МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33038—2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Пчелы медоносные: тест на острую пероральную токсичность

(OECD, Test No213:1998, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

Предисловие

Цели, основные принципы и порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») на основе собственного аутентичного перевода на русский язык руководящего документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 декабря 2014 г. № 46)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Туркменистан	TM	Главгосслужба «Туркменстандартлары»
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2014 г. № 1989-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33038—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test No 213:1998 Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (Пчелы медоносные: тест на острую пероральную токсичность).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия — идентичная (IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2015

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Исходные положения 1
4 Принцип теста 2
5 Достоверность теста 2
6 Описание теста 2
7 Процедура теста 3
8 Данные и отчет о проведении теста 4
Библиография 9

Введение

Настоящий стандарт описывает лабораторный метод тестирования, предназначенный для оценки острой пероральной токсичности пестицидов и других химических веществ в отношении рабочих особей медоносных пчел. Стандарт основан на руководстве Европейско-Средиземноморской Организации по защите растений (EPPO), по оценке побочных эффектов средств защиты растений в отношении медоносных пчел (*Apis mellifera*) [1]. Также были учтены поправки к испытательным протоколам EPPO, принятые Международной комиссией по охране взаимоотношений Растение — Пчела (ICPBR) на 5-ом Международном симпозиуме по опасности пестицидов для пчел, проходившем в Вагенингене (Нидерланды) в 1993 г. [2]. Также учитывались другие существующие руководства [3], [4], [5].

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Пчелы медоносные: тест на острую пероральную токсичность

Test methods for chemicals of environmental hazard. Honeybees: acute oral toxicity test

Дата введения — 2015—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения острой пероральной токсичности химических веществ для медоносных пчел.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применимы термины со следующими определениями:

2.1 **острая пероральная токсичность** (acute oral toxicity): Неблагоприятные последствия, происходящие под действием однократно потребленной в пищу дозы тестируемого вещества на протяжении периода максимум 96 часов.

2.2 **доза** (dose): Потребленное количество тестируемого вещества. Дозу выражают в единицах массы (мкг) тестируемого вещества на одно испытуемое животное (мкг/пчела).

Примечание — Поскольку реальная доза, приходящаяся на каждую пчелу, не может быть рассчитана, так как их кормление проводится в группе, то рассчитывают среднюю дозу (общее потребленное количество вещества/число пчел в одной клетке).

2.3 **LD_{50} пероральная** (медианное значение летальной дозы) ((median lethal dose) oral): статистически определенная однократная доза вещества, вызывающая смерть 50 % подопытных животных при применении его в качестве пищи (пероральным способом).

2.4 **смертность** (mortality): Насекомое считается умершим, когда оно полностью неподвижно.

3 Исходные положения

3.1 При определении и оценке токсичности химических веществ может требоваться определение их острой пероральной токсичности для пчел, если вероятно воздействие на них применяемого химического вещества. Оценка острой пероральной токсичности проводится для выявления специфической токсичности пестицидов и других веществ для пчел. Результаты тестирования должны использоваться при определении необходимости дальнейших исследований. В частности, этот метод может быть использован в пошаговой схеме оценки риска применения пестицидов для пчел, основанной на последовательности проведения лабораторных опытов, затем — полуполевых и полевых испытаний [6]. Пестициды могут тестироваться в виде действующего вещества (д. в.) или торгового продукта.

3.2 Вещество сравнения с известной токсичностью (токсичный стандарт) должно использоваться для проверки чувствительности пчел и точности проводимой процедуры тестирования.

3.3 Определения используемых терминов даны в разделе 2.

Издание официальное

4 Принцип теста

Взрослых рабочих особей медоносных пчел подвергают воздействию серии доз тестируемого вещества в растворе сахарозы. Затем пчелам предлагают аналогичное питание без тестируемого вещества. Смертность регистрируют ежедневно на протяжении, по меньшей мере, 48 ч, и сравнивают с контролем. Если смертность пчел в опытной группе увеличивается в промежутке между 24 и 48 ч, а в контрольной группе остается на принятом постоянном уровне, например, не более ≤ 10 %, целесообразно увеличить продолжительность теста до 96 ч (максимально). Результаты используют для расчета величин LD_{50} через 24 и 48 ч, а если опыт был более продолжительным, также и через 72 и 96 ч.

5 Достоверность теста

Тест считается достоверным, если выполняются следующие условия:

- средняя смертность пчел в контрольных группах не должна превышать 10 % к концу опыта;
- величина LD_{50} вещества сравнения должна соответствовать установленному диапазону значений.

6 Описание теста

6.1 Отбор пчел

Должны использоваться молодые зрелые рабочие особи одной расы, т. е. пчелы одинакового возраста, образа питания и пр. Следует использовать особей из правильно питающихся и здоровых колоний, насколько возможно, без признаков заболевания и с нормальным состоянием пчелиной матки, с известными историей и физиологическим статусом. Их можно собирать утром в день использования для опытов или вечером накануне проведения теста и содержать в тестовых условиях на следующий день. Пчелы из ульев без расплода также пригодны. Сбор пчел ранней весной или поздней осенью нежелателен, так как в это время меняется их физиологический статус. Если испытания проводят ранней весной или поздней осенью, пчелы могут быть извлечены из инкубатора и подвергнуты кормлению пчелиным хлебом (пергой) и раствором сахарозы в течение 1 недели. Пчелы, обработанные химическими веществами, такими как антибиотики, противопаразитарные средства и т. п., не должны использоваться в тестах на токсичность в течение 4 недель со дня окончания последней обработки.

6.2 Клетки для испытаний

Клетки должны быть легко очищаемыми, хорошо вентилируемыми и могут быть изготовлены из любых материалов, например, нержавеющей стали, проволочной сетки, пластика, дерева и т. п. Предпочтительная численность группы: 10 пчел на клетку. Размер клеток должен соответствовать числу пчел, т. е. обеспечивать соответствующее пространство.

6.3 Уход и кормление

Процедуры по уходу, включая обработки и наблюдения, должны осуществляться в течение светового дня. Для кормления используют раствор сахарозы в воде с концентрацией 500 г/л (50 % вес/объем). После того как дана тестовая доза, пища должна предоставляться неограниченно (*ad libitum*). Система кормления должна позволять регистрировать потребление пищи в каждой клетке (см. 7.3). Для этого можно использовать стеклянную трубочку (50 мм длиной, 10 мм шириной с открытым концом, сужающимся до 2 мм в диаметре).

6.4 Подготовка пчел

Собранные пчелы случайным образом распределяют в садках для испытаний, которые в случайном порядке расставлены в комнате для испытаний. Можно создать условия голодания пчел в течение 2 ч до проведения теста. Желательно, чтобы пчелы были отлучены от пищи до обработки, чтобы содержимое кишечника всех пчел было одинаковым на момент начала теста. Умирающие пчелы непригодны к использованию и должны быть заменены на здоровых до начала опыта.

6.5 Подготовка доз

6.5.1 Растворимые тестируемые вещества могут быть непосредственно внесены в 50 %-ный раствор сахарозы. Для веществ и продукции с низкой растворимостью в воде можно использовать дополнительные растворители (органические, эмульсификаторы, диспергирующие добавки), слаботоксичные

для пчел (ацетон, диметилформамид, диметилсульфоксид). Их концентрация зависит от растворимости данного испытуемого вещества и должна быть одной и той же для всех исследуемых доз тестируемого вещества. Обычно достаточна 1 %-ная концентрация растворителя и ее не следует превышать.

6.5.2 Соответствующим образом должны быть приготовлены и контрольные растворы: то есть, если для растворения испытуемого вещества использовался растворитель или диспергатор, то контроль должен быть представлен в 2 вариантах: раствор в воде и раствор сахарозы с растворителем (диспергатором) в концентрациях, используемых для приготовления доз тестируемого вещества.

7 Процедура теста

7.1 Тестируемая и контрольная группы

7.1.1 Количество доз и повторностей должны удовлетворять статистическим требованиям для определений LD_{50} с 95 %-ным доверительным интервалом. Обычно для теста требуются 5 концентраций, представляющих геометрическую прогрессию с множителем, не превышающим 2,2 и охватывающим возможный диапазон LD_{50}. Однако разбавление и количество используемых концентраций зависят от наклона кривой токсичности (доза — смертность) и требований статистического метода, выбранного для оценки результатов теста. Предварительный тест позволяет выбрать соответствующие концентрации для последующих дозировок.

7.1.2 Для тестирования действия каждой выбранной дозировки требуется не менее 3 испытуемых групп пчел по 10 особей в каждой.

7.1.3 Кроме групп с тестируемым веществом необходимы, как минимум, три контрольные группы, каждая по 10 пчел. В контрольные группы должно быть включено и тестирование действия используемых дополнительных растворителей (см. 6.5.2).

7.2 Токсичное вещество сравнения

Токсичное вещество сравнения должно быть включено в серии испытаний. Для перекрытия ожидаемого диапазона LD_{50} следует использовать не менее 3 доз вещества сравнения, а для каждой дозы выборка должна состоять, как минимум, из 3 клеток (повторностей) с 10 пчелами. Предпочтительнее использовать диметоат, для которого известна острая пероральная токсичность: LD_{50} (24 часа) = 0,10—0,35 мкг/пчелу [7]. Однако могут использоваться и другие токсичные для пчел вещества, если для них имеется достаточно проверенных данных (например, паратион).

7.3 Распределение доз

Каждая тестовая группа должна получить 100—200 мкл 50 %-ного раствора сахарозы в воде, содержащего испытуемое вещество в данной концентрации. Больший объем требуется для веществ с низкой растворимостью, низкой токсичностью или с малой концентрацией в продукции, так как потребуются большие доли раствора сахарозы. Количество обработанного продукта, потребляемого на группу пчел, необходимо контролировать. После его потребления (обычно 3—4 ч) кормушка должна быть удалена из клетки и заменена на другую кормушку — с раствором, содержащим только сахарозу. Этот корм должен быть предоставлен в неограниченном количестве (*ad libitum*). Для некоторых веществ при их высоких концентрациях может наблюдаться отказ от приема, в результате чего пчелы получают его в меньшем количестве или не съедают совсем. По истечении максимум 6 ч не съеденное количество обработанной пищи должно быть убрано и заменено на чистый раствор сахарозы, а потребленное количество — зафиксировано (измерены объем/вес несъеденного).

7.4 Условия теста

Пчелы должны содержаться в темноте в экспериментальной комнате при температуре (25 ± 2) °С. Относительную влажность необходимо поддерживать около 50 %—70 % и регистрировать на протяжении всего теста.

7.5 Продолжительность теста

Продолжительность опыта — 48 ч после того момента, когда испытуемое вещество было заменено на чистый раствор сахарозы. Если смертность продолжает увеличиваться более чем на 10 % после окончания первых 24 ч, опыт нужно продлить максимально до 96 ч при условии, что смертность на контроле менее 10 %.

7.6 Наблюдения

7.6.1 Смертность учитывают спустя 4 ч после начала теста и далее через 24 и 48 ч. Если опыт продолжают дольше, то дополнительные учеты проводят с 24-часовым интервалом до 96 ч максимум, при условии что смертность в контрольной группе не превышает 10 %.

7.6.2 Количество пищи, потребленное группой, должно быть рассчитано. Сравнение скоростей потребления обработанной и необработанной пищи в течение 6 ч может дать информацию о вкусовой привлекательности обработанной пищи.

7.6.3 Все аномальные поведенческие проявления пчел в ходе опыта должны регистрироваться.

7.7 Пороговый тест

В некоторых случаях (например, если ожидаемая токсичность вещества низкая) может потребоваться пороговый тест с использованием 100 мкг д.в./пчелу для того, чтобы показать, что LD_{50} больше этой концентрации. Его проводят по аналогичной схеме — с использованием 3 повторностей для тестируемой дозы, соответствующих контролей, с оценкой количества потребленной пищи и с использованием токсичного вещества сравнения. При появлении смертности должно быть осуществлено полное исследование. При проявлении сублетальных явлений (см. 7.6.3) они должны быть зарегистрированы.

8 Данные и отчет о проведении теста

8.1 Данные

Данные должны быть представлены в табличном виде для каждой группы, подвергнутой обработке тестируемым веществом, а также для контрольной группы и группы, подвергшейся обработке токсичным веществом сравнения. Должно быть представлено число использованных пчел, смертность на каждый момент времени наблюдения, число пчел с отклонениями в поведении. Анализ смертности должен быть проведен статистическими методами (например, пробит-анализ, метод скользящего среднего, биномиальная вероятность) [8, 9]. Для каждого времени наблюдения (например, 24 и 48 ч, если необходимо 72 и 96 ч) должен быть представлен график доза — отклик, рассчитан наклон кривых и медианное значение летальной дозы (LD_{50}) с 95 %-ным доверительным интервалом. Коррекция с учетом смертности на контроле может проводиться по методу Аббота [9, 10]. Если не вся доза была съедена с кормом, то реально принятая группой пчел доза должна быть уточнена и приведена. LD_{50} выражают в микрограммах тестируемого вещества на пчелу.

8.2 Отчет о проведении теста

Отчет должен включать следующую информацию.

Тестируемое вещество:

- физическая природа и соответствующие физико-химические свойства (например, стойкость в воде, давление паров);
- химическая характеристика, включая структурную формулу и чистоту (например, для пестицидов — наименование и концентрацию действующего вещества (веществ)).

Тестовые виды:

- научное название, раса (вид), примерный возраст (в неделях), метод сбора, время сбора;
- информация о колонии, используемой для отбора пчел, включая состояние здоровья, заболевания, какие-либо обработки и пр.

Условия опыта:

- температура и относительная влажность в помещении для испытаний;
- условия размещения пчел, включая тип, размер и материал клеток;
- методика приготовления концентрированного и тестовых растворов (если использовался растворитель, он должен быть указан, как и его концентрация);
- схема опыта, например, количество и величины испытанных концентраций вещества, количество контролей: для каждой тестируемой концентрации и контроля числа повторностей (клеток), число пчел в клетке;
- дата тестирования.

Результаты:

- результат предварительных исследований, если они проводились;
- исходные данные: смертность при каждой дозе и для каждого времени наблюдений;

- график зависимости доза — отклик по окончании опыта;
- LD_{50} с 95 %-ным доверительным интервалом для каждого времени наблюдений для тестируемого вещества и токсичного вещества сравнения;
- статистическая процедура, использованная для определения LD_{50};
- смертность на контроле;
- другие биологические проявления, наблюдаемые или измеренные, например, аномальное поведение пчел (включая отказ от пищи с тестируемым веществом), скорость потребления пищи с дозой и без нее в соответствующих группах;
- любые отклонения от руководства по проведению испытаний и любая другая имеющая отношение к опыту информация.

Библиография

[1] EPPO (1992). Guideline on Test Methods for Evaluation the Side-Effects of Plant Protection Products on Honeybees (No. 170)./Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 22, 203—215.

[2] Harrison E.G. (1993). Proceedings of the Fifth International Symposium on the Hazards of Pesticides to Bees, October 26—28, 1993, Plant Protection Service, Wageningen, The Netherlands. Report IUBBS, 14pp + Appendices 180 pp.

[3] SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Edited by Dr. Mark R. Lynch. Published by SETAC-Europe, Belgium. March 1995.

[4] Stute K. (1991). Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Honigbiene. Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren, Teil VI, 23—1, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Braunschweig, Germany.

[5] US EPA (1995). Honey Bee Acute Contact Toxicity Test (OPPTS 850.3020). Ecological Effects Test Guidelines. EPA 712-C-95-147, Washington DC, United States of America.

[6] EPPO/Council of Europe. (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. / EPPO bulletin, vol. 23, No.1, 151—165. March 1993.

[7] Gough H.J, McIndoe E.C, Lewis G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981—1992./Journal of Apicultural Research, 22, 119—125.

[8] Litchfield J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. // Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99—113.

[9] Finney D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed. — Cambridge, London and New York.

[10] Abbott W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide.//Jour. Econ. Entomol., 18, 265—267.

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50 Т58 IDT

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, оценка острой пероральной токсичности, медоносные пчелы

Редактор *В.В. Космин*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 22.01.2015. Подписано в печать 29.01.2015. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,26. Тираж 34 экз. Зак. 642.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

ЯЕЗ3038-2014