۱۳۹۷

INSO  
15631  
1st Edition  
2019

Identical with  
ISO 20666:2008

کیفیت آب – تعیین سمیت مزمن با  
براکیونوس کلیسی فلوروس در  
۴۸ ساعت

Water quality — Determination of the  
chronic toxicity to *Brachionus*  
calyciflorus in 48 h

ICS: 13.060.70

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۸۱۱۴-۳۲۸۰ (۰۲۶)

رایانامه: [standard@isiri.gov.ir](mailto:standard@isiri.gov.ir)

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

**Iranian National Standardization Organization (INSO)**

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: [standard@isiri.gov.ir](mailto:standard@isiri.gov.ir)

Website: <http://www.isiri.gov.ir>

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد 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 سازمان، صاحب‌نظران 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 مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به‌عنوان 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، بررسی و در صورت تصویب، به‌عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به‌عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> 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.

سازمان ملی استاندارد 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 کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن 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 واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه 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، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«کیفیت آب- تعیین سمیت مزمن با براکیونوس گلوسی فلوروس در ۴۸ ساعت»

رئیس:

سمت و/یا محل اشتغال:

محمدی، ابراهیم  
(دکتری سم شناسی)

دانشگاه علوم پزشکی کردستان

دبیر:

محمدی، حمید  
(دکتری بهداشت مواد غذایی)

اداره کل استاندارد استان کردستان

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

آغهمیری، اسرین  
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)

اداره کل استاندارد استان کردستان

ابراهیمزاده، لیلا  
(کارشناسی ارشد بهداشت محیط)

دانشگاه علوم پزشکی کردستان

حسینی، حمید  
(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

شرکت آب و فاضلاب روستایی استان کردستان

حیدری، صدیقه  
(کارشناسی ارشد مهندسی آب)

شرکت آب منطقه ای کردستان

ذره‌بین، رزگار  
(کارشناسی ارشد شیمی آلی)

معاونت غذا و دارو - دانشگاه علوم پزشکی کردستان

ساعده‌پناه، وریا  
(کارشناسی صنایع غذایی)

اداره کل استاندارد استان کردستان

عباسی، شلیر  
(کارشناسی ارشد صنایع غذایی)

انجمن مدیران کنترل کیفیت استان کردستان

عبدی، چنور  
(کارشناسی ارشد آبیاری و زه‌کشی)

سازمان جهاد کشاورزی استان کردستان

**اعضا:** (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

فاتحی، سیران  
(کارشناسی صنایع غذایی)

مازوجی، هدیه  
(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

ناصری، بهاره  
(کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی)

نادری، کژال  
(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

**ویراستار:**

جهانگیری، نظام  
(کارشناسی ارشد صنایع غذایی)

**سمت و/یا محل اشتغال:**

کارشناس مستقل صنایع غذایی

شرکت آب منطقه‌ای استان کردستان

سازمان جهاد کشاورزی استان کردستان

معاونت غذا و دارو - دانشگاه علوم پزشکی کردستان

اداره کل استاندارد استان کردستان

## فهرست مندرجات

| صفحه | عنوان                                            |
|------|--------------------------------------------------|
| ز    | پیش‌گفتار                                        |
| ح    | مقدمه                                            |
| ۱    | ۱ هدف و دامنه کاربرد                             |
| ۱    | ۲ مراجع الزامی                                   |
| ۲    | ۳ اصطلاحات و تعاریف                              |
| ۴    | ۴ اصول آزمون                                     |
| ۴    | ۵ محیط آزمون                                     |
| ۴    | ۶ واکنش‌گرها، ارگانیسم‌های آزمون و محیط کشت      |
| ۷    | ۷ تجهیزات و دستگاه‌ها                            |
| ۸    | ۸ تیمار و آماده‌سازی نمونه‌ها                    |
| ۹    | ۹ روش آزمون                                      |
| ۱۴   | ۱۰ بیان نتایج                                    |
| ۱۵   | ۱۱ معیارهای صحه‌گذاری                            |
| ۱۶   | ۱۲ گزارش آزمون                                   |
| ۱۷   | پیوست الف (آگاهی‌دهنده) آماده‌سازی محیط LC OLIGO |
| ۲۰   | پیوست ب (آگاهی‌دهنده) داده‌های مربوط به دقت      |
| ۲۱   | کتاب‌نامه                                        |

## پیش‌گفتار

استاندارد «کیفیت آب- تعیین سمیت مزمن با *براکیونوس کلوسی فلوروس* در ۴۸ ساعت» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی به عنوان استاندارد ملی به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در نوزدهمین اجلاس کمیته ملی استاندارد آب و آبفا مورخ ۹۷/۱۱/۲۳ تصویب شد. اینک این استاندارد 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.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون‌های مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO 20666:2008, Water quality — Determination of the chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48 h



## مقدمه

طی سالیان متمادی، برای ارزیابی آثار زیان بار بر کیفیت آب از آزمون های بیولوژیکی استفاده شده است. روتیفرها، و به ویژه گونه *براکیونوس کلیسی فلوروس*، به دلیل مزیت تولید مثل از راه بکرزائی و زمان تکثیر بسیار کوتاه از نقطه نظر اکوتوکسیکولوژیکی مورد توجه هستند. به طوری که یک مادر منفرد تحت شرایط مطلوب در مدت ۴۸ ساعت چندین بار تکثیر پیدا می کند. *براکیونوس کلیسی فلوروس* یک زئوپلانکتون است که در آب شیرین زیست می کند. این موجودات مصرف کنندگان اولیه هستند و طعمه تعداد زیادی از لارو ماهی ها و بی مهرگان هستند.

آزمون مورد اشاره در این استاندارد طی ۴۸ ساعت انجام می شود و بنابراین در طول این مدت حداقل سه نسل از یک ارگانسیم والد منفرد تکثیر می شود (به مرجع شماره ۱۱ کتاب نامه مراجعه کنید).

## کیفیت آب – تعیین سمیت مزمن با براکیونوس کلیسی فلوروس در ۴۸ ساعت

هشدار – کاربران این استاندارد باید با عملیات معمول آزمایشگاهی آشنا باشند. این متن همه مسائل ایمنی مربوط به استفاده از این استاندارد را در بر نمی‌گیرد. مسئولیت برقراری شرایط ایمنی و سلامت مناسب و اطمینان از انطباق با شرایط قانونی در سطح ملی، بر عهده کاربر است.

مهم – بی‌گمان لازم است که انجام آزمون‌ها بر طبق این استاندارد توسط کارکنان آموزش دیده انجام شود.

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه روشی برای تعیین سمیت مزمن با استفاده از روتیفر براکیونوس کلیسی فلوروس بر اساس ممانعت از رشد جمعیت در ۴۸ ساعت است.

این روش برای موارد زیر کاربرد دارد:

الف- مواد شیمیایی که به صورت محلول هستند و یا اینکه تحت شرایط آزمون می‌توانند به صورت دیسپرسیون<sup>۱</sup> یا سوسپانسیون‌های پایدار باقی بمانند؛

ب- پساب‌های صنعتی یا خانگی به صورت تصفیه‌شده و یا تصفیه‌نشده که با دکانته کردن، فیلتراسیون یا سانتریفیوژ کردن به شکل مناسب در می‌آیند؛

پ- آب‌های شیرین؛

ت- عصاره‌های آبی.

این استاندارد برای آزمون مواد شیمیایی ناپایدار (هیدرولیزکننده<sup>۲</sup>، جذب‌کننده<sup>۳</sup> و غیره) در آب کاربرد ندارد، مگر در حالتی که غلظت مواجهه اندازه‌گیری شود. همچنین برای آزمون نمونه‌های آب حاصل از مصب رودخانه یا دریا کاربرد ندارد.

### ۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

---

1 - Dispersion  
2- Hydrolysing  
3- Absorbing

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

**2-1** ISO 5667-16:1998, Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples

**2-2** ISO 5814, Water quality — Determination of dissolved oxygen — Electrochemical probe method

**2-3** ISO 10523, Water quality — Determination of pH

**یادآوری** - استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۱۳۱: سال ۱۳۹۰، کیفیت آب - اندازه‌گیری pH، با استفاده از استاندارد ISO 10523: 2008 تدوین شده است.

### ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر کاربرد دارد.

۱-۳

**سری شاهد**

**control batch**

سری‌های تکرار که شامل محلول شاهد است (مطابق زیربند ۲-۳).

[ منبع: برگرفته از استاندارد ISO 20665:2008 ]

**یادآوری** - در این استاندارد، هشت تکرار یک سری شاهد را تشکیل می‌دهد.

۲-۳

**محلول شاهد**

**control solution**

ترکیبی از محیط کشت آزمون و خوراک، بدون نمونه مورد آزمون است.

[ منبع: برگرفته از استاندارد ISO 20665:2008 ]

### ۳-۳

غلظت مؤثر ( $EC_x$ )

غلظتی که منجر به  $x\%$  ممانعت رشد جمعیت می شود

**effective concentration producing  $x\%$  population growth inhibition  $EC_x$**

غلظت برآورد شده از نمونه که منجر به  $x\%$  ممانعت رشد جمعیت (مطابق زیربند ۳-۴) نسبت به سری شاهد می شود (مطابق زیربند ۳-۱).

### ۴-۳

ممانعت رشد جمعیت

**population growth inhibition**

مقایسه تعداد کل ماده‌ها (مادرها و نوزادان) در پایان آزمون بین سری شاهد (مطابق زیربند ۳-۱) و سری آزمون (مطابق زیربند ۳-۵) است.

### ۵-۳

سری آزمون

**test batch**

سری‌های تکرار که حاوی همان محلول آزمون (مطابق زیربند ۳-۶) است.

[ منبع: برگرفته از استاندارد ISO 20665:2008 ]

یادآوری- در این استاندارد هشت تکرار یک سری شاهد را تشکیل می دهد.

### ۶-۳

محلول آزمون

**test solution**

ترکیبی از محیط کشت آزمون، خوراک و نمونه مورد آزمون است.

[ منبع: برگرفته از استاندارد ISO 20665:2008 ]

## ۴ اصول آزمون

براکینوس کلیسی فلوروس ماده، با سن کمتر از دو ساعت در ابتدای آزمون، به طور منفرد و برای یک دوره ۴۸ ساعته در مواجهه با دامنه‌ای از غلظت‌های نمونه تحت آزمون قرار می‌گیرد. تمرکز این آزمون، بر رشد جمعیت روتیفرهای پلانکتونی از راه تکثیر به روش بکرزایی<sup>۱</sup> است. در پایان آزمون، تعداد روتیفرهای ماده تعیین می‌شود و در مقایسه با شاهد، درصدهای ممانعت رشد جمعیت برای هر غلظت تعیین می‌شود.

به کمک داده‌های به دست آمده و با استفاده از یک مدل رگرسیون، غلظتی که منجر به  $x\%$  ممانعت رشد جمعیت  $EC_x$  (به عنوان مثال  $EC_{10}$ ،  $EC_{20}$  یا  $EC_{50}$ ) می‌شود محاسبه می‌شود.

## ۵ محیط آزمون

آزمون در تاریکی و در یک اتاق یا محفظه با دمای ثابت کنترل شده انجام گیرد، به طوری که دمای  $25 \pm 1^\circ C$  در ظروف آزمون تأمین شود.

اتمسفر باید عاری از گرد و غبار یا بخارات سمی باشد. این مورد با تهیه محلول‌های شاهد کنترل می‌شود.

## ۶ واکنش‌گرها، ارگانسیم‌ها و محیط کشت آزمون

فقط از واکنش‌گرهای با درجه تجزیه‌ای مشخص استفاده کنید مگر در صورتی که غیر از آن در متن استاندارد اشاره شده باشد.

### ۱-۶ ارگانسیم‌های آزمون

ماده‌های گونه براکینوس کلیسی فلوروس (مونوگونوت‌ها<sup>۲</sup>، روتیفرها<sup>۳</sup>) از یک کشت آزمایشگاهی به دست می‌آیند (به منابع ۳، ۱۲ و ۱۳ کتاب‌نامه مراجعه کنید) و یا از سیستم‌های<sup>۴</sup> موجود در بازار متولد می‌شوند. حساسیت آزمون برای ارگانسیم‌ها باید با مس سولفات ۵ آبه یا سدیم پنتا کلروفنلات<sup>۵</sup> (NaPCP) انجام شود (مطابق زیربند ۵-۶).

---

1- Parthenogenetic reproduction

2- Monogonota

3- Rotifera

۳- Cysts: سیستم‌های روتیفر دی‌هیدراته و ROTIRICH مثال‌هایی از محصولات مناسب تجاری در دسترس است. این

اطلاعات جهت راحتی کاربران این استاندارد بوده و تأییدیه ایزو این محصولات را شامل نمی‌شود.

5- Sodium pentachlorophenolate

در صورت استفاده از سیستم‌ها، از نسل اول بر/کیونوس کلیسی فلوروس استفاده کنید. این نسل از طریق تفریخ<sup>۱</sup> تحت شرایط زیر به دست می‌آید.

سیستم‌ها را به یک ظرف دارای محیط کشت آزمون (مطابق زیربند ۶-۳) منتقل کنید. مثلاً ۱۵ mg از سیستم‌ها را به حدود ۱۰ ml محیط کشت آزمون انتقال دهید. ظرف را در دمای  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  به مدت ۱۸ ساعت تا ۲۴ ساعت تحت روشنایی پیوسته با شدت ۱۰۰۰ لوکس تا ۴۰۰۰ لوکس (مطابق زیربند ۷-۷) گرمخانه‌گذاری کنید.

خوراک اولیه برای تفریخ سیستم‌ها لازم نیست. با این حال نرخ تکثیر بهتر روتیفرها با افزودن جلبک، تنها بعد از تولد نوزادان اولیه، و برابر با مقادیر مشخص شده در بند ۶-۴ به دست می‌آید. به عنوان یک روش جایگزین، می‌توان از  $100 \mu\text{g/l}$  خوراک بی‌اثر روتیریج<sup>۲</sup> به عنوان مکمل پیش‌خوراک استفاده کرد (مطابق با منبع ۱۸ کتاب‌نامه).

عمر روتیفرهای مورد استفاده برای آزمون باید کمتر از ۲ ساعت باشد. بنابراین تفریخ پس از ۱۷ ساعت گرمخانه‌گذاری، هر نیم ساعت یکبار بررسی شود.

آزمون زمانی آغاز می‌شود که تعداد روتیفرهای جوان به حدی برسد که برای یک آزمون کامل کفایت کند.

مثال- در یک آزمون با پنج غلظت و یک شاهد (یعنی ۴۸ روتیفر)، این شرایط عموماً بعد از یک ساعت از مشاهده اولین تفریخ بدست می‌آید. زمان تفریخ در داخل یک آزمایشگاه کاملاً ثابت است. این حالت باعث می‌شود برنامه ریزی قبلی برای تفریخ به منظور تأمین زادآوری کافی در طول ساعت کاری امکان پذیر باشد.

۶-۲ آب خالص که هدایت آن کمتر از  $10 \mu\text{S/cm}^2$  باشد.

۶-۳ محیط کشت آزمون که با حل کردن مواد معدنی زیر در یک لیتر آب خالص (مطابق زیربند ۶-۲) به دست می‌آید (مطابق زیربند ۶-۲).

|                                           |       |
|-------------------------------------------|-------|
| $\text{NaHCO}_3$                          | ۹۶ mg |
| $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | ۶۰ mg |
| $\text{MgSO}_4$                           | ۶۰ mg |
| KCl                                       | ۴ mg  |

این محیط کشت آزمون، مشابه محیط آب سنتز شده با سختی متوسط یعنی  $80 \text{ mg/L}$  تا  $100 \text{ mg/L}$   $\text{CaCO}_3$  در لیتر (مطابق با منبع [۱۴]) در کتاب‌نامه) است. پس از آماده‌سازی pH محیط  $7.6 \pm 0.3$  است.

1- Hatching  
2- ROTIRICH

این محلول را در تاریکی و در دمای محیط نگهداری نموده و در طول کمتر از هفت روز پس از آماده‌سازی استفاده کنید.

محیط کشت آزمون را هوادهی کنید به طوری که غلظت اکسیژن محلول در آن به میزان اشباع در هوا برسد و pH ثابت شود. در صورت لزوم با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید یا کلریدریک اسید pH را تا  $7.6 \pm 0.3$  تنظیم کنید. غلظت اسید یا باز مورد نیاز باید طوری انتخاب شود که حجم آن تا حد ممکن کم باشد. دمای محیط کشت آزمون را قبل از استفاده به  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  برسانید.

#### ۴-۶ خوراک، متشکل از جلبک *کلورلا ولگاریس*<sup>۱</sup>

این جلبک‌ها در محیط کشت مناسب رشد داده می‌شوند (به عنوان مثال LC OLIGO، به پیوست الف مراجعه کنید). جلبک‌ها در فاز رشد لگاریتمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. غلظت جلبک در آزمون باید  $2 \times 10^6$  تا  $3 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر باشد. بدین منظور از قبل غلظت جلبک را با سانتریفیوژ کردن کشت (مثلاً در  $20000 \text{ m s}^{-2}$  به مدت ۲۰ دقیقه) تنظیم نمایید و مجدداً با تکان دادن و افزودن حجم مناسبی از محیط کشت آزمون (مطابق زیربند ۳-۶) به حالت تعلیق درآورید تا نهایتاً سوسپانسیونی با غلظت تقریبی  $2 \times 10^7$  تا  $3 \times 10^7$  سلول در میلی‌لیتر به دست آید. حجم ۰٫۱ ml از این سوسپانسیون برابر  $2 \times 10^6$  تا  $3 \times 10^6$  سلول است.

جلبک کشت داده شده در دمای  $(4 \pm 3)^\circ\text{C}$  و تحت تاریکی، به مدت حداکثر ۱۰ روز قابل نگهداری است. خوراک همچنین می‌تواند متشکل از جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* باشد که قبلاً به اسم *Selenastrum capricornutum* یا *Raphidocelis subcapitata* شناخته می‌شد. غلظت جلبک در آزمون باید بین  $1 \times 10^6$  تا  $1.5 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر باشد.

استفاده از جلبک تثبیت شده در یک ماتریکس خنثی (ژلوز<sup>۲</sup>) به شکل دانه‌های جلبک امکان‌پذیر است. در این حالت، بعد از انحلال ماتریکس، جلبک را سانتریفیوژ کرده و پس از دور ریختن لایه رویی جلبک را مجدداً با تکان دادن در محیط کشت آزمون (مطابق زیربند ۳-۶) به حالت تعلیق درآورید. این عملیات را برای بار دوم تکرار کنید. غلظت جلبک در محیط آزمون باید در دامنه مشخص شده در بالا باشد.

#### ۵-۶ ماده مرجع

سدیم پنتا کلروفلنات  $(\text{C}_6\text{Cl}_5\text{ONa})\text{NaPCP}$  و/یا مس سولفات پنج آبه  $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$  می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

1- *Chlorella vulgaris* algae

2- Gelose

هشدار - در صورت استفاده از سدیم پنتاکلروفنلات به عنوان یک سم مرجع، قبل از استفاده و به علت ماهیت خطرناک این ماده، برگه اطلاعات ایمنی توسط پرسنل آزمایشگاه مورد ملاحظه قرار گیرد.

## ۷ دستگاه‌ها

در این آزمون، تجهیزات معمول در آزمایشگاه و به ویژه موارد زیر مورد استفاده می‌شود.

### ۷-۱ اتاق یا محفظه با دمای ثابت کنترل شده

### ۷-۲ ظروف آزمون:

از میکروپلیت‌های یکبار مصرف ساخته شده با مواد شیمیایی خنثی و دارای چاهک‌های با ظرفیت مساوی بزرگتر از ۱ ml استفاده کنید. در این صورت تشکیل یک لایه آب، حین بررسی با ذره‌بین (مطابق زیربند ۷-۵) امکان‌پذیر است. به عنوان مثال میکروپلیت‌های دارای ۲۴ چاهک (۴×۶) با قطر تقریبی چاهک ۱۶ mm مناسب هستند. از میکروپلیت‌های ته‌گرد استفاده نکنید. به عنوان یک روش جایگزین، از ظروف دربسته‌ی مجزا استفاده کنید.

### ۷-۳ وسیله اندازه‌گیری غلظت جلبک

به عنوان مثال یک میکروسکوپ مجهز به هموسایتومتر<sup>۱</sup> یا شمارشگر ذرات<sup>۲</sup>. روش‌های غیرمستقیم (مانند اسپکتروفوتومتر، توریدیمتر، فلوریمتر) در صورت برقراری یک همبستگی قابل قبول با غلظت سلولی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

### ۷-۴ پپیت برای نمونه‌برداری روتیفرها

دارای قطر کافی برای نمونه‌برداری از روتیفرها بوده به طوری که مقادیر کم محیط کشت با آن قابل نمونه‌برداری باشد. به عنوان مثال مینی پپیت‌های موئنه یکبار مصرف با حجم ۱ ml مناسب هستند.

### ۷-۵ ذره‌بین دوچشمی<sup>۳</sup>

با بزرگ‌نمایی حداقل ۸ برابر و در صورت امکان دارای بزرگ‌نمایی پیوسته.

### ۷-۶ سیستم آنالیز تصویر<sup>۴</sup>

برای شمارش و اندازه‌گیری براکیونوس کلیسی فلوروس.

---

1- Haemocytometer

2- Particle counter

3- Binocular magnifying rotifers

4- Image analysis system



## ۷-۷ منبع نوری

شدت نور در ظروف آزمون (مطابق زیربند ۷-۲) را در گستره‌ی ۱۰۰۰ لوکس تا ۴۰۰۰ لوکس فراهم نمایید.

## ۷-۸ بطری‌های جمع‌آوری نمونه

مطابق با زیربند 3.2 استاندارد ISO 5667-16: 1998.

## ۷-۹ الک

سایز اسمی منافذ کمتر از  $50\text{ }\mu\text{m}$  باشد (یک پارچه صافی با اندازه منافذ  $10\text{ }\mu\text{m}$  یا  $20\text{ }\mu\text{m}$  مناسب است).

## ۸ تیمار و آماده‌سازی نمونه‌ها

### ۸-۱ ملاحظات ویژه برای نمونه‌برداری، انتقال، ذخیره و تیمار نمونه‌های آب، پساب، یا عصاره‌های آبی جهت آزمون

نمونه‌برداری، انتقال و ذخیره نمونه‌ها باید مطابق با روش‌های عمومی مشخص در استاندارد ISO 5667-16: 1998 انجام شود.

نمونه‌ها را در بطره‌های ساخته شده از مواد شیمیایی خنثی (مطابق زیربند ۷-۸) جمع‌آوری کنید.

در صورت امکان، بلافاصله آزمون سمیت را انجام دهید. بهترین حالت برای انجام آزمون، در طول ۱۲ ساعت پس از جمع‌آوری نمونه‌ها است. در صورت عدم انجام آزمون در این بازه زمانی، نمونه را تا دما صفر درجه سیلیوس تا  $4^{\circ}\text{C}$  خنک کرده و تا ۲۴ ساعت آزمون کنید. در صورت عدم امکان انجام آزمون تا ۷۲ ساعت، نمونه را منجمد کرده و در دمای زیر  $18^{\circ}\text{C}$  - نگهداری کنید. در صورتی که ویژگی‌های نمونه بر اثر انجماد تغییر نکند می‌توان در طول ۲ ماه پس از جمع‌آوری، نمونه را آزمون کرد. در هنگام انجام آزمون، نمونه را با تکان دادن با دست همگن کنید و در صورت لزوم، اجازه دهید در یک ظرف به مدت ۲ ساعت به حالت خود باقی بماند. سپس با استفاده از یک پیپت، مقدار مورد نیاز از مایع رویی را بردارید. برای این کار، پیپت را در مرکز لوله آزمون قرار دهید به طوری که نوک پیپت در مرکز و مابین سطح مایع رویی و سطح مواد ته‌نشین شده قرار گیرد.

در صورت احتمال ایجاد مزاحمت نمونه خام یا لایه رویی جدا شده در هنگام آزمون (به علت حضور مواد معلق باقیمانده، پروتوزوا، میکروارگانیسم‌ها و غیره)، می‌توان نمونه خام یا دکانته شده را فیلتر و یا سانتریفیوژ کرد. با این حال، باید از این نوع تغییر و دستکاری نمونه اجتناب کرد مگر در حالتی که واقعاً لازم باشد چون که ممکن است خواص فیزیکی و شیمیایی تغییر کند و احتمالاً بعضی از سموم از نمونه حذف شود.

نمونه بدست آمده با هر کدام از این روش‌ها، نمونه‌ای است که برای انجام آزمون مورد استفاده قرار می‌گیرد.

pH (مطابق با استاندارد ISO 10523) و غلظت اکسیژن محلول (مطابق با استاندارد ISO 10523) را اندازه گیری کنید و مقدار هر کدام را در گزارش آزمون (مطابق با بند ۱۲) ثبت کنید.

اگر هدف آزمون ارزیابی سمیت مزمن بدون در نظر گرفتن اثرات pH باشد، آزمون ممکن است بعد از تنظیم pH توسط کلریدریک اسید یا سدیم هیدروکسید در نقطه  $7.6 \pm 0.3$  انجام گیرد. در صورت تشکیل مواد معلق بعد از تنظیم pH، مطابق روش بالا آن‌ها را جداسازی کنید. هر گونه تنظیم pH را در گزارش آزمون (مطابق بند ۱۲) ذکر کنید.

## ۸-۲ آماده‌سازی محلول‌های ذخیره مواد مورد آزمون

محلول ذخیره ماده<sup>۱</sup> مورد آزمون را با انحلال مقدار معینی از ماده در حجم بخصوصی از محیط کشت آزمون (مطابق زیربند ۶-۳) در زمان استفاده تهیه کنید. با این حال، اگر محلول ذخیره ماده تحت شرایط مشخصی پایدار باشد، ممکن است از قبل آماده شده و تحت این شرایط نگهداری شود.

برای موادی که به صورت جزئی در محیط آزمون محلول هستند به استاندارد ISO 5667-16:1998 مراجعه کنید.

## ۹ روش آزمون

### ۹-۱ انتخاب غلظت‌ها

آزمون باید شامل حداقل ۵ غلظت از نمونه مورد آزمون باشد. این غلظت‌ها در فاصله سری‌های هندسی طوری انتخاب شوند که فاکتور جداسازی<sup>۲</sup> بیشتر از  $3/2$  برابر نباشد.

معیارهای زیر را برای انتخاب گستره‌ی غلظت‌های مورد آزمون در نظر بگیرید: برای بدست آوردن مقدار  $EC_x$ ، حداقل یک غلظت بالاتر و یک غلظت پایین‌تر از  $x\%$  مطلوب است.

حداقل ۸ تکرار برای هر غلظت تهیه کنید. همه این تکرارها با هم یک بهر آزمون را تشکیل می‌دهند (مطابق با زیربند ۳-۵).

در هر آزمون، یک بهر شاهد (مطابق زیربند ۳-۱) در نظر بگیرید. بهر شاهد فاقد نمونه مورد آزمون بوده و حداقل شامل ۸ تکرار باشد (۱۶ تکرار بهتر است).

در جایی که یک ماده شیمیایی (حلال، امولسیفایر، استخراج کننده و غیره) به منظور محلول کردن و پخش مواد استفاده می‌شود، غلظت ماده شیمیایی باید در همه ظروف یکسان باشد. یک بهر شاهد دوم تهیه کنید که حاوی ماده شیمیایی با همان غلظت استفاده شده باشد. در حالتی که تأثیر کمینه و قابل قبول در حلال

1- Stock solution of the substance

2- Separation factor

شاهد مشاهده شود، اثر آن باید در محاسبات نهایی آماری لحاظ شود. در این موقعیت اثر حلال کنترل کوچک است و آزمون هنوز دارای اعتبار است.

در مورد نمونه‌های آب، پساب‌ها و عصاره‌های آبی، بالاترین غلظت آزمون شده به علت منبع غذایی نمی‌تواند مساوی با ۱۰۰٪ حجم نمونه اولیه باشد و باید در کمترین حجم ممکن اضافه شود (کوچکتر و مساوی ۱۰ درصد حجم نهایی نمونه و رقت‌های آن).

## ۹-۲ آماده‌سازی نمونه و محلول‌های شاهد

محلول‌های آزمون را با مخلوط کردن حجم‌های مناسب از نمونه مورد آزمون (مطابق زیربند ۸-۱ یا ۸-۲) یا حجم‌های مناسب از رقت اولیه با محیط کشت آزمون (مطابق با زیربند ۶-۳) و خوراک (مطابق با زیربند ۶-۴) تهیه کنید.

مقدار خوراک در هر میکروپلیت را مطابق زیربند ۶-۴ محاسبه کنید. حجم کلی باید در هر چاهک ۱ ml باشد.

محلول‌های شاهد را با مخلوط کردن محیط کشت آزمون (مطابق زیربند ۶-۳) و خوراک (مطابق با زیربند ۶-۴) تهیه کنید. در صورتیکه از یک ماده شیمیایی (مطابق با زیربند ۹-۱) استفاده شود، یک حلال شاهد برای ماده شیمیایی تهیه کنید.

حدوداً ۱ تا ۲ ساعت قبل از پایان دوره تفریخ، محلول‌های آزمون و شاهد را در حجم ۱ ml در هر چاهک توزیع کنید.

**یادآوری ۱-** با استفاده از ۲ میکروپلیت دارای ۴×۶ چاهک، می‌توان به ترکیب ۶ ستون با ۸ چاهک (هر سری با ۸ تکرار) دست پیدا کرد. یک ستون برای شاهد و ۵ ستون دیگر برای آزمون ۵ غلظت مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد.

**یادآوری ۲-** همچنین می‌توان رقت‌های نمونه مورد آزمون را به صورت مستقیم در چاهک‌ها تهیه کرد. برای این کار می‌توان از سری رقت‌ها، از محلول ذخیره و یا از رقت‌های محلول ذخیره استفاده کرد. سپس خوراک مطابق با زیربند ۶-۴ به چاهک‌ها اضافه می‌شود. حجم کلی در هر چاهک ۱ ml است. به منظور اجتناب از آلودگی بین چاهک‌ها، توصیه می‌شود که ابتدا به ستون چاهک‌های شاهد و سپس به سایر چاهک‌ها به ترتیب غلظت پایین به بالا خوراک (مطابق با زیربند ۶-۴) را اضافه کنید. در صورت احتمال وجود ترکیبات فرار، لازم است که میکروپلیت‌های باز، با ظروف در بسته‌ی جداگانه برای هر تکرار و یا با یک فویل چسبناک که دارای منافذ مناسب است و همه چاهک‌ها را می‌پوشاند، جایگزین شود.

## ۹-۳ افزودن ارگانیسرها

میکروپلیت‌ها و یا ظروف در بسته‌ی مجزا را که حاوی محلول‌های نمونه و شاهد است در یک اتاق یا محفظه (مطابق با زیربند ۷-۱) با دمای کنترل شده قرار دهید تا دمای محلول‌های آزمون و شاهد به  $(1 \pm 25)^\circ\text{C}$  برسد.

به کمک یک ذره بین دوچشمی (مطابق با زیربند ۷-۵) و با استفاده از یک پیت نمونه برداری (مطابق با زیربند ۷-۴) از براکیونوس کلیسی فلوروس نمونه گیری کنید. پیت را زیر سطح محلول آزمون قرار داده به طوری که مقدار انتقال محیط به همراه روتیفر به حداقل برسد.

در طول مراحل مختلف آزمون، براکیونوس کلیسی فلوروس را در  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  نگهداری کنید. با این کار از روتیفرها در مقابل انواع نوسانات دمایی که ممکن است باعث ظهور نرها شود، محافظت می شود.

**یادآوری ۱-** به منظور تسهیل در نمونه برداری از روتیفرها و به ویژه در حالتی که تعداد آنها در ظروف تفریخ زیاد باشد، به کمک محیط کشت آزمون (مطابق با زیربند ۶-۳) می توان محیط تفریخ را رقیق کرد. برای این کار، محیط کشت آزمون قبلاً باید به دمای محیط تفریخ رسیده باشد.

**یادآوری ۲-** در صورت استفاده از یک پیت موئینه با حجم ۱ ml، میزان حجم مورد استفاده برای افزودن ارگانسیم معمولاً کمتر از ۲۰  $\mu\text{l}$  است.

در هر چاهک و یا هر ظرف در بسته ی مجزا، یک براکیونوس کلیسی فلوروس قرار دهید. ضمن پیشروی، غلظت ها را افزایش داده و بین سری ها پیت را عوض کنید.

با سری اول و به این ترتیب شروع کنید: شاهد، غلظت  $C_1$ ، غلظت  $C_2$ ، غلظت  $C_3$ ، غلظت  $C_4$ ، غلظت  $C_5$ . پیت را عوض نموده و به همین ترتیب برای سری ۲ مراحل را ادامه دهید. این مراحل را تا سری ۸ به همین صورت دنبال کنید. به جدول ۱ رجوع کنید.

جدول ۱- الگویی برای گزارش داده ها

| شماره سری | شاهد | غلظت  |       |       |       |       |
|-----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           |      | $C_5$ | $C_4$ | $C_3$ | $C_2$ | $C_1$ |
| ۱         |      |       |       |       |       |       |
| ۲         |      |       |       |       |       |       |
| ۳         |      |       |       |       |       |       |
| ۴         |      |       |       |       |       |       |
| ۵         |      |       |       |       |       |       |
| ۶         |      |       |       |       |       |       |
| ۷         |      |       |       |       |       |       |
| ۸         |      |       |       |       |       |       |

حضور یک روتیفر در هر چاهک و یا هر ظرف در بسته ی مجزا را تصدیق کنید. در صورتی که روتیفر کم یا زیاد باشد، تعداد را با افزودن یا کم کردن تصحیح کنید.

میکروپلیت و یا ظرفِ دربسته‌ی مجزا را با یک ورقه (به عنوان مثال از جنس پلی‌اتیلن) و یا با درپوش میکروپلیت بیوشانید.

#### ۹-۴ گرمخانه‌گذاری سیستم آزمون

پلیت را در دمای  $^{\circ}\text{C } (25 \pm 1)$  و در تاریکی به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید. توصیه می‌شود که جهت اجتناب از تبخیر محلول نمونه، گرمخانه‌گذاری در اتمسفر اشباع از آب انجام شود. به عنوان مثال، میکروپلیت را در یک ظرفِ بسته که کف آن از قبل با لایه‌ی نازکی از آب پوشانده شده است قرار دهید.

#### ۹-۵ اندازه‌گیری‌ها

در پایان دوره ۴۸ ساعته گرمخانه‌گذاری، تعداد بر/کیونوس کلیسی فلوروس ماده زنده در هر چاهک و یا هر ظرفِ بسته را زیر یک ذره‌بین دوچشمی (مطابق با زیربند ۷-۵) یا یک سیستم آنالیز تصویر (مطابق با زیربند ۷-۶) شمارش کنید. نمودار خوانش (شمارش)، باید از نمودار افزودن روتیفرها مطابق با زیربند ۹-۳ تبعیت کند.

برای تعیین مرگ روتیفر، آن را زیر یک ذره‌بین دوچشمی (مطابق با زیربند ۷-۵) به مدت ۵ ثانیه مشاهده کنید و عدم حرکت ماستاکس<sup>۱</sup> و تاج مژکی<sup>۲</sup> (مطابق با شکل ۱) را بررسی کنید.

**یادآوری-** در حالت تولید مثل پر بار<sup>۳</sup> روتیفرها (بیشتر از ۱۰ ارگانیسم در هر چاهک)، احتمالاً ممکن است در برخی چاهک‌ها و در نتیجه ازدحام<sup>۴</sup>، چند عدد روتیفر نیز وجود داشته باشد. از آنجایی که نرها تنها تحت شرایط «تولید مثل پر بار» (بیشتر در مورد شاهد‌ها) مشاهده می‌شوند، حضور آن‌ها مربوط به اثرات سمی ترکیب یا ترکیبات تحت بررسی نیست.

بر/کیونوس کلیسی فلوروس بالغ و نر ۳ تا ۵ برابر کوچکتر از انواع ماده است و تحرک آن‌ها بسیار بیشتر است. این دو شاخص، تمایز آشکار بین ماده‌ها و نرها را ممکن می‌سازد.

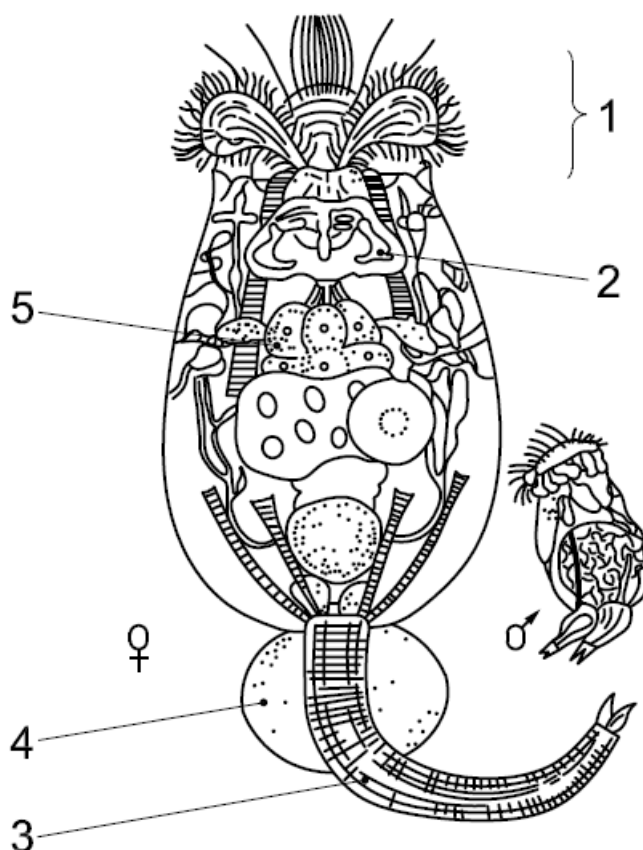
---

1- Mastax

2- Ciliary corona

3- Very good reproduction

4- Overcrowding



راهنما:

|                |            |
|----------------|------------|
| ciliary corona | 1 تاج مژکی |
| Mastax         | 2 ماستاکس  |
| Foot           | 3 پا       |
| Egg            | 4 تخم      |
| Stomach        | 5 معده     |

شکل ۱- نمودار روتیفرهای بر/کیونوس نر و ماده (مطابق منبع [۸] در کتاب‌نامه با بزرگنمایی ۳۰۰ برابر)

اگر در پایان آزمون، تعداد بالای روتیفرها در هر چاهک شمارش آن‌ها را مشکل سازد (مثلاً بیشتر از عدد ۱۰)، تغلیظ ارگانیسم‌ها قبل از شمارش نهایی ممکن است ضروری باشد. محتویات چاهک را با یک الک (مطابق با زیربند ۷-۹) که اندازه اسمی سوراخ‌های آن کمتر از  $50 \mu\text{m}$  (یک پارچه صافی با اندازه اسمی سوراخ‌های  $10 \mu\text{m}$  یا  $20 \mu\text{m}$  مناسب است) باشد، صاف کنید. بلافاصله پس از نمونه‌گیری از محلول موجود در چاهک، مقداری محیط کشت آزمون (مطابق با زیربند ۶-۳) به چاهک خالی جهت حفظ روتیفر یا روتیفرهای باقیمانده در محیط آبی اضافه کنید. بر/کیونوس کلیسی فلوروس ماده زنده را مستقیماً در الک شمارش کنید. مجدداً چاهک را به منظور شمارش هر گونه روتیفر باقیمانده مشاهده کنید.

پس از اتمام شمارش، محتویات سری چاهک‌های شاهد را در یک ظرف مناسب جمع‌آوری کنید و pH را مطابق با استاندارد ISO 10523 اندازه‌گیری کنید. به همین صورت اندازه‌گیری pH را تا غلیظ‌ترین محلول آزمون ادامه دهید.

## ۱۰ بیان نتایج

### ۱۰-۱ تعیین ممانعت رشد جمعیت

تعداد روتیفرهای ماده زنده برای هر غلظت،  $N_e$  را در هر تکرار شمارش کنید. همچنین تعداد کل روتیفرهای ماده زنده در سری شاهد،  $N_t$  را در هر تکرار تعیین کنید.

میانگین تعداد روتیفرهای ماده زنده در هر غلظت،  $\overline{N_e}$  را با تقسیم  $N_e$  بر تعداد تکرارها بدست آورید. میانگین تعداد روتیفرهای ماده زنده در سری شاهد،  $\overline{N_t}$  را با تقسیم  $N_t$  بر تعداد تکرارها بدست آورید.

ممانعت رشد جمعیت را برای هر غلظت بر حسب درصد،  $I$ ، از طریق معادله (۱) بدست آورید:

$$I = \frac{\overline{N_t} - \overline{N_e}}{\overline{N_t}} \times 100 \quad (1)$$

که در آن:

$\overline{N_e}$  میانگین تعداد روتیفرهای ماده زنده در هر غلظت

$\overline{N_t}$  میانگین تعداد روتیفرهای ماده زنده در سری شاهد

### ۱۰-۲ تعیین پارامترهای سمیت

برای تعیین غلظتی ( $EC_x$ : به عنوان مثال  $EC_{10}$ ،  $EC_{20}$  یا  $EC_{50}$ ) که منجر به  $x\%$  ممانعت رشد می‌شود برآزش یک مدل بر نتایج آزمون امکان‌پذیر است. به این منظور بایستی حدود اطمینان<sup>۱</sup> (مثلاً  $95\%$ ) مقادیر  $EC_x$  و پارامترهای مشخصه در این مدل برآورد شود.

برآزش مدل بر اعداد را با استفاده از یک آزمون آماری و یا با نمایش گرافیکی ارزیابی کنید.

استفاده از یک مدل منطقی<sup>۲</sup> مناسب برای آنالیز آماری داده‌های گردآوری شده امکان‌پذیر است.

یادآوری- این مدل در قالب آنالیز نتایج آزمون بین آزمایشگاهی استفاده شده است (به پیوست ب مراجعه کنید).

1- Confidence limit

2- Logistic model

این مدل که در آن  $N_Y$  تعداد کل روتیفرهای ماده زنده در هر تکرار (متغیر) است، توسط معادله (۲) نشان داده می‌شود:

$$N_Y = \frac{\overline{N_a}}{1 + (C/EC_{50})^b} \quad (2)$$

که  $C$  در این معادله غلظت مورد آزمون (متغیر آزمون) است.

پارامترهای زیر که مشخصه مدل هستند از روی داده‌های بدست آمده محاسبه می‌شوند (به عنوان مثال با روش حداقل مربعات):

$EC_{50}$  غلظتی است که در آن ۵۰٪ ممانعت رشد جمعیت اتفاق می‌افتد.

$\overline{N_a}$  میانگین تعداد روتیفرهای ماده زنده مورد انتظار در شاهد  
 $b$  شیب منحنی

$EC_x$  می‌تواند از طریق معادله (۳) برآورد شود:

$$EC_x = EC_{50} \left( \frac{x}{100 - x} \right)^{1/b} \quad (3)$$

که در این معادله،  $x$  اثر انتخابی (به صورت ۱۰، ۲۰، ۵۰ و غیره) برای محاسبه  $EC_x$  (پارامتری که ابتدائاً تعریف شده) است و به صورت درصد بیان می‌شود.

مدل‌های دیگر نیز می‌تواند استفاده شود. در این صورت مدل مورد استفاده را در گزارش آزمون توضیح دهید (مطابق با بند ۱۲).

حساسیت واکنشگر زیستی و انطباق روش به کار گرفته شده را بررسی کنید. با استفاده از روش توضیح داده شده در این استاندارد و به صورت ادواری (حداقل هر ۲ تا ۳ ماه یکبار) و یا در زمان آزمون، مقدار  $EC_{50}$  در ۴۸ ساعت را برای NaPCP و یا سولفات مس ۵ آبه (مطابق با زیربند ۵-۶) تعیین کنید. مقدار  $EC_{50}$  در ۴۸ ساعت و تاریخ انجام آن را در گزارش آزمون مشخص کنید (به پیوست ب برای نتایج یک مورد آزمون حلقه<sup>۱</sup> رجوع کنید).

## ۱۱ معیارهای صحه‌گذاری

در صورت برآورد شدن شرایط زیر، آزمون صحت دارد:

الف- تولید مثل بر/کیونوس کلیسی فلوروس در بهر شاهد و در انتهای آزمون در بین حداقل ۸۷/۵٪ از تکرارها (معادل ۷ تکرار از ۸ تا) مشاهده شود.



ب- در پایان آزمون، میانگین تعداد بر/کیونوس کلیسی فلوروس ماده شمارش شده به صورت زنده در هر چاهک و در بهر شاهد بزرگتر مساوی با ۳ باشد.

## ۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حداقل دارای آگاهی‌های زیر باشد:

الف- همه اطلاعات لازم برای شناسایی کامل نمونه یا ماده مورد آزمون؛

ب- روش‌های آماده‌سازی نمونه‌ها؛

۱- برای پساب‌ها، آب‌ها و عصاره‌های آبی، روش و زمان نگهداری نمونه‌ها، pH و غلظت اکسیژن محلول در نمونه اولیه، در صورت لزوم، شرایطی که در آن جداسازی، فیلتراسیون یا سانتریفیوژ کردن نمونه و تنظیم احتمالی انجام شده است؛

۲- برای مواد شیمیایی، روش آماده‌سازی محلول‌های ذخیره و آزمون؛

پ- ارجاع به این استاندارد؛

ت- همه اطلاعات بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی مرتبط با آزمون و مورد اشاره در این استاندارد؛

ث- همه اطلاعات مربوط به آرگانیزم و در صورت نیاز، منشأ و شماره سری سیستم‌های بر/کیونوس کلیسی فلوروس مورد استفاده؛

ج- همه اطلاعات مربوط به آزمون (شدت نور، گونه و مقدار جلبک مورد استفاده به عنوان خوراک و در صورت لزوم، منشأ و شماره سری دانه‌های جلبک مورد استفاده، غلظت‌های نمونه، pH محلول‌های آزمون و شاهد و غیره)؛

چ- نتایج آزمون مطابق با بند ۱۰، روش محاسبه، و نمودارهای غلظت-پاسخ؛

ح- نتایج بدست آمده با ماده یا مواد مرجع مطابق با بند ۱۱، و همچنین تاریخ انجام آزمون؛

خ- هر گونه رفتار نامتعارف بر/کیونوس کلیسی فلوروس تحت شرایط آزمون؛

د- همه جزئیات عملیاتی و یا اختیاری که در این استاندارد به آن‌ها اشاره نشده به همراه جزئیات هر اتفاقی که ممکن است بر نتایج تأثیر گذاشته باشد؛

ذ- نام و آدرس آزمایشگاه آزمون کننده، اشخاص انجام دهنده آزمون، و شخص تأیید کننده آزمون.

## پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

### آماده سازی محیط LC OLIGO

#### الف ۱- واکنش‌گرها

##### الف ۱-۱ محلول ۱

۴ گرم کلسیم نیترات چهار آبه ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) را در ۱۰۰ ml آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) حل کنید.

این محلول در دمای  $^{\circ}\text{C}$   $(4 \pm 3)$  به مدت ۳ ماه قابل نگهداری است.

##### الف ۱-۲ محلول ۲

۱۰ گرم پتاسیم نیترات ( $\text{KNO}_3$ ) را در ۱۰۰ ml آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) حل کنید.

این محلول در دمای  $^{\circ}\text{C}$   $(4 \pm 3)$  به مدت ۳ ماه قابل نگهداری است.

##### الف ۱-۳ محلول ۳

۳ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) را در ۱۰۰ ml آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) حل کنید.

این محلول در دمای  $^{\circ}\text{C}$   $(4 \pm 3)$  به مدت ۳ ماه قابل نگهداری است.

##### الف ۱-۴ محلول ۴

۴ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) را در ۱۰۰ ml آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) حل کنید.

این محلول در دمای  $^{\circ}\text{C}$   $(4 \pm 3)$  به مدت ۳ ماه قابل نگهداری است.

##### الف ۱-۵ محلول ۵

ترکیبات زیر را در حدود ۸۰۰ ml آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) حل کنید.

۳۰ mg

سولفات مس ۵ آبه ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

۶۰ mg

آمونیم هپتامولیدات ۴ آبه  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

|       |                                                                                 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------|
| ۶۰ mg | سولفات روی ۷ آبه ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )                  |
| ۶۰ mg | کبالت کلرید ۶ آبه ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )                 |
| ۶۰ mg | نیتрат منگنز ۴ آبه ( $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )     |
| ۶۰ mg | سیتریک اسید ۱ آبه ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) |
| ۶۰ mg | بوریک اسید ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )                                          |

ترکیبات بالا را با آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) به حجم ۱ لیتر برسانید.  
این محلول در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ( $3 \pm 4$ ) به مدت ۳ ماه قابل نگهداری است.

#### الف ۱-۶ محلول ۶

مقدار ۱۶۲۵ mg سیترات آهن ۵ آبه ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) را در حدود ۸۰۰ ml آب از پیش حرارت دیده و در حال همزدن حل کنید. ممکن است همزدن این محلول در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۵۰ به مدت یک شب لازم باشد.  
پس از سرد کردن ترکیبات زیر را در حال همزدن در آن حل کنید:

|        |                                                                     |
|--------|---------------------------------------------------------------------|
| ۶۲۵ mg | سولفات آهن (II) ۷ آبه ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) |
| ۶۲۵ mg | کلرید آهن (III) ۶ آبه ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) |

ترکیبات بالا را با آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) به حجم ۱ لیتر برسانید.  
این محلول در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ( $3 \pm 4$ ) به مدت ۳ ماه قابل نگهداری است.

#### الف ۲-روش

۱ ml از هر کدام از محلول‌های مراحل ۱ تا ۴ (الف ۱-۱، الف ۲-۱، الف ۳-۱، الف ۴-۱) و ۰/۵ ml از محلول‌های ۵ و ۶ (الف ۵-۱ و الف ۶-۱) را به ۸۰۰ ml آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) منتقل کنید. با اضافه کردن هر کدام، محلول را تکان دهید. سپس با آب خالص (مطابق با زیربند ۶-۲) به حجم ۱ لیتر برسانید.

بررسی کنید که pH محلول بدست آمده بین ۶/۸ و ۷/۲ باشد. در صورت لزوم با هیدروکلریک اسید یا سدیم هیدروکسید، pH را تنظیم کنید.

محلول را با اتوکلاو کردن (۲۰ دقیقه در دمای °C ۱۲۰) و یا با عبور دادن از صافی غشایی با اندازه ۰/۲۲ μm استریل کنید. این محلول به مدت حداکثر ۱ ماه در دمای °C (۳ ± ۴) قابل نگهداری است.

## پیوست ب

### (آگاهی‌دهنده)

#### داده‌های مربوط به دقت

آزمون بین آزمایشگاهی در مورد دو ماده سدیم پنتا کلروفلات NaPCP و سولفات مس ۵ آب (CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O) در سال ۱۹۹۹ انجام شد. نتایج بدست آمده در جدول ب ۱ نشان داده شده است.

جدول ب ۱- نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

| EC <sub>50</sub> در ۴۸ ساعت |              |            |         | تعداد آزمایشگاه | نوع ماده            |
|-----------------------------|--------------|------------|---------|-----------------|---------------------|
| ضریب تغییر                  | انحراف معیار | دامنه      | میانگین |                 |                     |
| ۴۲٪                         | ۲۳۲          | ۱۳۶ تا ۹۸۲ | ۵۴۸     | ۱۲              | NaPCP               |
| ۳۳٪                         | ۱۷۷          | ۲۰ تا ۸۶۹  | ۵۳٫۵    | ۱۱              | مس (II) سولفات ۵ آب |

## کتابنامه

- [1] ASTM E1440-91:2004, *Standard guide for acute toxicity test with the rotifer Brachionus*
- [2] BEAUMONT, A., CASSIER, P. *Biologie animale — Des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens*, Vol. 1, 3rd edition. Dunod, Paris, 1995
- [3] HAGIWARA, A., HINO, A., HIRANO, R. Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* [Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.] 1988, **54**, p. 569-575
- [4] JANSSEN, C.R., PERSOONE, G., SNELL, T.W. Cyst-based toxicity tests, VIII: Short-chronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquat. Toxicol.* 1994, **28**, p. 243-258
- [5] JANSSEN, C.R., FERRANDO RODRIGO, M.D., PERSOONE, G. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*, I: Conceptual framework and applications. *Hydrobiologia* 1993, **225-256**, p. 21-32
- [6] LUBZENS, E., MINKOFF, G., MAROM, S. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mar. Biol.* 1985, **85**, p. 123-126
- [7] PERSOONE, G., BLAISE, C., SNELL, T., JANSSEN, C., VAN STEERTEGEM, M. Cyst-based toxicity tests, 2: Report on an international intercalibration exercise with three cost-effective toxkits. *Z. Angew. Zool.* 1993, **79**, p. 17-36
- [8] POURRIOT, R., FRANCEZ, A.J. Rotifères. In: Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises. Extrait du *Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon*, 55(5), p. 2-37
- [9] POURRIOT, R., ROUGIER, C. Taux de reproduction en fonction de la concentration en nourriture et de la température chez trois espèces du genre *Brachionus* (Rotifères) [Reproduction rates in relation to food concentration and temperature in three species of the genus *Brachionus* (Rotifera)]. *Ann. Limnol.* 1997, **33**, p. 23-31
- [10] RADIX, P., LÉONARD, M., PAPANTONIOU, C., ROMAN, G., SAOUTER, E., GALLOTTI-SCHMITT, S., THIÉBAUD, H., VASSEUR, P. Comparison of *Brachionus calyciflorus* 2 d and Microtox chronic 22 h tests with *Daphnia magna* 21 d for the chronic toxicity assessment of chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 1999, **18**, p. 2179-2185
- [11] SNELL, T.W., MOFFAT, B.D. A 2-d life cycle test with the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 1992, **11**, p. 1249-1257
- [12] SNELL, T.W. Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Biol.* 1986, **92**, p. 157-162
- [13] SNELL, T.W., BOYER, E.M. Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1988, **124**, p. 73-85
- [14] US EPA. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms, 4th edition. Environmental Protection Agency,

- Washington, DC, 2002. 350 p. (EPA-821-R-02-013.) Available (2008-05-22) at: <http://www.epa.gov/waterscience/methods/wet/disk3/ctf.pdf>
- [15] NORBERG-KING, T.J. A linear interpolation method for sub lethal toxicity: The inhibition concentration (Icp) approach — Version 2.0. National Effluent Assessment Centre, environmental Research Laboratory, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, 1993. (Technical Report 03-93)
- [16] STEPHAN, C. LC50 Calculation Program, Version 2.0. Environmental Research Laboratory, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, 1986
- [17] WEST INC., GULLEY, D.D. TOXSTAT, Version 3.5: Computer software and instruction program. West Ecosystems Technology Inc., Cheyenne, WY, 1996
- [18] BELGIS, C., PERSOONE, G. Cyst-based toxicity tests XVII: Prefeeding advantages in short-chronic rotifer microbioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2005, **60**, p. 73-80
- [19] ISO 20665, *Water quality — Determination of chronic toxicity to Ceriodaphnia dubia*
- یادآوری - استاندارد ملی شماره ۱۲۲۶۶: «کیفیت آب تعیین سمیت مزمن برای سریودافنیا دوبیا» با استفاده از استاندارد ISO 20665 تدوین شده است.