www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

ISIRI
8797
1st.edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۸۷۹۷
چاپ اول

کیفیت آب – تعیین سمیت زایی در جنین ها و لاروهای ماهی آب شیرین – روش نیمه ایستا

Water quality – Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – 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، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا 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 واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر 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 بـررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی 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 تـوجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهـای بین المـللی استفـاده 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 وعمومی، 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 استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت 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 ـ شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

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

تلفن مؤسسه در کرج: ۸-۲۸۰۶۰۳۱-۰۲۶۱

تلفن مؤسسه در تهران: ۵-۸۸۷۹۴۶۱-۰۲۱

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

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

پیام نگار: Standard @ isiri.or.ir

بهاء ۲۶۲۵ 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: 2625”RLS

کمیسیون استاندارد" کیفیت آب - تعیین سمیت زایی در جنین ها و لاروهای ماهی آب شیرین – روش نیمه ایستا "

رئیس	سمت یا نمایندگی
شهریاری ، رضا	**عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل**
(فوق لیسانس مهندسی کشاورزی)	
جاوید فر ، علی	دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
(دکترای علوم آزمایشگاهی)	
جعفری ، سیما	سازمان صنایع و معادن استان اردبیل
(لیسانس مهندسی علوم و صنایع غذایی)	
(لیسانس شرافتخواه آذری ، شهین	اداره کل استانداردوتحقیقات صنعتی استان اردبیل
مهندسی علوم و صنایع غذایی)	
طایفی اردبیلی ، کیومرث	اداره کل دامپزشکی استان اردبیل
(دکترای دامپزشکی)	
فروتن شاد، علی	اداره کل استاندارد وتحقیقات صنعتی استان اردبیل
(لیسانس شیمی)	
محمدی قلعه بین ، بهنام	دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
(فوق لیسانس انگل شناسی)	
نوخواه قوجه بیگلو، فتح الله	شرکت آب و فاضلاب استان اردبیل
(فوق لیسانس شیمی فیزیک)	

دبیران

حسین پور ، حسنعلی	اداره کل استانداردوتحقیقات صنعتی استان اردبیل
(فوق لیسانس مهندسی علوم و صنایع غذایی)	
طایفی اردبیلی ، وحید	مرکز آموزشی و درمانی امام خمینی (ره) اردبیل
(فوق دیپلم علوم آزمایشگاهی)	

فهرست اعضای شرکت کننده در نود و ششمین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی

مؤرخ ۸۵/۹/۲۵ ساعت ۹ صبح

رئیس	**سمت یا نمایندگی**
۱ **زندوکیلی،فاطمه**	**مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران**
(فوق لیسانس علوم بهداشت در تغذیه)	
اعضاء	
امینیان،حمیدرضا	**سازمان حمایت مصرف کنندگان وتولیدکنندگان**
(دکترا)	
حسین پور،حسنعلی	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان اردبیل
(فوق لیسانس صنایع غذایی)	
۲ **دریا بیگی،لیلا**	**مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران**
(دیپلم)	
رستمی،خسرو	سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
(دکترا)	
شهریاری،رضا	دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل
(فوق لیسانس مهندسی کشاورزی)	
کوهی کمالی دهکردی،پالیز	انستیتو تحقیقات و تغذیه ای و صنایع غذایی کشور
(فوق لیسانس)	
نوروزی،سعید	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
(دکترای دامپزشکی)	
دبیر	
۳ **پیراوی ونک،زهرا**	**مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران**
(فوق لیسانس صنایع غذایی)	

فهرست مندرجات .....صفحه

پیش گفتار .....ب
مقدمه ..... پ
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۲
٤ اساس روش..... .....۳
٥ مواد لازم ٤
٦ وسایل لازم ٦
۷ روش اجرای آزمون.....۸
۸ نتایج آزمون.....۱۱
۹ گزارش آزمون ۱۳
پیوست الف- شرایط تولیدتخم های زبرافیش(اطلاعاتی).....۱۵
پیوست ب – نمونه ای از داده های مربوط به مرگ و میر اولیه ،زمان های از تخم در آمدن و بقای ارگانیسم(اطلاعاتی).....۱۹

پیش گفتار

استاندارد " کیفیت آب – تعیین سمیت زایی در جنین ها و لاروهای ماهی آب شیرین – روش نیمه ایستا(تجدید تناوبی)" که توسط کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده و در نود وششمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۵/۹/۲۵ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ بعنوان استاندارد ملی ایران منتشر میشود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات ، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود ، در هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابر این برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدید نظر 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 استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود .

منبع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد بکار رفته بشرح زیر است :

1- ISO 12890 : 1999 , Water quality – Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – Semi - static method

ماهـیان مخصوصـا" در طول مرحلهٔ تکثیر (گامتوژنز[1]) و مراحل اولیه رشد (مراحل جنینی و لاروی[2]) بـه مـواد شـیمیایی حساسـیت دارنـد. بنابراین تعیین سمیت زایی مواد شیمیایی برای ماهیان در مراحل اولیه رشـد در مقایسـه بـا انـدازه گـیری سـمیت حـاد مـواد شیمیایی برای ماهیان بالغ ، شاخص بسیار حساسی محسوب می گردد.

فقـط آزمونهایـی مـی توانند برآورد دقیقی از سمیت مزمن مواد شیمیایی به ماهیان ارایه دهند که تمامی مراحل چرخه زندگی ماهیان را تحت پوشش قرار می دهند.کاهش تماس ماهیان به مواد شیمیایی در مراحل زندگـی ممکـن اسـت سـبب کاهش حساسیت شود و بنابراین سمیت مزمن ، کم اهمیت در نظر گرفته می شـود. از ایـن رو روش موجـود بـا اسـتفاده از جنین ها و لاروها نسبت به آزمون در تمامی چرخهٔ زندگی دارای حساسـیت کمـتر مـی باشد و نیز ممکن است در مقایسه با آزمون در مرحله اولیه به هم پیوسته رشد لاروهـا بـه مـدت چـند هفـته کمتر حساس باشد . اختلاف در میزان حساسیت بین این نوع از آزمون ها به فاکـتورهای مـتعددی از قبیل اثرگذاری سمیت مواد شیمیایی بستگی خواهد داشت . بنابراین عمومیت دادن رابطـهٔ تقریبـی بیـن حساسیت به آزمونهای جنینی – لاروی (ازجمله رشد) و جنینی – لاروی (به استثنای رشـد) در تمامـی چـرخه زندگـی ممکـن نمـی باشـد . در عین حال ، تجربه نشان داده است که در مورد بسـیاری از مـواد شـیمیایی ، حساسـیت حاصله در آزمونهای جنینی – لاروی با حساسیت به دست آمده در آزمون های مربوط به تمامی چرخهٔ زندگی ، همبستگی دارد.

اغلب تجربیات انجام آزمونهای جنینی – لاروی در اروپا در مورد ماهیان آب شیرینی چون *دانیورریو*[3] ، *هامیلتون بوچانان*[4] ، *تلئوستی*[5] ، *سیپرینیده*[6] معمولا" تحت عنوان زبرافیش[7] به دست آمده است . بـاید توجـه داشت که نام سیستماتیک (علمی) این گونه اخیرا " از *براچیدانیورریو*[1] به *دانیو رریـو*[2] (Daniorerio) تغییر یافته است . راهنمایی خیلی جزیی در مورد نگهداری ماهیان مادر و تولید تخم جهت انجام آزمون بر روی این گونه ها در پیوست الف این استاندارد شرح داده شده است .

مـراجع مـربوط بـه مطالعـات قبلی در مورد این مواد و آزمون جنینی – لاروی در پیوست ب ذکر شده اسـت . در مـراجع مـربوط بـه زبرافـیش استفاده از سایر گونه های ماهیان آب شیرین نیز به منظور کسب تجربه، مجاز شناخته شده است.

---

[1] -Gametogenesis
[2] -Embryo and Larval stages
[3] - Danio rerio
[4] - Hamilton Buchanan
[5] - teleostei
[6] - cyprinidea
[7]-Zebrafish
[1] -Brachydaniorerio
[2] –Danio rerio

کیفیت آب – تعیین سمیت زایی در جنین ها و لاروهای ماهی آب شیرین – روش نیمه ایستا

۵ ۱ هدف و دامنه کاربرد

در ایـن اسـتاندارد روشی نیمه ایستا جهت تعیین سمیت مواد شیمیایی ، آب ها و فاضلاب ها نسبت به مـراحل رشـد جنینی و لاروی اولیهٔ گونه هایی از یک نوع ماهی آب شیرین تحت نام *دانیورریو، تلؤستی ، سیپرینیده* با نام معمول زبرا فیش شرح داده شده است. در صورت لزوم ، این اندازه گیری می تواند شامل انجـام آزمـون سـمیت حـاد با استفاده از دانیو رریو جهت تعیین LC_{50} درمدت ۹۶ ساعت برای زبرافیش طـبق استانداردهای ملی ایران[۱].... باشد . اگر در شرایط آزمون به ویژه در مورد دما و حجم به ازای هر توده ماهی اصلاحاتی انجام شود، این روش در مورد ماهیان آب شیرین به غیر از زبرافیش نیز کاربرد دارد.

یادآوری- روش آزمون سمیت نیمه ایستا تحت عنوان آزمون سمیت با تجدید تناوبی نیز نامیده می شود.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است . بدین ترتیب آن مقررات جزیی از این استاندارد محسوب می شود . در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و /یا تجدید نظر، اصـلاحیه هـا و /یـا تجدید نظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست . معهذا بهتر است کاربران ذینفع این اسـتاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدید نظرهای مدارک الزامی را مورد بررسی قرار دهند . در مـورد مراجع بدون تاریخ چاپ و /یا تجدید نظر آخرین چاپ و یا تجدید نظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر 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 6341 , 1996 , Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna straus (Cladocera , Crustacea) – Acute toxicity test.

2– 3 ISO 7346-1 , 1996 , Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydaniorerio Hamilton Buchanan (Teleostei , Cyprinidae)] – Part 1 : Static method .

2 – 4 ISO 7346 – 2 , 1996 , Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydaniorerio Hamilton Buchanan (Teleostei , Cyprinidae)]- Part 2 : Semi – static method

2 – 5 ISO 7346 – 3 , 1996 , Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydaniorerio

---

[۱]- تا تدوین استانداردهای ملی ایران ، به استانداردهای بین المللی ISO 7346-1 , ISO 7346 – 2 و ISO 7346-3 رجوع شود.

۶ ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و / یا واژه ها با تعاریف زیر به کار می رود:

۳-۱ آزمون سمیت نیمه ایستا (آزمون سمیت با تجدید تناوبی)

آزمون سمیتی است که در آن بخش عمده محلول مورد آزمایش (بیش از ۹۵ درصد) تنها پس از فواصل نسبتا طولانی برای مثال ۱۲ یا ۲٤ ساعت به صورت انتزاعی(در آوردن جزئی از کل) تعویض می شود یا طی آن ارگانیسم ها با فواصل زمانی منظم (معمولا هر ۲٤ ساعت)به صورت انتزاعی تعویض می شود یا طی آن ارگانیسم ها با فواصل زمانی منظم (معمولا در هر ۲٤ ساعت) به محلول جدیدی از ماده با غلظت مشابه غلظت اولیه منتقل می شود.

۳ – ۲ غلظت اثر[1] (EC_X)

غلظتی از آزمایه است که به طور تجربی به دست آمده و سبب کاهش X درصدی سرعت رشد ویژه نسبت به شاهد می شود .

یادآوری–EC_{50}در مورد بقا معادل با LC_{50} [2] (غلظت کشنده برای ۵۰ درصد ارگانیسم های آزمون) می باشد .

۳ –۳ سرعت رشد ویژه (μ)

افزایش سرعت نسبی رشد توده زیستی بر حسب تراکم سلولی (تعداد سلول ها در واحد حجم محیط کشت) در واحد زمان $\mu = \frac{dx}{xdt} = (day)^{-1}$ می باشد.

۳ – ۴ پایین ترین غلظت اثر مشاهده شده (LOEC) [3]

پایین ترین غلظت تحت آزمون نمونه آزمایشی است که در مقایسه با شاهد در سطح اطمینان کمتر یا مساوی ۰/۰۵ تاثیر معنی داری دارد.

یادآوری – تمامی غلظت های بالای LOEC آزمون ، دارای اثر مضری معادل یا بزرگتر از اثر مشاهده شده در NOEC می باشد.

۳ –۵ غلظت بدون اثر (NEC) [2]– نقطه معادل صفر(ZEP)[3]

برآوردی از غلظت آزمون است که در آن غلظت ، پاسخ معادل با عکس العمل شاهد عمل نکرده(اثر نکرده) می باشد .

یا دآوری – NEC بویژه زمانی مفید است که تحریک در غلظت های پائین مشاهده شود .

---

[1] - Effect concentration
[2]- Lethal concentration
[3]- Lowest observed effect concentration
[2]- No effect concentration
[3] - Zero equivalent point

۳ – ۶ غلظت اثر مشاهده نشده NOEC [۴]

غلظتی از آزمون است که بلافاصله پایین تر از LOEC قرار می گیرد.

۴ اساس روش

تخم هایی که تازه بارور می شوند در معرض یک سری غلظت های نمونه مورد آزمون از قبیل نمونه شاهد (غلظت صفر) قرار می گیرند، به دلایل عملی، تخم ها به عنوان جنین تلقی می شوند. به طور روزانه تعداد تخم ها یا لاروهای باقی مانده و در آمده از تخم ، در تمامی محلول های آزمون که روزانه تجدید می شود (روش نیمه ایستا) ثبت می گردند . هیچ غذایی فراهم نمی شود . دورهٔ استاندارد در معرض قرار گرفتن تخم ها در محلولهای آزمون ، ۱۰ روز بوده ولی ممکن است که آزمایش در صورت لزوم به منظور افزایش حساسیت تا ١٤ روز نیز تمدید شود.

روش اجرای آزمون به طور کامل، از قبیل آماده سازی و محاسبات ، طی ٤ هفته انجام می گیرد.

از داده های حاصله ، جهت محاسبه ی میانگین زمانی در آمدن از تخم و بقا در غلظت های مورد آزمایش و نمونه های شاهد استفاده می شود. غلظت های فاقد اثر(NEC_s)از رابطه اثر – غلظت در مورد درآمدن از تخم و بقای ارگانیسم ، تعیین می شود .

غلظت های اثر با اثرات درصدی مطلوب (EC_{xs}) نیز قابل اندازه گیری بوده و نتایج آن را می توان با بیشترین غلظت NOEC و کمترین غلظت LOEC در مقایسه با نمونه های شاهد، ارزیابی کرد. قبل از اندازه گیری ممکن است تعیین سمیت حاد نمونه (LC_{50} در ۹٦ ساعت) برای زبرافیش طبق استانداردهای ملی ایران [۱] .... مفید باشد.

۷ ۵ موادلازم

۵ – ۱ آب رقیق آزمون

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده برای تهیه آب رقیق باید از نوع آزمایشگاهی بوده و آب رقیق بایدازخلوص بالائی برخورداربا‌شد. آب مقطریا بدون یون مورد استفاده برای تهیه آب رقیق می بایست عاری از مواد شیمیایی دارای درجهٔ هدایت بزرگتر از ۱۸۰۰ زیمنس بر متر (مهو بر متر) باشد . بنابراین جهت تهیه آب رقیق آزمون می بایست املاح اضافه شود.

آب رقیق را ۱ تا ۷ روز قبل از استفاده تهیه کنید و در مخازن کاملا" تمیز شده مواد شیمیایی نگهدارید . آب رقیق باید دارای pH ۰/۲ ± ۷/۵ و سختی معادل ۱۰ ± ۱۰۰ میلی گرم اکسید کلسیم بر لیتر باشد . مراحل تهیه آب رقیق به شرح زیر است :

۵ – ۱ – ۱ محلول کلرید کلسیم

۱۱/۷٦ گرم $CaCl_2 .2 H_2O$ را در آب حل کنید و با آب حجم آنرا به ۱ لیتر برسانید .

---

[4] - No observed effect concentration

[۱]– تا تدوین استانداردهای ملی ایران، به استانداردهای بین المللی ISO 7346-1 ، ISO 7346 – 2 و ISO 7346-3 رجوع شود.

۵ – ۱ – ۲ محلول سولفات منیزیم

۴/۴۳ گرم $MgSO_4 .7 H_2O$ را در آب حل کنید و با آب حجم آنرا به ۱ لیتر برسانید.

۵ – ۱ – ۳ محلول کربنات هیدروژن سدیم

۲/۵۹ گرم $NaHCO_3$ را در آب حل کنید و با آب حجم آنرا به ۱ لیتر برسانید .

۵-۱-۴ محلول کلرید پتاسیم

۰/۲۳ گرم KCl را در آب حل کنید و با آب حجم آنرا به ۱ لیتر برسانید .

۱۰۰ میلی لیتر از هر یک از محلول های ۵ – ۱ – ۱ تا ۵ – ۱ – ٤ را به تقریبا" ۵ لیتر آب رقیق اضافه کرده و آنرا تا رسیدن به حجم کلی ۱۰ لیتر رقیق نمایید .

آب رقیق از محلولهای پایه مشابه مورد استفاده در آزمون سمیت حاد *دافنیا*[1] بر طبق استانداردملی ایران[2]....

تهیه می شود ولی در اینجا از آب به صورت خیلی رقیق استفاده می گردد. آب رقیق را با استفاده از یک لولهٔ شیشه ای هوادهی کنید تا اینکه غلظت اکسیژن محلول به ۹۰ تا ۱۰۰درصد میزان هوای اشباع در دمای ۲٦ زینه سلسیوس برسد . در همان لحظه میزان pHتثبیت می گردد. در صورت لزوم pH را با استفاده از افزودن رقت های مناسبی از محلول هیدروکلریک اسید یا محلول هیدروکسید سدیم تنظیم نمایید . بنابراین آب رقیق تهیه شده باید قبل از استفاده در معرض هیچ گونه هوادهی اجباری بعدی قرار نگیرد .

یادآوری – اگر آزمون به منظورهایی انجام گیرد که استفاده از آب رقیق با خصوصیات متفاوت با موارد توصیف شده فوق را ایجاب نماید، در آن صورت مرجع مورد نظر بایستی ویژگی های اصلی آب رقیق مورد استفاده را در گزارش آزمون قید کند.

۵ – ۲ محلول های ذخیره[3]

محلول ذخیره ای از مواد مورد آزمون را با توزین مقدار مشخص مواد و حل کردن آن در حجم مشخصی از آب رقیق (طبق بند ۵ –۱) آب یون زدایی شده، یا آب مقطر تهیه کنید .

محلول ذخیره را بطور روزانه تهیه نمایید مگر در مواردی که مشخص شده باشد که مواد در محلول ، پایدار می باشد. در چنین موقعیت هایی ، مقدار کافی از محلول ها برای آزمون کامل ممکن است تهیه شود.

محلول های ذخیره مواد را که دارای محلولیت کمی در آب هستند ، با استفاده از ابزار مناسب مثل دستگاههای مافوق صوت یا حلال هایی با سمیت کم به ماهی مستقیما" در محیط کشت آزمون (طبق بند ۵ – ۱) حل نمایید . بعدا" با استفاده از آب رقیق (طبق بند۵ – ۱) آنها را به حجم نهایی برسانید .

موقعی که از استن یا سایر حلال های مناسب استفاده می شود ، غلظت حلال در محلول نهایی آزمون نباید از۰/۱ میلی لیتر در لیتر تجاوز کند و دو محلول شاهد ، یکی بدون حلال و دیگری با حداکثر غلظت حلال باید در آزمون منظور شود (به استاندارد ملی ایران [1] ....).

---

[1] - Daphnia

[2] –تا تدوین استاندارد ملی ایران به استاندارد بین المللی ISO 6341 رجوع شود.

[3] -Stock solutions

[1] – تا تدوین استاندارد ملی مربوط ، به استاندارد ISO 5667- 16 مراجعه شود.

موقعی که فاضلاب مورد آزمون قرار می گیرد ، نمونه اولیه باید با محلول ذخیره ترکیب شود . در صورتیکه فاضلاب را نتوان بلافاصله مورد آزمون قرار داد ، آنرا به حجم های کوچکتری تقسیم کرده و داخل مخازن نمونه برداری از جنس پلاستیک بی اثر ریخته و به صورت یخ زده (در دمای ۲۰ – زینه سلسیوس) نگهداری کنید بطوری که در شروع و بازسازی مقادیر مورد لزوم محلول آزمون بتواند رفع انجماد شده و در صورت وجود ضرورت در طول تهیه محلول های آزمون بر طبق استاندارد ملی ایران[۲]....

تا pH مناسب تنظیم می گردد.

اگر pH محلول پایه خارج از محدودهٔ ۰/۲ ± ۷/ ۵ باشد ، در آنصورت ممکن است تنظیم pH در محدودهٔ ۰/۲ ± ۷/۵ ضرورت داشته باشد . هر گونه تنظیم مورد نیاز باید بوسیلهٔ محلول رقیق اسید هیدروکلریک و هیدروکسید سدیم صورت گیرد.

۵ – ۳ محلولهای آزمون

محلولهای آزمون را بطور روزانه و ۱ ساعت قبل از استفاده در آزمون ماهی یا تخم ها و بوسیله ی محلول ذخیره (طبق بند۵ – ۲) و آب رقیق آزمون (طبق بند۵ – ۱) به نسبت های مناسب تهیه نمایید .

محلولهای ذخیره و آزمون را فقط در مخازنی از جنس مواد شیمیایی بی اثر تهیه و نگهداری کنید.

۶ وسایل لازم

تمامی موادی که احتمالا" در تماس با آب یا محلول و در طول دوره مشروط کردن در تماس با والدین ماهی یا تخم ها و لاروهای مورد آزمون قرار دارند، باید از جنس مواد شیمیایی بی اثر باشند ، (مانند : شیشه ، استیل ضد زنگ ، نایلون (پلی آمید) ، پلی اتن و یا پلی پروپیلن ، سیلیکون ، تفلون) به عبارت دیگر موادی تا غلظتی که ممکن است نتایج را تحت تاثیر قرار دهند ، به داخل آب ، شسته[۱] نشوند . تمام مواد مورد استفاده باید به طور کامل قبل از استفاده ، تمیز شده و با آب رقیق آزمون (طبق بند۵ – ۱) آبکشی شوند.

۶ –۱ مخازن آزمون کم عمق

به ظرفیت تقریبی ۱۰۰ میلی لیتر، از نوع ظرف پتری با قطر داخلی ۱۰۰ میلی متر و مجهز به یک پوشش

۶ – ۲ کنترل کننده دما

از جا ظرفی (کابینت) ، حمام آب یا یک اتاق کنترل شده با ترموستات طوری استفاده کنید که توانایی نگهداری دمای محلول های آزمون را در محدوده ۲ ± ۲۶ زینه سلسیوس داشته باشند و باید در مورد گرمخانه گذاری های آزمون و شاهد مورد استفاده قرار گیرند .

یا داوری – یک اتاقی که دمایش با ترموستات تا ۲ ± ۲۶ زینه سلسیوس کنترل شده هست ، ترجیح داده می شود ، به دلیل این که باعث می شود محلول های آزمون سریعتر به تعادل دمایی رسیده و تغییرات دمایی در طول انتقال تخم

---

[۲]- تا تدوین استانداردملی مربوط، به استاندار د ISO 5667-16 رجوع شود.

1- Leach

هـا و لاروهـا بـه محلول های جدید در آن در حد کمینه می باشد. تخم های جدیدا" بارور شده مخصوصا" به تغییرات دمایی حساسیت دارند .

دمای محلولهای آزمون را حتی اگر ترموستات در دمای هوا کار میکند ، یادداشت کنید .

دمای هوا در مقایسه با دمای آب ، تغییرپذیری زیادتری را نشان می دهد.

۶ – ۳ توری ها و پیپت ها

والدیـن ماهـی را با توری های غوطه ور از جنس نایلون (پلی آمید) یا سایر مواد نرم جابجا کنید . تخم ها و لاروها را بوسیله پیپت (مثل پیپت های پاستور) با دهانه جلا داده شده[۲] ۲ میلی متری جابجا کنید.

۶ –۴ تجهیزات اندازه گیری

الکترود اکسیژن ، pH متر ، دماسنج

۷ روش اجرای آزمون

۷- ۱ محیط آزمایش

نگهـداری محلولهـا و در معـرض قرار دادن ارگانیسم های آزمون را طبق این استاندارد ، تحت روشنایی معمولـی آزمایشـگاه با ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی،۱٤ساعت روشنایی و۱۰ ساعت خاموشی یا ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی در دوره در معرض قرار گرفتن انجام دهید .

محلولهـا ی ذخـیره ممکـن اسـت در صـورت لزوم به سرعت سرد شده و در تاریکی نگه داشته شوند . هـوای محـیط آزمـایش را تحـت دمـای ۲ ±۲٦ زینه سلسیوس و عاری از بخارات یا گردهای سمی برای ارگانیسـم مـورد آزمـون نگهداری کنید. نگهداری اولیهٔ ماهی و تمام اعمال جابجایی و آزمون باید در اتاق هایی انجام شود که هوای آنجا عاری از غلظت های خطرناک گرد و بخارات سمی باشد.

۷ – ۲ ماهی مورد آزمون

آزمـون را بـر روی *دانـیو رریو* ، *زبرافیش* از منبع مشخص اجرا کنید. عمل آزمون را در مورد تخم های تـازه بـارور شـده (جنیـن هـای) حاصـله از والدینـی که به مدت حداقل ۲ هفته قبل از آزمایش با شرایط محیطی مشخص (طبق بند ۷-۱) عادت کرده اند ، انجام دهید . آب مورد استفاده جهت عادت دادن و تخم ریـزی والدیـن (ماهیان نر و ماده) باید دارای کیفیت تایید شده برای زاد و ولد ماهیان بوده و ویژگی هایی مـثل pH، سـختی و میزان اکسیژن محلول آن باید مشابه آب رقیق آزمون (طبق بند۵ – ۱) باشد. تخم هایی کـه صبح بعد ازروشن شدن منبع روشنایی در ظرف یک ساعت تولید می شوند ، جمع آوری کنید . بعد از ۲ الـی ۳ ساعت آزمون را شروع کنید (زمان صفر). تخم های (جنین های) مورد استفاده در شروع آزمایش (زمـان صـفر) دارای سـنی حدود ۲ تا ٤ ساعت می باشند .این عمل، مطابق با مراحلی است که بلاستولا[۱] ایجاد می شود.

یادآوری – شرایط تولید تخم ها در پیوست الف شرح داده شده است .

۷– ۳ شرایط ماهی

---

[2]-Polished opening
[1] - Blastula

کیفیت تخم های زبرافیش بین جفت های اختصاصی و همچنین از یک تخم ریزی به تخم ریزی دیگرمی تواند متنوع باشد . تخم های قابل زنده ماندن ، شفاف هستند . کیفیت تخم های ضعیف بعد ازچند ساعت پس ازشروع آزمون ها و موقعی که تخم های مرده ، سفید رنگ می شوند ، مشخص می گردند. بعد از ٢٤ ساعت تمام تخم های مرده سفید رنگ می شوند . مقدار درصد تخم های مرده در مخازن شاهد بعد از ٢٤ ساعت معمولا" نباید از ٣٠درصد فراتر رود. زمان متوسط برای از تخم درآمدن در محلولهای شاهد بایستی بین ٢ و ٤ روز باشد. زمان متوسط برای بقای جنین - لارو در محلول های کنترل معمولا" بین ١٢ و ١٦ روز می باشد.این موضوع ، دورهٔ در معرض قرار گرفتن را در مورد حالت استاندارد به ١٠ روز و دورهٔ بیشینه را به حدود ١٤ روز کاهش می دهد . دوره های طولانی تر در معرض قرار گرفتن ممکن است حساسیت را به دلیل اثر ترکیبی گرسنگی و تجمع طولانی مدت مواد شیمیایی سمی در محلول های آزمون افزایش دهد . اگر نسبت تخم های مرده در محلول های شاهد و محلول هایی از مواد مورد آزمون از ٣٠درصد فراتر رود ، دقت آزمون کاهش خواهد یافت و در صورت امکان ، آزمون باید خاتمه یافته و با یک بهرجدیدی از تخم ها تکرار شود.

٧ – ۴ روش آزمون

آزمون سمیت بر جنین – لارو معمولا" به اندازه گیری سمیت حاد طبق استانداردهای ملی ایران[1]....حق تقدم دارد . آزمون سمیت بر جنین – لارو باید مشتمل بر یک نمونه شاهد و حداقل ٦ غلظت متفاوت از نمونه باشد و غلظت ها باید طوری انتخاب شوند که حداقل ٢ عدد از بالاترین غلظت های نمونه اثر معنی داری در مقایسه با نمونه های شاهد بر از تخم درآمدن یا بقای ارگانیسم داشته باشد و اینکه حداقل ، پایین ترین غلظت نمونه دارای هیچ گونه اثر معنی داری نباشد.

غلظت ها برای آزمون باید طوری انتخاب شوند که سری هندسی تشکیل دهند. مثل غلظت های ٢ ، ١ ، نسبت های ١ به ٢ ، ١ به ٤ ، ١ به ٨ ، ١ به ١٦ برابر $LC_{٥٠}$ در طول مدت ٩٦ ساعت . در صورت مشکوک بودن به این که نمونه مورد آزمایش شامل موادی با اثر سمی کند می باشد ، مقدار غلظت ها را با استفاده از چندین غلظت پایین تر (نسبت های ١ به ٣٢ ، ١ به ٦٤ ، ١ به ١٢٨ ، ١ به ٢٥٦ ، ١ به ٥١٢ برابر $LC_{٥٠}$ در طول مدت ٩٦ ساعت) افزایش دهید . در صورتی که پایین ترین غلظت باعث هر گونه اثری نسبت به نمونه های شاهد شود ، غلظت های پایین تر را مورد آزمون قرار دهید .

یادآوری – در این نوع آزمون ، معمولا غلظت های پایین باعث بقای طولانی تر نسبت به نمونه های شاهد می شود.

در مورد هر غلظت از دو ظرف پتری شامل حداقل ٢٥ میلی لیتر محلول آزمون (دو تکرار از غلظت ها برای در معرض قرار گرفتن) و در مورد نمونه های شاهد از حداقل ٤ ظرف پتری محتوی ٢٥ میلی لیتر آب رقیق (طبق بند٥ – ١) (منظور تعداد ٤ نمونه شاهد است) استفاده کنید.

در آغاز آزمون (زمان صفر) ، غلظت اکسیژن ، pHو دمای نمونه و محلول های شاهد را اندازه گیری کنید .میزان بدست آمده باید در داخل محدوده های بیان شده در بند ٨ – ١ باشد . در طول مدت زمان ١

---

[1]- تا تدوین استانداردهای ملی ایران، به استانداردهایبین المللی ISO 7346-1 ، ISO 7346 – 2 و ISO 7346-3رجوع شود.

ساعت از آماده سازی محلولهای آزمون ، ۱۵ تخم (۲ تا ٤ ساعت بعد از تخم ریزی) به تمامی ظروف انتقال دهید (زمان صفر) . تخم ها را به طور تصادفی از یک جمعیت حاصله از یک یا چند ماده انتخاب کرده و آنها را به طور تصادفی به داخل ظروف آزمون و شاهد توزیع نمایید . با استفاده از پیپت (طبق بند٦–۳) تخم ها و لاروها را جابجا کنید ، آنها نبایستی در تماس با هوا قرار گیرند. مقدار مایع همراه (اطراف) تخم ها را در حین انتقال در حداقل نگهداری کنید.

مخازن آزمون و شاهد را پوشانده و در دمای ۲ ± ۲٦ زینه سلسیوس تحت شرایط شدت نور معمولی آزمایشگاه به مدت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی ، ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت خاموشی ، ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی در روز گرمخانه گذاری کنید .

بعد از ٢٤ ساعت ، تعداد متغیری از ۱۵ جنین خواهند مرد و تخم ها سفید رنگ خواهند شد. تعداد تخم های مرده در هر ظرف را یا دداشت کنید و تعداد تخم های زنده را در موقع انتقال به محلولهای تازه در هر ظرف ، حداکثر به ۱۰ عدد کاهش دهید . اندازه گیری زمان های متوسط از تخم درآمدن و بقا باید تنها بر اساس این ۱۰ تخم باقیمانده ویژه که حالا یک روزه می باشند ، انجام گیرد. مخازن جدید آزمون را با حداقل ۲۵ میلی لیتر محلول تازه (کمتر از ۱ ساعت عمر) در زمان متناسب با روزهای بعدی آماده کنید . تخم های قابل زنده ماندن(شفاف) و لاروهای زنده را (که یا بعد از تحریک بوسیلهٔ سریع و ملایم زدن برلبهٔ ظرف با پیپت یا با راندن سریع آب از پیپت تحرک خودبخودی از خود نشان می دهند،) به داخل ظروف جدید انتقال دهید . تعداد تخم ها و لاروهای مرده و زنده را یادداشت نمایید . در مورد محلول های تازه و قدیمی ، میزان اکسیژن ، pH و دما را اندازه گیری کنید . ابتدا بالاترین و پایین ترین غلظت های محلول های نمونه و شاهد را کنترل کنید . در صورت بزرگ بودن اختلاف مقادیر در بین این محلولها تمامی محلول های آزمون باید مورد اندازه گیری قرار گیرند .

از تخم درآمدن معمولا " بعد از ۲ تا ٤ روز اتفاق می افتد . به منظور تصمیم گیری در مورد اینکه آیا زمان از تخم درآمدن تحت تاثیر قرار گرفته یا نه ، در روزهای دوم یا سوم و چهارم ، تعداد تخم ها و لاروهای از تخم درآمده را هر صبح و بعداز ظهر یادداشت کنید. (زمان دقیق را ثبت نمایید). بعدا" از این نتایج می توان جهت محاسبه زمان متوسط از تخم در آمدن استفاده کرد. بعد از انقضای ۱۰ روز، آزمون را خاتمه بدهید یا وقتی که حداقل ۹۰درصد از لاروها در تمامی محلولهای آزمون از بین رفتند ، حساسیت آزمون را افزایش دهید .

۸ نتایج آزمون

۸ – ۱ اعتبار

در صورتیکه نیازمندی های زیر برآورده شده باشند ، نتایج باید معتبر شناخته شوند :

- غلظت اکسیژن محلول در نمونه های شاهد بین ۷۰ و ۱۱۰درصد میزان هوای اشباع در مورد آب رقیق تحت دمای ٢٦ زینه سلسیوس نگهداشته شوند .
- pH در مورد تمامی محلولهای تازه ۰/۲ ± ۷/۵ باشد.
- دمای محلولهای آزمون در حدود ۲ ± ٢٦ زینه سلسیوس نگهداشته شود .

- بیش از ۷۰درصد از جنین ها (تخم ها) در نمونه های شاهد ، بعد از ۲٤ ساعت زنده بمانند .
- زمان متوسط برای از تخم درآمدن در نمونه های شاهد ۲ تا ٤ روز باشد .
- نسبت لاروهای باقیمانده در نمونه های شاهد بعد از ۱۰ روز بیش از ۹۰درصد باشد .
- در صورت طولانی شدن آزمون زمان متوسط بقا در نمونه های شاهد ۱۲ تا ۱٦ روز باشد.

۸ – ۲ اندازه گیری میزان اثر

تعیین میزان اثر (غلظت هایی با اثر توصیه شده یا فاقد اثر) را می توان با استفاده از رگرسیون روابط عکس العمل دز (شیوه NEC و EC_X) یا آزمون فرضیه (به شیوه LOEC - NOEC) انجام داد این دو شیوه اغلب سطوح اثر مشابهی را ایجاد می کنند. در عین حال برخی اوقات نتایج غیر مشابهی را ایجاد می کنند .بنابراین پیشنهاد می گردد بمنظور ایجاد همبستگی احتمالی با تفسیر داده ها در مورد تخمین سمیت نمونه مورد آزمون از هر دو روش استفاده گردد .

زمان متوسط از تخم درآمدن و بقای ارگانیسم را بصورت گرافیکی در روی کاغذ لگاریتمی دقیق یا تجزیه و تحلیل دقیق (معتبر) و یا روش مشابه د رمورد هر یک از غلظت ها و نمونه های شاهد، تعیین کنید .روش مورد استفاده برای اندازه گیری باید در گزارش قید گردد .ترجیحا" روش هایی که دارای فاصلهٔ اطمینان ۹۵درصد می باشند باید مورد استفاده قرار گیرند . در یک نمودار با مقیاس لگاریتمی، منحنی مقدار زمانهای متوسط از تخم درآمدن و بقای ارگانیسم را نسبت به غلظت های مربوط را رسم کنید . اعتبار نتایج را (طبق بند۸ – ۱) کنترل نمایید. همچنین دقت کنید که غلظت های مناسب مورد استفاده قرار گیرند . (طبق بند ۷ – ٤) خطوط را طبق نمودار ب –۱ پیوست ب تعدیل نمایید و از روی نمودار ، غلظت بدون اثر (**NEC**) را برای از تخم درآمدن و بقای ارگانیسم اندازه گیری کنید . از داده های ثبت شده در مورد لاروهای از تخم درآمده و بقای ارگانیسم / یا مرگ و میر لاروها بعد از زمان های مختلف همچنین می توان جهت تعیین EC /LC_X استفاده نمود . $EC_{۵۰}$در مدت ۱۰ روز برای تحت تاثیر قرار دادن از تخم در آمدن و بقا در نمودار (ب – ۲) نشان داده شده است . مقادیرEC_x در مورد درصد مختلف اثرات ، می تواند با محدوده اطمینان دوطرفه ۹۵درصد بعد از زمان های مختلف در معرض قرار گرفتن محاسبه گردد . محدوده های اطمینان درمورد درصد پایین تر سطوح اثر در مقایسه با سطح اثر ۵۰درصد تمایل به زیادتر شدن دارد.

NOEC , LOEC را طبق تعریف بند ۳ تعیین کنید و این عمل را با استفاده از یک روش آماری مناسب مثل تجزیه واریانس[1] که منتهی به انجام چندین مقایسه درمورد غلظت های مختلف آزمون با نمونهٔ شاهد بوسیله ی آزمون دانت[2] یا آزمون ویلیام[3] می شود، انجام دهید. نمونه ای از این اندازه گیری در داده های جدول ب – ۱آمده است (مشابه داده های مورد استفاده در نمودارهای ب –۱ و ب –۲)

---

[1] - ANOVA
[2] - Dunnett's test
[3] - William's test

۸ ۹ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۹ - ۱ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران ....

۹ – ۲ نام و نشانی کامل آزمایشگاه

۹-۳ نام و نام خانوادگی مسؤل انجام آزمون و امضای او

۹ – ۴ تاریخ آزمون (روز صفر)

۹ - ۵ ماده یا مواد آزمون

۹ – ۶ مشخصات کامل نمونه

۹ – ۶ – ۱ در مورد مواد ،جزئیات مربوط به درصد خلوص یا اجزای فعال و سایر ترکیبات فرآوردهٔ فرمول بندی شده وغلظت های مربوط به ماده خالص یا فرآوردهٔ فرمول بندی شده.

۹-۷ محل نمونه برداری

۹ – ۷ - ۱ در مورد فاضلاب ، مواد و مخلوط های ناپایدار ، جزییات زمان نمونه برداری ، منابع و مخازن نگهداری و دماها و تصفیه های مقدماتی به همراه نام یا نامهای شخص یا اشخاص مسئول نمونه برداری باید قید شود .

۹ – ۸ روش تهیهٔ محلول ذخیره

۹ – ۹ ماهی مورد آزمون :

۹ – ۹ – ۱ نام علمی گونه های مورد آزمون (*دانیو رریو* یا سایر).

۹ – ۹ – ۲ مبدا والدین ماهی و جابجایی و شرایط نگهداری و تخم ریزی آنها (دما ، دورهٔ قرار گرفتن در معرض نور ، ویژگی های کیفی آب) ، و

۹-۹-۳ روش جمع آوری تخم های بارور شده و جابجایی بعدی آنها .

۹ – ۱۰ قید کردن شرایط آزمون موقع ارزیابی اعتبار آزمون مثل دامنه های اندازه گیری شده غلظت اکسیژن ، pH و دما

۹ – ۱۱ غلظت اسمی مواد مورد آزمون در محلولهای آزمون مورد استفاده و در صورت در دسترس بودن غلظت های تجزیه و تحلیل شده مواد آزمون

۹ – ۱۲ نتایج :

۹ – ۱۲ - ۱ مرگ و میر اولیه جنین ها (در ۲٤ ساعت)

۹ – ۱۲ – ۲ زمان های متوسط از تخم درآمدن و بقا (تعداد روز ±۰/۱) در مورد محلول های شاهد و محلول های مختلف آزمون . روش مورد استفاده جهت تعیین زمان متوسط را بیان کنید و در صورت امکان ، فاصله اطمینان ۹۵درصد را برای زمان های متوسط در نظر بگیرید ؛

۹ – ۱۳ میزان اثر اندازه گیری شده :

۹ – ۱۳ – ۱ غلظت بدون اثر اندازه گیری شده به وسیلهٔ رگرسیون روابط عکس العمل دز جهت اثر گذاری بر مدت زمانهای از تخم درآمدن و بقای ارگانیسم.

۹ – ۱۳ – ۲ پایین ترین غلظت اثرمشاهده شده و غلظت اثرمشاهده نشده در مورد از تخم درآمدن و بقای ارگانیسم.

در مورد حالت های مشکوک ، مقادیر برآورد شده را توجیه کنید.

۹ – ۱۴ شرایط یا پیشامدهایی که در حین انجام آزمایش رخ می دهد و ممکن است نتایج را تحت تاثیر قرار دهد و هر گونه انحراف از استاندارد ملی ایران ....

پیوست الف

شرایط تولید تخم های زبرافیش

(اطلاعاتی)

الف – ۱ مقدمه

مبدا زندگی *زبرا فیش* (*دانیو رریو* که قبلا" تحت عنوان براچی دانیو رریو[1] نام داشت) در ساحل کوروماندل[2] هندوستان می باشد. محل زندگی این ماهی دارای جریانهای سریع می باشد. آن یک ماهی معمولی آکواریم است و اطلاعاتی در مورد روش های مراقبت و پرورش را میتوان در کتابهای مرجع استاندارد راجع به ماهی استوائی پیدا نمود. طول ماهی بندرت از ٤٥ میلی متر تجاوز می کند. بدن استوانه ای شکل بوده و حاوی ۷ تا ۹ نوار افقی برنگ آبی تیره در روی زمینهٔ نقره ای می باشد . این نوارها با باله های دمی و مقعدی برخورد دارد. پشت بدن برنگ سبز زیتونی هست . نرها لزج تر از ماده ها بوده و دارای درخشش طلایی می باشند. ماده ها بسیار نقره ای بوده و به ویژه قبل از تخم ریزی دارای شکم بیرون زده (بادکرده) می باشند. ماهی بالغ قادر به تحمل نوسانات دما، pH و سختی آب می باشد. در عین حال به منظور دستیابی ماهی سالم که تولید تخم های با کیفیت خوب کند،

---

[1] -Brachydaniorerio
[2] - Coromandel

بایستی شرایط بهینه تامین شود. در حین تخم ریزی ، ماهی نر ، ماهی ماده را تعقیب کرده و با سر می زند و وقتی که تخم ها بیرون آمدند ، آنها بارور می شوند . تخم هایی که شفاف و غیرچسبنده اند، به تـه که خطر خورده شدن دارند ، می افتند. در حدود ۱۰۰ تا ٤۰۰ تخم در حین هر تخم ریزی تولید می شود که این عمل حدود ۰/۵ ساعت طول خواهد کشید. تخم ریزی تحت تاثیر نور قرار دارد. در صورت کافی بودن نور در صبح ، به احتمال زیاد ، ماهی در ساعت اولیه بعد از سپیده دم (فجر) تخم ریزی خواهد کرد .

الف – ۲ مشروط کردن تخم ریزی و تولید تخم ها

تعداد مناسبی از ماهی سالم را انتخاب کنید. آنها را در آب با کیفیت خوب دارای ویژگیهای (اکسیژن محلول ، pH ، سختی) مشابه با آب رقیق آزمون (طبق بند۵ – ۱) به مدت حداقل ۲ هفته قبل از تخم ریزی مورد نظر نگهداری کرده و نرها و ماده ها را ۵ تا ۱۰ روز قبل از تخم ریزی از همدیگر جدا کنید. چگالی ماهی در طول این دوره نبایستی از ۳۰ ماهی در هر ۷۰ لیتر فراتر رود. تغییرات منظم آب ، به طور کامل تا جزئی ، زمینه را جهت استفاده از چگالی پایه بالاتر مثل ۳۰ ماهی بازای هر ۲۰ لیتر آب مساعد می کند .(در صورتی که هر دو روز ۷۵ درصد آب تعویض شود.)

نکته مهم در طول این دوره آن است که ماهی یک رژیم غذایی متنوع دریافت کند، این رژیم ممکن است شامل *آرتمیا*[1] ی زنده تازه از تخم درآمده ، *چیرونومیدها*[2] ، *دافنیا*[3] ، کرم های سفید[4] و جگر به خوبی خرد شده باشد. در صورت عدم دسترسی به غذای مناسب زنده ، انواع مناسب مواد غذایی یخ زدهٔ سریع همراه با جگر بخوبی خرد و کوفت شده منجمد ممکن است مورد استفاده قرار گیرد اما بایستی دقت کافی جهت برداشتن هر گونه باقیماندهٔ مواد غذائی به عمل آید . بعد از جداسازی ماهی نر و ماده بمدت ۵ تا ۱۰ روز، شکم های ماهیان ماده باد کرده خواهد شد و برجستگی کوچک تناسلی قابل رویت می گردد. ماهیان نر فاقد برجستگی کوچک (پستانک) تناسلی می باشند. مخزن تخم ریزی بایستی مجهز به یک تله (توری) کاذب انتهایی باشد که قادر است تخم ها را ازخورده شدن توسط والدین محافظت نماید. مخزن تخم ریزی رابا آب تازهٔ رقیق (طبق بند۵ – ۱) طوری پر کنید که سطح آب در بالا ی توری ۵ سانتی متر گودی (عمق) داشته باشد. دما را جهت شروع تخم ریزی تا حد ۲۷ زینه سلسیوس تنظیم کنید . ماهی نر و ماده را هنگام عصر به نسبت یک ماهی ماده به دو ماهی نر، به مخزن تخم ریزی منتقل کنید. لامپ (روشنایی) را خاموش کنید گاه گاهی ماهی در تاریکی تخم می ریزد . چنین تخم هایی بایستی ، صبح وقتی که هوا روشن شده و معمولا" تخم ریزی شروع می شود ، برداشته شوند . فقط تخم هایی که در طول اولین ساعت ریخته می شوند ، مورد استفاده قرار می گیرند ، چرا که این تخم ها موقع شروع آزمون در ۲ تا ۳ ساعت بعد از پایان عمل تخم ریزی دارای سن مشخصی خواهند بود. به این ترتیب بایستی سن تخم ها (جنین ها) در شروع آزمون (زمان صفر)

---

[1] - Artemia
[2] - Chironomids
[3] - Daphnia
[4] -White worms (Enchtraeids)

۲ تـا ٤ ساعت باشد. فقط تخم های سالم بطور مشهود شفاف ، بایستی مورد استفاده قرار گیرند .تعداد تخم ها و کیفیت آنها ممکن است در بین ماهیان ، مختلف و از یک دورهٔ تخم ریزی به دورهٔ دیگر تنوع قابل ملاحظه ای داشته باشد.

بعـد از ۲ تـا ٤ سـاعت ، جنیـن ها در مرحلهٔ بلاستولا، مراحل تکاملی را در طول مدت ۱۲ – ۸ سـاعت پشت سر خواهند گذاشت که این مراحل را می توان با استفاده از یک میکروسکوپ یا یک ذره بیـن تحت کنترل قرار داد . تحریک تخم ریزی ماهیان نر و ماده در زمان های مناسب ممکن است نیاز بـه برخـی تجـربه داشـته باشـد و تخـم ریـزی از تمام ماهیان ماده نبایستی مورد انتظار باشد . بنابراین پیشـنهاد مـی شود که حداقل ۱۰ ماهی ماده و ۲۰ ماهی نر یا بطور انفرادی در مخازن کوچک مجزا (به ظرفیـت ۵ لیـتر) یـا در یک آکواریم بزرگتر معمول برای تمامی ماهیان مورد استفاده قرار گیرند . یک مخزن تخم ریزی به شکل قیف برای این منظور شرح داده شده است . والدین ماهی ممکن است بطور مکـرر جهـت تخم ریزی متوالی متعدد مورد استفاده قرار گیرند . نتایج خوب تخم ریزی زمانی حاصل مـی شـود کـه ماهـی بطور تکراری و در فاصلهٔ هر هفته یکبار برای تخم ریزی اجازه داده شده یا القاء شود .

روش دیگـر تولـید تخـم کـه نـیاز بـه نگـه داری ماهـیان نر و ماده بطور جداگانه را منتفی می کند عبارتست از روش زیر:

در یـک آکواریـم شـامل ۷۵ لیـتر آب (بـه ارتفاع ۱۵ سانتی متر) با تجدید آب به مقدار ۲۰ لیتر بر سـاعت و انجـام هوادهی ، تقریبا" ٦۰ ماهی (حدود ۲۰ ماهی ماده و ٤۰ ماهی نر)را تحت دمای حدود ۲ ± ۲٦ زیـنه سلسـیوس و چـرخهٔ قـرار گرفتـن در معـرض نـور به مدت ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ سـاعت خاموشـی بـا نوردهـی تدریجـی (متوالی) نگه داری کنید . عصر روز قبل از تخم ریزی (روز مشـخص شده هفته)، یک ظرف پوشش دار حاوی توری سیاه رنگ با مش ۵ میلی متری ، وارد شده و سـطح آب تـا حـدود ۱ سانتی متر از بالای سرپوش کاهش داده می شود . با استفاده از این روش (فقط در صـورت انجـام تخـم ریـزی به مقدار یکبار در هفته در تمام دورهٔ کامل) میزان تخم ریزی ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ تخم در هر هفته در طول یک سال توسط یک پژوهشگر حاصل شده است . تخم ها و لاروهایی کـه در آزمونهـا مـورد استفاده قرار نگرفتند ، ممکن است طوری پرورش شوند که والدین ماهی مادر با تاریخچـهٔ مشـخص در آزمایشـگاه تولـید شـوند . ایـن عمل همچنین ممکن است مشکلات مربوط به بیماری های القاء شده بوسیلهٔ انتقال و سازگاری با محیط های جدید را محدود کند.

اسـتفاده از هـر گونه اعمال تصفیه شیمیایی تخم ها قبل یا در طول آزمون مجاز نیست ، چرا که این عمل ممکن است عکس العمل در برابر ماده یا مواد مورد آزمون را تحت تاثیر قرار دهد.

الف – ۳ مشکلات احتمالی در اجرای آزمون

در صـورتی که علیرغم دریافت رژیم غذایی کافی ، والدین ماهی هنوز با بی میلی تخم ریزی کنـند ، امکان دارد جهت تحریک تخم ریزی واقعی ، کوشش هایی صورت گیرد. اگر نور از یک طرف بطور مستقیم بتابد (با زاویهٔ ۳۰ درجه بطرف سطح آب) و به تدریج در طول حدود ۳۰ دقیقه در صبح

افـزایش یـابد ، این به معنی یک تظاهری از شروع زمانیست که ماهی اغلب در طبیعت تخم ریزی می کـند . عـلاوه بر این یک ماده تخم ریزی شامل رشته های سبز (با قطر ۱ میلی متر)می تواند در مخزن تخـم ریـزی قـرار گـیرد .در برخـی حالت ها ، مرگ و میر اولیه در بین تخم ها ممکن است بطور غیر معمول بالا باشد. دلایل این عمل به طور کامل مشخص نمی باشد .

دلایـل احتمالـی که بایستی در نظر گرفته شود عبارتست از : کیفیت ضعیف آب در نتیجهٔ تغذیهٔ زیاده از حـد، تغذیـهٔ ناکافی، انگل های اندوژن[1] و شروع پیری والدین ماهی . نصب یک صافی مکانیکی در مخازن نگهـداری ، دقـت زیـاد در تغذیه و تجدید ماهیان پیر و بطور آشکارمعیوب، اقداماتی هستند که می توانند مشـکل را حـل کنـند . دمـای نگهداری و مخزن تخم ریزی را تحت کنترل قرار داده و مطمئن شوید که در دامـنه هـای مشـخص نگهداشته شده و کیفیت آب در حد قابل قبول باشد . بی دقتی در جابجایی تخم ها ، بویژه درطول اولین ۲٤ ساعت همچنین ممکن است در مرگ و میر بالای تخم های ماهی ، سهیم باشد.

پیوست ب

نمونه ای از داده های مربوط به مرگ پذیری اولیه، زمان های از تخم در آمدن و بقای ارگانیسم

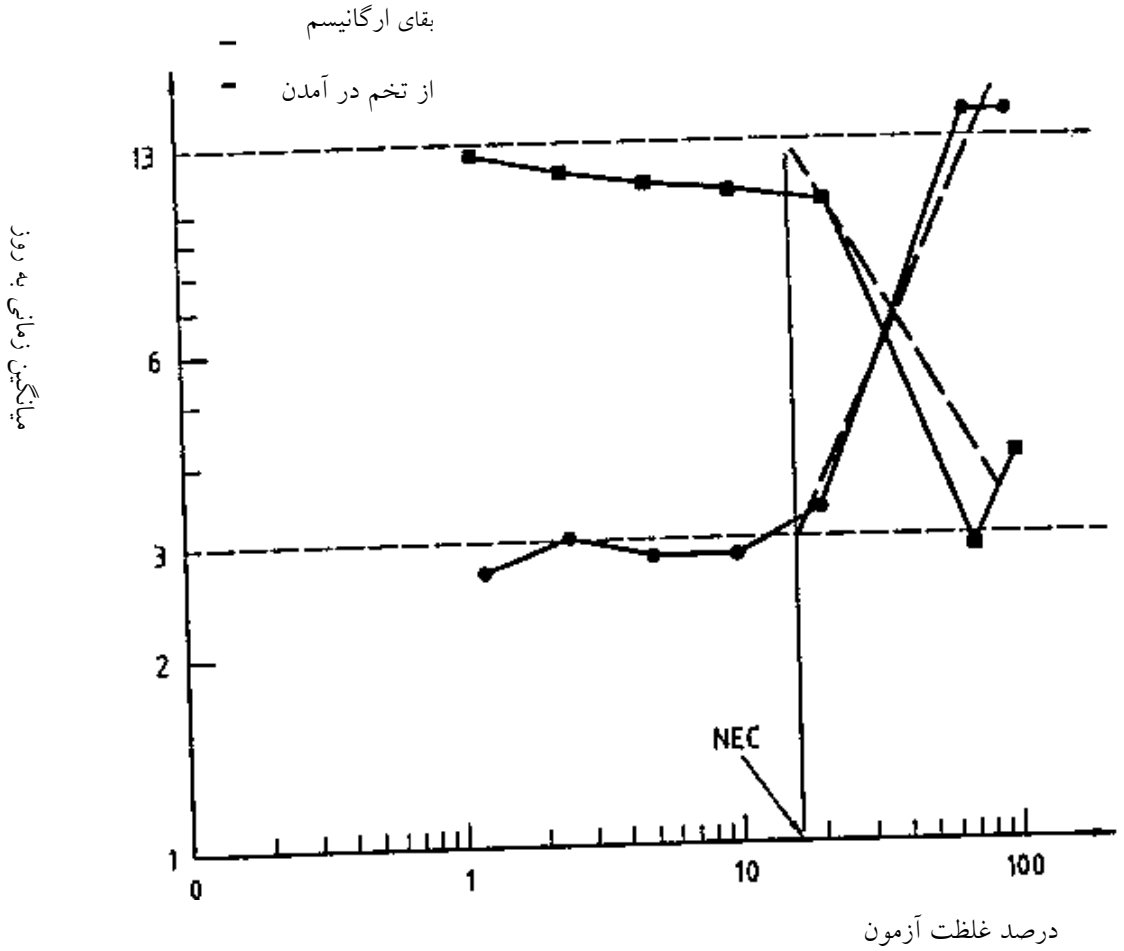
(اطلاعاتی)

جدول ب – ۱ – نمونه ای **از** داده های مربوط به مرگ و میر اولیه(بعد از ۲٤ ساعت) و میانگین زمانی از تخم در آمدن و بقا در آزمون یک فاضلاب(مقدار میانگین در خارج پرانتز به همراه مقادیر تکرار در داخل پرانتز نوشته شده است).

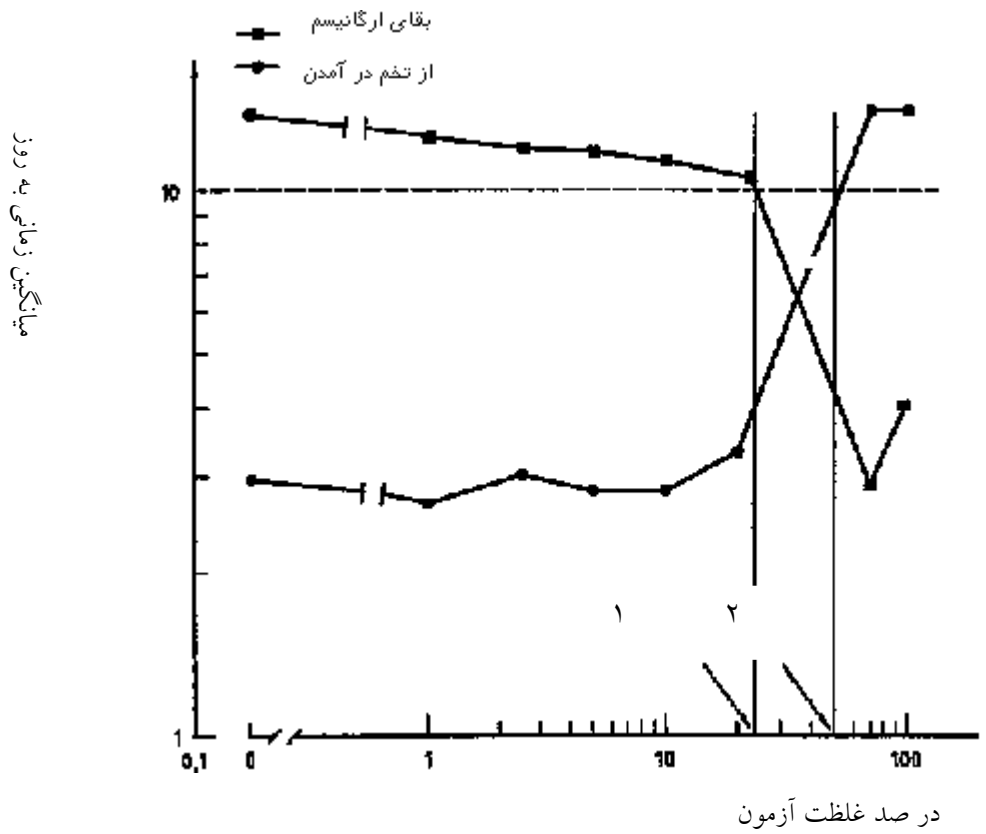
غلظت آزمون (به درصد حجمی)	درصد مرگ و میر اولیه	میانگین زمان از تخم در آمدن (به روز)	میانگین زمان بقای ارگانیسم (به روز)
صفر(شاهد)	۱۳ (۷، ۱۳، ۱۳، ۲۰)	۲/۹ (۲/۵، ۲/۹، ۲/۲ ، ٤/۰)	۱٤/۷ (۱٤/۳، ۱٤/۹ ، ۳ /۱۳، ۱٦/۳)
۱/٥٦	۱۳ (۷، ۲۰)	۲/٦ (۲/۳، ۲/۹)	۱٤/۱ (۱۲/۷، ۱٦/۲)
۳/۱۳	۷ (۷، ۷)	۲/۹ (۲/۷، ۳/۲)	۱۳/۷ (۱۲/٤، ۱٥/۲)
٦/۲٥	۷ (۷، ۷)	۲/٦ (۲/٤، ۲/۸)	۱۳/۱ (۱۲/٦، ۱۳/٦)
۱۲/٥	۳ (۷، ۰)	۲/٦ (۲/٤، ۲/۹)	۱۲/٦ (۱۱/۷، ۱۳/۷)
۲٥	۳ (۷، ۰)	۳/٦ (۲/۲، ٥/۰)	۱۱/۸ (۱۰/۸، ۱۲/۸)[b]
٥۰	۳ (۷، ۰)	بزرگ تر از ۱٦ (بزرگ	۲/۷ (۲/۲، ۳/۱)[a]

[1]-Endogenous parasites

		تر از ۱۶ ، بزرگ تر از ۱۶)[a]	
۱۰۰	۲۳ (۲۷ ، ۲۰)	بزرگ تر از ۱۶ (بزرگ تر از ۱۶ ، بزرگ تر از ۱۶)[a]	۳/۷ (۳/٤ ، ٤/۱)[a]
a مقدار اختلاف با شاهد حاصله از آزمون دانت و ویلیام در p کمتر از ۰/۰۵			
b مقدار اختلاف با شاهد حاصله از آزمون ویلیام (نه با آزمون دانت)در p کمتر از ۰/۰۵			



شکل ب – ۱ :نمودار مقادیر میانگین زمانی از تخم درآمدن و بقای نمونه های شاهد در غلظت های مختلف آزمون(مقادیر حاصله از جدول ب – ۱)که اندازه گیری ترسیمی غلظت بدون اثر(NEC) را برای از تخم در آمدن و بقای ارگانیسم نشان می دهد. در این حالت غلظت های بدون اثر برای از تخم درآمدن و بقای ارگانیسم معادل هستند.



راهنمایی: ۱ EC_{50} در مدت ۱۰ روز(بقای ارگانیسم)

۲ EC_{50} در مدت ۱۰ روز(از تخم در آمدن)

شکل ب – ۲ نمودار مقادیر میانگین زمانی از تخم در آمدن و بقای نمونه های شاهد در غلظت های مختلف آزمون(حاصله از جدول ب – ۱) که نشان گر موقعیت های نسبی EC_{50} برای از تخم در آمدن و بقای ارگانیسم می باشد.

یاد آوری – مقدار EC_{50} علاوه بر EC_x در مورد درصد های پایین اثر در سطح اطمینان ۹۵ درصد را می توان از روی داده های اولیه حاصله بعد از زمان های مختلف در معرض گذاری بدست آورد.

ICS: 13.060.70

صفحه: ۲۱