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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33639— 2015

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Испытание по оценке эмбриональной токсичности на навозных двукрылых мухах

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт стандартизации материалов и технологий» (ФГУП «ВНИИ СМТ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 октября 2015 г. № 81-П)

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 ноября 2015 г. № 1781-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33639—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 сентября 2016 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD, Test No. 228:2008 «Испытание по оценке эмбриональной токсичности на навозных двукрылых мухах [*Scathophaga stercoraria* L. (Scathophagidae), *Musca autumnalis* De Geer (Muscidae)]» («Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies [Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae), Musca autumnalis De Geer (Muscidae)]», MOD) путем изменения структуры.

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного документа приведено в приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Май 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

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 Принцип метода . . . 1
4 Информация об испытуемом веществе . . . 2
5 Стандартные вещества . . . 2
6 Достоверность испытания . . . 2
7 Описание метода . . . 2
7.1 Оборудование . . . 2
7.2 Выбор и сбор навоза . . . 3
7.3 Выбор и подготовка животных . . . 3
7.4 Условия испытания . . . 3
8 Проведение испытания . . . 4
8.1 Подготовка навоза . . . 4
8.2 Применение испытуемых веществ . . . 4
8.3 Подготовка испытуемых сосудов и внесение организмов . . . 4
8.4 Наблюдения . . . 5
8.5 Дизайн испытания . . . 5
9 Статистическая оценка . . . 5
10 Отчет о проведении испытания . . . 6
Приложение А (рекомендуемое) Определение pH навоза . . . 7
Приложение Б (рекомендуемое) Культивирование навозных мух . . . 8
Приложение В (рекомендуемое) Испытание навоза крупного рогатого скота, обработанного ветеринарными препаратами . . . 10
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа . . . 11
Библиография . . . 13

Введение

Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae) и *Musca autumnalis* De Geer (Muscidae) являются подходящими индикаторными видами для оценки воздействия противопаразитарных средств на эмбриональную токсичность на навозных двукрылых мухах по следующим основным причинам: в совокупности виды охватывают широкий географический диапазон. *S. stercoraria* и *M. autumnalis* широко распространены в Европе, Азии и Северной Америке [1]—[6]. При включении разных видов мух расширяется область применения настоящего стандарта: например, испытания могут быть проведены на австралийском виде *M. vetustissima* аналогично *M. autumnalis*, в то время как *S. stercoraria* в Австралии не обитает. Несмотря на некоторые наложения два вида различаются по температуре обитания: для *S. stercoraria* не подходит температура более 25 °С, в то время как для обнаруженной в Ирландии и на больших высотах Альп *M. autumnalis* характерны противоположные предпочтения.

Оба вида заселяют навоз, имеют много поколений в своем развитии, не проходят облигатной диапаузы, легко культивируются и имеют короткий цикл развития, позволяющий оценить влияние на развитие и выживаемость в лабораторных условиях. Общие сведения по экологии видов навозных мух и их использованию в экотоксикологических испытаниях приведены в [7]—[13].

За счет экологической роли взрослых особей предлагаемых тестовых видов (хищные и сапрофаговые мухи из различных семейств; личинки обоих видов являются сапрофагами) обеспечена релевантность результатов испытания для защиты навозной фауны и ее функций. Кроме того, известно, что эти мухи являются очень чувствительными индикаторами химического загрязнения навоза, особенно препаратами против экто- и эндопаразитов [13]. Первые результаты кольцевого метода указывают, что ивермектин является более токсичным для *M. autumnalis* по сравнению с *S. stercoraria* [14], но еще невозможно решить, существует ли общее различие в чувствительности. Однако мухи не являются представителями всего сообщества в навозе. Например, за счет их более крупного размера и различных пищевых привычек навозные жуки живут в другой экологической нише по сравнению с навозными мухами.

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

Испытание по оценке эмбриональной токсичности на навозных двукрылых мухах

Testing of chemicals of environmental hazard. The developmental toxicity test to dipteran dung flies

Дата введения — 2016—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод оценки влияния испытуемого химического вещества на развитие стадий навозных двукрылых мух, заселяющих навоз. В настоящем стандарте насекомые подвергаются воздействию в контролируемых условиях [15] обогащенного химическим веществом навоза. Расширенное испытание, в котором мухи подвергаются воздействию навоза скота, обработанного испытуемым веществом, описано в приложении С.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями:

2.1 **NOEC** [неэффективная наблюдаемая концентрация NOEC (No Observed Effect Concentration)]: Наиболее высокая концентрация испытуемого вещества, при которой не наблюдается эффект; в настоящем стандарте концентрация, соответствующая NOEC, не обладает статистически значимым эффектом ($p < 0,05$) в течение определенного периода воздействия по сравнению с контролем.

2.2 **EC_x** [эффективная концентрация для x%-ного эффекта ECx (Effect concentration for x % effect)]: Концентрация, которая вызывает x%-ный эффект на тестовые организмы в данном периоде воздействия по сравнению с контролем (например, EC_{50} является концентрацией, вызывающей 50%-ный эффект на испытуемую конечную точку в подвергшейся воздействию популяции в определенном периоде воздействия); в настоящем стандарте эффективные концентрации выражены в виде массы испытуемого вещества на сухую массу испытуемого навоза.

3 Принцип метода

Данное испытание предназначено для оценки эмбриональной токсичности испытуемого химического вещества на стадии развития навозных двукрылых мух, заселяющих навоз. Возможное влияние испытуемого вещества, внесенного в навоз, на созревание мух во взрослые особи сравнивают с отрицательным(и) контролем(ями) (расширенное испытание с использованием навоза от обработанного препаратами скота в качестве испытуемого субстрата описано в приложении С). Периодически испытывают положительный контроль (см. 5). Испытуемое химическое вещество смешивают с навозом крупного рогатого скота, в который вносятся яйца (*S. stercoraria*) или личинки (*M. autumnalis*). Затем оценивают влияние испытуемого вещества на следующие конечные точки в контролируемых условиях после воздействия испытуемого вещества на яйца/личинки (всегда в сравнении с контролем):

- вылупление, т. е. пол и общее число вылупившихся взрослых мух;
- замедление вылупления по скорости развития, т. е. количеству вылупившихся мух в сутки после внесения в навоз;

Издание официальное

- морфологические изменения, т. е. визуальные морфологические аномалии, включая размер тела, отсутствие нормального вылупления и т. д.

В зависимости от дизайна испытания определяют неэффективную наблюдаемую концентрацию (NOEC) или EC_x (эффективную концентрацию для x%-ного эффекта, например EC_{50}).

4 Информация об испытуемом веществе

4.1 Для дизайна испытания предпочтительно иметь сведения о растворимости в воде, log K_{ow}, давлении пара испытуемого вещества. Необходима дополнительная информация о поведении испытуемого вещества в навозе, например скорости деградации. Также требуются подробные данные об источнике, партии или номере партии, чистоте испытуемого и стандартного веществ.

4.2 Настоящий стандарт можно использовать для растворимых или слаборастворимых в воде веществ. Однако соответственно различаются способы внесения испытуемого вещества. Настоящий стандарт не применим для летучих веществ, т. е. веществ, для которых константа Генри или коэффициент распределения в воздухе/воде выше 1, или веществ, для которых давление пара превышает 0,0133 Па при температуре 25 °С.

5 Стандартные вещества

Ивермектин (технический) является подходящим стандартным веществом, которое, как показано, влияет на вылупляемость мух [8]—[10], [14]. Стандартное вещество испытывают периодически, но возможны два варианта:

- EC_x стандартного вещества определяют один-два раза в год для обеспечения гарантии того, что лабораторные условия испытания являются адекватными, и для подтверждения того, что отклик тестовых организмов не изменяется существенно в течение времени. Значение EC_{50} для конечной точки вылупления должно находиться в диапазоне от 50 до 150 мкг действующего вещества на килограмм сухой массы навоза (*S. stercoraria*) и от 20 до 60 мкг действующего вещества на килограмм сухой массы навоза (*M. autumnalis*) соответственно;
- однако более целесообразно испытывать стандартное вещество параллельно определению токсичности испытуемого вещества. В данном случае используют одну концентрацию, и количество повторностей должно быть таким же, как в контроле на растворитель (восемь). Достоверные эффекты на вылупление взрослых особей наблюдают в концентрации 100 мкг действующего вещества на килограмм сухой массы навоза (*S. stercoraria*) и 40 мкг действующего вещества на килограмм сухой массы навоза (*M. autumnalis*) соответственно.

Испытание стандартного вещества всегда проводят, когда первый раз подвергается испытанию новая партия мух, независимо от ее источника: из существующей культуры или собранной в полевых условиях.

6 Достоверность испытания

Конечное/ограничивающее испытание является достоверным, если после его проведения:

- выведение личинок в контролях более или равно 70 % внесенных яиц (*S. stercoraria*);
- вылупляемость взрослых особей более или равно 70 % выведенных личинок (*S. stercoraria*);
- вылупляемость взрослых особей более или равно 60 % внесенных личинок (*M. autumnalis*);
- вылупляемость взрослых мух начинается через (18 ± 2) сут (*S. stercoraria*) или через (13 ± 2) сут (*M. autumnalis*).

При несоответствии испытания вышеуказанным критериям достоверности его останавливают, если невозможно предоставить обоснование для проведения испытания (например, результаты испытания могут быть использованы для выбора концентраций для нового испытания). Обоснование включают в отчет об испытании.

7 Описание метода

7.1 Оборудование

7.1.1 Испытуемые сосуды должны быть соответствующего размера (например, пластиковые или стеклянные стаканы вместимостью от 250 до 500 мл). Вентиляцию проводят через кусочек хлопчатобумажной ткани или марли, покрывающей верхнюю часть стакана с помощью резинки.

7.1.2 Требуется стандартное лабораторное оборудование, в частности следующее:
- шкаф сушильный;
- стереомикроскоп;
- кисточки для переноса яиц/личинок;
- pH-метр и люксметр;
- весы подходящие точные;
- оборудование, соответствующее для контроля температуры;
- оборудование, соответствующее для контроля влажности (не важно, если стаканы для воздействия накрываются крышками).

7.2 Выбор и сбор навоза

7.2.1 Незагрязненный навоз крупного рогатого скота получают от крупного рогатого скота с описанием проведенных ветеринарных обработок. Крупный рогатый скот не следует обрабатывать лекарственными препаратами минимум за 8 нед или антигельминтиками в форме болюса минимум за 15 мес перед сбором навоза. В навозе должны отсутствовать загрязнители, мешающие проведению испытания.

7.2.2 Навоз отбирают непосредственно от крупного рогатого скота (отбирают из прямой кишки или с подвешенным мешком) или собирают на земле. Если навоз собирают на земле, то следует избегать попадания мочи. Навоз, собранный с земли, должен быть выделен не позднее 2 ч на время сбора для сведения до минимума колонизации навозной фауны, или его замораживают при температуре примерно минус 20 °С не менее чем на 1 нед перед использованием (предпочтительно дольше, например 4 нед) для предупреждения контаминации клещами. Поскольку возможность инвазирования клещами практически отсутствует при отборе навоза из кишечного тракта, то замораживание для элиминации клещей не требуется. Независимо от способа сбора навоза его замораживают, если не используют сразу же. Регистрируют хозяйство, в частности рацион кормления крупного рогатого скота, от которого отбирают навоз. Дополнительно отбирают пробы навоза для определения влажности и pH (см. приложение А).

7.3 Выбор и подготовка животных

Тестовыми видами являются *Scathophaga stercoraria* (см. рисунок 1) и *Musca autumnalis* (см. рисунок 2). Мух получают из стандартной лабораторной культуры (см. приложение Б). Если для получения культуры используют полевую коллекцию взрослых мух, то виды идентифицируют с использованием соответствующего определителя [16]. Колонии, происходящие из организмов, собранных в полевых условиях, культивируют минимум до одного поколения перед началом испытания. Документируют подтверждение вида, источник и историю организмов. В испытании используют свежеотложенные яйца и закрытые личинки (возраст менее 12 ч).



Рисунок 1 — *Scathophaga stercoraria*



Рисунок 2 — *Musca autumnalis*

7.4 Условия испытания

Сосуды для разведения мух в лабораторных условиях и испытуемые сосуды содержат при температуре (20 ± 2) °С для *S. stercoraria* и (26 ± 2) °С для *M. autumnalis*. При испытании на *S. stercoraria*

относительная влажность (RH) должна быть более 60 % в первой фазе испытания для предупреждения высыхания яиц. Поддерживается световой цикл: 16 ч свет и 8 ч темнота; освещение обеспечивается люминесцентными лампами. В начале испытания регистрируется интенсивность света в зоне нахождения испытуемых сосудов примерно на уровне поверхности навоза.

8 Проведение испытания

8.1 Подготовка навоза

8.1.1 Навоз извлекают из морозильной камеры на время полной разморозки перед использованием (только отобранный из прямой кишки навоз используют сразу же, см. 7.2.2). Навоз гомогенизируют примерно в течение 10 мин, например в высокопроизводительном лабораторном смесителе перед подготовкой отдельных групп обработок. Обычно не требуется изменение влажности (опыт показал, что для мух подходит содержание влаги 80 % исходного уровня воды).

8.1.2 В начале испытания определяют содержание влаги и pH пробы навоза от крупного рогатого скота, который не обрабатывали лекарственными препаратами минимум за 8 нед или антигельминтиками в форме болюса минимум за 5 мес перед сбором навоза. Навоз должен быть достаточно влажным для легкого формирования шарика диаметром примерно 7 см, но достаточно сухим для сохранения формы шарика. Определяют содержание азота и углерода (включая соотношение C/N). Регистрируют методы определения этих показателей. Возможные методы определения показателей описаны в приложении А.

8.2 Применение испытуемых веществ

8.2.1 Все испытуемые концентрации выражаются на основе сухой массы для гарантии сравнимости результатов отдельных опытов.

8.2.2 Известное количество навоза помещают в высокопроизводительном лабораторном смесителе. Испытуемое и стандартное вещества вносят в известном количестве воды. Если химические вещества слаборастворимы в воде, то их вносят в известном количестве (в зависимости от растворимости испытуемого вещества подходит 1—10 мл на 120 г сухой массы навоза) органического летучего растворителя (например, ацетона или этанола) и тщательно перемешивают в течение примерно 10 мин. В контрольный навоз вносят известное количество растворителя (только контроль на растворитель) или соответствующее количество только воды (необработанный контроль). После этого навоз и соответствующее добавленное вещество тщательно перемешивают. При использовании растворителя в качестве носителя — его полностью выпаривают в течение не менее 4 ч при комнатной температуре перед внесением тестовых организмов.

8.2.3 Концентрации внесенных веществ подтверждают соответствующими аналитическими методами. Для растворимых веществ подтверждение всех испытуемых концентраций проводят анализом раствора с наиболее высокой концентрацией, использованной для испытания, с документированием последующего разведения и использованием калиброванного оборудования для внесения (например, калиброванной аналитической стеклянной посуды, калиброванного распылительного оборудования для внесения).

8.3 Подготовка испытуемых сосудов и внесение организмов

8.3.1 100 г навоза (сырой массы) вносят в каждый испытуемый сосуд с получением высоты слоя навоза в сосудах 5—8 см. В качестве начальной точки биологического испытания используют яйца (*S. stercoraria*) и личинки (*M. autumnalis*), которые получают описанными видоспецифичными методами культивирования.

8.3.2 Испытания с *S. stercoraria* начинают с яиц, в то время как испытания с *M. autumnalis* с личинок в основном с практической точки зрения. Отложенные яйца/личинки разделяют на отдельные группы соответственно количеству обработок перед внесением. Такая процедура обеспечивает перенос организмов в конкретный тип навоза без перекрестного загрязнения химическими веществами. Распределение яиц/личинок в опытные группы обработок проводят постепенно небольшими партиями для дальнейшей рандомизации распределения личинок. Каждую группу яиц хранят на влажной фильтровальной бумаге в закрытом контейнере до использования в биологическом испытании.

8.3.3 10 яиц *S. stercoraria* и 10 личинок *M. autumnalis* помещают на поверхность навоза в каждом испытуемом сосуде. Если используются яйца, то их помещают на кусочек влажной фильтровальной бумаги на поверхность навоза для оценки вылупления яиц (критерия достоверности). Сразу же после вылупления личинки *S. stercoraria* покидают кусочек фильтровальной бумаги, подвергаясь таким образом воздействию навозом.

8.3.4 После внесения личинок *M. autumnalis*, когда личинки больше не видны на поверхности, навоз покрывают сухим вермикулитом на высоту примерно 3 см. Вермикулит обеспечивает подходящий субстрат для окукливания. Для испытаний с *S. stercoraria* добавление вермикулита не требуется.

8.4 Наблюдения

Если в качестве начальной точки в биологическом испытании используют яйца (т. е. в испытании с *S. stercoraria*), то количество вылупившихся яиц оценивают через 48 ч после внесения яиц. Во время периода вылупления взрослых особей ежедневно регистрируют пол и количество вылупившихся взрослых особей и последующую выживаемость. Если пол только что вылупившихся мух определить невозможно, то мух оставляют на 2—3 ч перед повторной идентификацией пола. Регистрируют все визуальные морфологические аномалии (включая размер тела, отсутствие вылупления и т. п.). Вылупившихся мух (включая мертвых) удаляют ежедневно. В испытаниях с *S. stercoraria* вылупление взрослых особей начинается примерно через 18 сут после начала испытания. В испытаниях с *M. autumnalis* вылупление взрослых особей начинается примерно через 13 сут после начала испытания. Испытание заканчивают через 5 сут после вылупления последней взрослой особи в контроле.

8.5 Дизайн испытания

8.5.1 Испытание по определению диапазона концентраций: если токсичность испытуемого вещества неизвестна, то используют пять номинальных испытуемых концентраций, составляющих 0,1; 1,0; 10; 100 и 1000 мг/кг (сухой массы навоза) плюс необработанный контроль и контроль на растворитель (если растворителем является не вода). Если имеется информация о токсичности, то с ее учетом испытуемые концентрации можно адаптировать (см. 8.5.3). Все испытуемые концентрации выражаются на основе сухой массы.

8.5.2 Ограничивающее или конечное испытание: если результаты испытания по определению диапазона концентраций указывают, что неэффективная наблюдаемая концентрация (NOEC) химического вещества выше, чем испытанные концентрации (например, 1000 мг/кг навоза по сухой массе), то проводят определение диапазона предельных концентраций в соответствующей концентрации (обычно 1000 мг/кг сухой массы навоза) вместо конечного испытания. Ограничивающее испытание проводится с восьмью сосудами с испытуемым химическим веществом и восьмью сосудами без обработки. Стандартное вещество и контроль на растворитель (если растворителем является не вода) также включаются в испытание (в каждом случае восемь повторностей). Такой дизайн выбран согласно руководству OECD № 54 [24].

8.5.3 Если эффекты испытуемого вещества находятся в пределах, установленных в испытании по определению диапазонов (с поправкой на гибель в контроле с использованием формулы Аббота (1925) [25]), то проводится конечное испытание. Конечное испытание проводят с определением NOEC или ECx:

- для определения NOEC испытывают не менее пяти концентраций в геометрической прогрессии. Используют четыре повторности для каждой испытуемой концентрации в обработке плюс восемь контрольных проб. Интервалы между концентрациями различаются не более чем в 1,8 раза;
- для определения EC_x (например, EC_{10}, EC_{50}) испытывают 12 концентраций. Используют не менее двух повторностей для каждой испытуемой концентрации и шесть повторностей в контроле. Интервалы между концентрациями различаются не менее двух в диапазоне предполагаемых эффектов при низких концентрациях и более двух при более высоких и более низких концентрациях.

Помимо необработанного контроля и контроля на растворитель (если растворителем является не вода) испытывают стандартное вещество (не всегда, см. 5.1).

8.5.4 Позиционное отклонение устраняется с использованием рандомизированного «полного» блочного плана для всех проведенных испытаний (испытание по определению диапазона, ограничивающее испытание или конечное испытание).

9 Статистическая оценка

9.1 В настоящем стандарте не даются определенные указания по статистическому анализу результатов испытания. Однако, основываясь на недавних рекомендациях в других руководствах OECD (в основном на руководстве по статистике [24]), а также других опубликованных руководствах [26], в частности [27], можно сделать некоторые предложения. Настоящий стандарт нацелен прежде всего на определение EC_x. Согласно недавним руководствам Международного сотрудничества по гармонизации

технических требований для регистрации ветеринарных средств [28] требуется определение EC_{50} для многих контролирующих организаций (например, в Европейском Союзе), в основном с учетом статистических и экологических требований. Однако по причине гибкости руководящих указаний также приводится определение NOEC по [26], [27].

9.2 Количество вылупившихся взрослых особей каждого пола вносится в таблицу по каждой концентрации испытуемого химического вещества. Кроме того, в табличной форме представляются результаты других наблюдений. В качестве конечных точек используются количество вылупившихся взрослых мух, скорость развития на обработку и морфологические изменения, всегда по сравнению с контролем. Скорость развития определяют с использованием методов, описанных в [27].

10 Отчет о проведении испытания

После окончания испытания готовят заключительный отчет. Отчет должен содержать информацию (но не ограничиваясь этим), приведенную в 10.1—10.5.

10.1 Испытуемое вещество:

- испытуемое вещество (название, общее название, химическое название, номер партии, чистота и т. п.);
- стандартное химическое вещество (название, общее название, номер партии, чистота и т. п.);
- свойства испытуемого вещества (например, log K_{ow}, растворимость в воде, давление пара и информация о трансформации и поведении) по возможности.

10.2 Тестовые организмы:

- использованные тестовые организмы (подтверждение вида, источник организмов, условия культивирования);
- обращение с организмами;
- возраст организмов при внесении в испытуемые сосуды.

10.3 Условия испытания:

- источник навоза и недавние ветеринарные обработки использованного поголовья скота;
- pH и содержание влаги в навозе;
- высота слоя навоза в испытуемых сосудах;
- высота слоя вермикулита в испытуемых сосудах (только для *M. autumnalis*);
- испытуемые сосуды (материал, объем и размеры);
- испытуемые концентрации и количество повторностей;
- описание подготовки растворов испытуемого и стандартного веществ для внесения;
- условия окружающей среды (температура, световой цикл и интенсивность, влажность).

10.4 Результаты испытания:

- число вылупившихся мух (самцов и самок) на сосуд в сутки;
- процент вылупления на повторность и обработку [объединенное число мух (самцов и самок)];
- морфологические аномалии (например, размер тела) на повторность;
- скорость развития на повторность;
- скорость вылупления (в испытаниях с яйцами) на повторность;
- результаты испытаний со стандартным веществом;
- результаты, представленные в табличной и/или графической форме;
- значения токсичных конечных точек (например, EC_x, NOEC) и статистические методы, использованные для их определения.

10.5 Оценка результатов испытания:

- соответствие критериям достоверности;
- анализ/обсуждение полученных результатов;
- сделанные выводы.

Приложение А
(рекомендуемое)

Определение pH навоза

Следующий метод определения pH в пробах навоза основан на описании, приведенном в [18]. Определенное количество навоза высушивают при комнатной температуре в течение не менее 2 ч. Затем готовят суспензию навоза (содержащую не менее 5 г навоза) в объеме, превышающем в пять раз объем навоза или в 1,0 М растворе хлорида калия ч. д. а. (KCl) или 0,01 М растворе хлорида кальция ч. д. а. ($CaCl_2$). Затем суспензию тщательно встряхивают в течение 5 мин и оставляют для осаждения не менее чем на 2 ч, но не более чем на 24 ч. Затем определяют pH жидкой фазы с использованием pH-метра, который калибруют перед каждым измерением с помощью соответствующего ряда буферных растворов (например, pH 4,0 и 7,0).

Содержание влаги можно определить взвешиванием навоза (примерно 20 г) в сосудах в трех повторностях и высушиванием в течение ночи в печи примерно при температуре 105 °С [17]. Затем пробы извлекают, охлаждают при комнатной температуре в эксикаторе и взвешивают повторно, рассчитывают содержание влаги и выражают в пересчете на абсолютно сухую навеску. pH навоза можно определить добавлением взвешенного количества навоза к 1,0 М раствору хлорида калия или 0,01 М раствору хлорида кальция в сосуде и измерением на откалиброванном pH-метре [18]. Соотношение между навозом и водной фазой составляет 1:5.

Содержание азота определяют с использованием метода Тилмана и Ведина [19] или микрометодом Кьельдаля, как описано Гессе в [20]. Предпочтительные методы приведены в [21]—[23]. Следовательно, содержание углерода в навозе определяют по [31].

Приложение Б
(рекомендуемое)

Культивирование навозных мух

Метод культивирования в лабораторных условиях *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae)

В настоящем стандарте описывается метод, использованный для культивирования *M. autumnalis* в исследовании Inveresk.

1 Условия содержания и окружающей среды

Культуры помещают в пластиковые камеры (каждый размерами примерно 50 × 50 × 50 см) с расположенным снаружи нагревательным устройством.

Условиями окружающей среды являются температура (30 ± 2) °С и относительная влажность более 60 %. Все периоды развития, приведенные в данном методе, основаны на культивировании при данной температуре и подлежат повторной оценке при использовании режима с более низкой температурой.

Световой цикл составляет: 16 ч — свет, 8 ч — темнота. В дополнение к люминесцентному освещению используют источник освещения лампами накаливания (такой как вольфрамовая нить накала) для получения зоны, в которой мухи могут греться.

2 Кормление

Вода подается неограниченно в каждую камеру переворачиванием наполненного водой стакана на поднос, покрытый фильтровальной бумагой.

Сухой яичный порошок, сухое молоко и сахароза (соотношение 1:1:1) даются неограниченно.

Дается вата, пропитанная раствором меда (25%-ный раствор меда, масса растворенного вещества/объем раствора), и пропитывается повторно примерно два раза в неделю.

Свежая свиная печень дается раз в неделю в качестве дополнительного источника белка для мух-самок (она предназначается преимущественно для самок, питающихся богатым белками секретом скота). Полоски печени подвешиваются на крючки на стенках камеры.

3 Кладка яиц

Навоз отбирают от крупного рогатого скота с описанием проведенных ветеринарных обработок. Крупный рогатый скот не подвергается обработкам лекарственными препаратами минимум за 8 нед или антигельминтиками в виде болюса минимум за 5 мес до отбора навоза. Навоз замораживают примерно при температуре минус 20 °С после отбора и хранят при этой температуре до применения. Навоз размораживают при комнатной температуре примерно в течение 24 ч перед внесением в культуру.

В несинхронизированную культуру навоз крупного рогатого скота вносится еженедельно. В синхронизированную культуру навоз крупного рогатого скота вносится, когда взрослые мухи находятся между 7—10 сут; 3—4 сут после первого наблюдения копуляции.

Размороженный навоз гомогенизируют с использованием лабораторного гомогенизатора в течение примерно 10 мин до добавления в культуру. Навоз должен быть достаточно влажным для легкого формирования шарика диаметром примерно 7 см, но достаточно сухим для сохранения формы шарика. Данный шарик бросают на пластиковый поднос с получением искусственной лепешки. Затем лепешку помещают в культуру.

Каждую партию навоза с яйцами переносят примерно в 1 кг навоза крупного рогатого скота в пластиковое ведро. Если плотность яиц является очень высокой, то яйца разделяют для обеспечения не более чем примерно 500 яиц на 1 кг каждой партии.

Через 48 ч после кладки яиц наносят слой опилок высотой примерно 3 см на поверхность навоза и ведро покрывают мелкой сеткой или марлей (подходит пеленка). Личинки будут мигрировать на поверхность навоза и в опилки для окукливания.

4 Цикл развития и сроки развития

Яйца откладываются по отдельности и в группах. Яйца преимущественно откладываются на поверхности навоза, и виден только концевой дыхательный усик. Группы яиц удаляют из навоза и осторожно препарируют с помощью иглы для использования в опыте.

Вылупление яиц происходит примерно через 24—36 ч. Если требуются личинки, то их извлекают из навоза примерно через 48 ч после кладки яиц.

Имеются три стадии развития личинок, личинки третьего возраста представляют собой личинки цилиндрической формы желтовато-белого цвета, которые сужаются к передней части, и их длина составляет примерно 12 мм. Обычно личинки начинают двигаться примерно на четвертые сутки после вылупления яиц, мигрируя на поверхность навоза и в слой опилок для окукливания.

Куколки можно удалить из опилок на шестые сутки после кладки яиц и поместить в культуру или дать им возможность выйти из навоза естественным путем. Куколки — белого/серого цвета длиной примерно 5—7 мм.

Вылупление взрослых особей происходит через 4—5 сут после образования куколок. Следовательно, развитие яиц во взрослые особи происходит в течение 10—11 сут при температуре 30 °С. При температуре 25 °С развитие происходит в течение 17 сут.

Взрослые особи имеют длину 7—8 мм. Самок легко отличить от самцов по близости глаз, глаза у самцов почти соприкасаются друг с другом, в то время как у самок они находятся на расстоянии.

Источник *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae)

Prof. Roger D. Moon
University of Minnesota, Department of Entomology
219 Hodson Hall
1980 Folwell Ave
Saint Paul, MN
United States
Tel: 001 612 624 3636
Fax: 001 612 625 5299
e-mail: gost.e-ecolog.ru

Метод культивирования в лабораторных условиях *Scathophaga stercoraria* L. (Diptera: Scathophagidae)

В настоящем стандарте приведено описание метода, использованного для культивирования *S. stercoraria*, разработанного в университете Цюриха (проф. д-р W. Blanckenhorn), частично дополненного литературными данными, например [29].

1 Условия содержания и окружающей среды

Культуры содержатся в сетчатых камерах (например, 0,09 м^2), содержащих источник воды, слой меда и чашку с промышленно доступной пыльцой. Такой размер подходит для 25 пар *S. stercoraria*.

Условиями окружающей среды являются температура (20 ± 2) °С и относительная влажность (60 ± 5) %. Все периоды развития, приведенные в данном методе, основаны на культивировании при данной температуре и подлежат повторной оценке при использовании режима с более низкой температурой. Световой цикл составляет: 16 ч — свет, 8 ч — темнота.

2 Кормление

Воду подают неограниченно в каждую камеру переворачиванием наполненного водой стакана на поднос, покрытый фильтровальной бумагой.

Чашки с 7 г куколок *Musca domestica* на камеру (из другой лабораторной культуры) добавляют дважды в неделю для обеспечения достаточного количества кормового объекта.

3 Кладка яиц

Навоз отбирают от крупного рогатого скота с описанием проведенных ветеринарных обработок. Крупный рогатый скот не подвергают обработкам лекарственными препаратами минимум за 8 нед или антигельминтиками в виде болюса минимум за 5 мес до отбора навоза. Навоз замораживают примерно при температуре минус 20 °С после отбора и хранят при этой температуре до применения. Навоз размораживают при комнатной температуре примерно в течение 24 ч перед внесением в культуру. Размороженный навоз гомогенизируют с использованием лабораторного смесителя в течение примерно 10 мин перед внесением в культуру.

После того как мухи (*S. stercoraria*) достигнут возраста 13 сут, вносят чашки Петри диаметром 15 см, содержащие свежий коровий навоз с добавлением кормового объекта.

Среду для кладки яиц удаляют через 24 ч и вносят еще 1500—2000 г коровьего навоза, помещенного на песок в открытом пластиковом контейнере.

Окукливание завершается на десятые сутки, в течение которых куколки извлекают флотацией из песка.

Источник *Scathophaga stercoraria* L. (Scathophagidae)

Prof. Wolf Blanckenhorn
Zoologisches Museum; Universität Zürich-Irchel; 34 (Gebäude)-J (Stock) 40 (Büro)
Winterthurerstrasse, 190
CH-8057 Zürich
Tel: +41 (0) 44 635 47 55
Fax: +41 (0) 44 635 47 80
e-mail: gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

Приложение В
(рекомендуемое)

Испытание навоза крупного рогатого скота, обработанного ветеринарными препаратами

В отличие от использования навоза, обогащенного испытуемым веществом, два вида мух также подвергают воздействию навоза, отобранного от поголовья скота (обычно крупного рогатого скота), обработанного испытуемым веществом. Дизайн этого испытания более соответствует реальным условиям, поскольку он включает в себя весь метаболизм, имеющий место при прохождении препарата через организм обработанного животного. Кроме того, условия воздействия отражают реальное присутствие испытуемого вещества в навозе, которое может отличаться от полученного после обогащения и гомогенизации. В связи с этим такие широкие лабораторные испытания могут потребоваться на более высоких уровнях при оценке потенциального риска ветеринарных лекарственных средств для организмов, обитающих в навозе. Однако необходимо учитывать, что даже если содержание поголовья скота (например, корм) является максимально сходным, то результаты могут показать более высокую вариабельность по сравнению с опытами с обогащенным навозом за счет различий в метаболизме у отдельных животных.

В принципе испытание проводят, как описано в основной части данного стандарта, поэтому перечисляются только пункты, требующие изменения (например, никаких изменений вносить не требуется в испытание стандартных веществ, критерии достоверности или культивирование двух тестовых видов). В дополнение к этим изменениям ниже приведены сведения относительно оборудования, используемого для обработки поголовья скота испытуемым веществом (в зависимости от используемой лекарственной формы, например шприц), а также не требуется описание обработанных животных (например, порода, возраст, масса крупного рогатого скота; условия содержания животных, в том числе кормление; периодичность обработок поголовья скота).

Информация об испытуемом веществе

Пункты 3.1, 4.1 — В дополнение к физико-химическим свойствам испытуемого вещества указывают лекарственную форму, используемую в испытании.

Описание испытания

Пункт 8.2.3 — Так как невозможно точно предвидеть, в каком количестве испытуемое вещество будет находиться в навозе, то навоз анализируют на содержание испытуемого вещества и его основных метаболитов. Анализ остаточных количеств проводят до тех пор, пока испытуемое вещество обнаруживается в фекалиях обработанного скота.

Пункт 8.3.1 — Навоз от обработанных коров отбирают на разные интервалы времени после обработки, в зависимости от характера выделения испытуемого вещества (например, для пур-она, содержащего ивермектин, используемого для обработки крупного рогатого скота, пробы отбирают на 12-е сутки после обработки [30]). Пробы навоза от каждого животного и за 1 сут объединяют и смешивают для получения однородного образца. Из каждого образца отбирают 100 г (сырая масса) для каждой повторности (= сосуда).

Пункт 8.5.1 — В зависимости от цели испытания аналогичный дизайн испытания можно использовать как для испытаний с обогащенным навозом, так как для проб навоза от обработанного скота, содержащих различные концентрации испытуемого вещества в зависимости от характера его выделения. Таким образом, возможны испытание с определением диапазона предельных концентраций (только для одной даты отбора проб) или дизайн с определением зависимости «доза — эффект» (EC_x, NOEC). По тем же причинам отсутствует какое-либо различие в отношении статистической обработки.

Раздел 10 — В заключительном отчете представлена информация, касающаяся внесенных поправок к проведению испытания, описанных в приложении В.

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа

Таблиц ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа OECD, Test No. 228:2008	
Раздел	Подраздел, пункты	Перечисления	Раздел	Перечисления
Введение			2, 3, 4	
1	—	—	1	—
2	2.1	—	Приложение 1	—
	2.2	—	Приложение 1	—
3	—	—	5	—
4	4.1	—	6	—
	4.2	—	7	—
5	—	—	8	—
6	—	—	9	—
7	7.1	—	—	—
	7.1.1	—	10	—
	7.1.2	—	11	—
	7.2	—	—	—
	7.2.1	—	12	—
	7.2.2	—	13	—
	7.3	—	14	—
	7.4	—	15	—
8	8.1	—	—	—
	8.1.1	—	16	—
	8.1.2	—	17	—
	8.2	—	—	—
	8.2.1	—	18	—
	8.2.2	—	19	—
	8.2.3	—	20	—
	8.3	—	—	—
	8.3.1	—	21	—
	8.3.2	—	22	—
	8.3.3	—	23	—
	8.3.4	—	24	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа OECD, Test No. 228:2008	
Раздел	Подраздел, пункты	Перечисления	Раздел	Перечисления
8	8.4	—	25	—
	8.5	—	—	—
	8.5.1	—	26	—
	8.5.2	—	27	—
	8.5.3	—	28	—
	8.5.4	—	29	—
9	9.1	—	30	—
	9.2	—	31	—
10	10.1—10.5	—	32	—
Приложение А			Приложение 2	
Приложение Б			Приложение 3	
Приложение В			Приложение 4	
Библиография			Литература	

Библиография

[1] Cotterell G. (1920): The life-history and habits of the yellow dung-fly (*Scathophaga stercoraria)*; a possible blow-fly check. Proceedings of the Zoological Society of London, 629—647

[2] Sack P. (1937): 62a Cordyluridae. In: E. Lindner (Ed.). Die Fliegen der Palaearktischen Region, p. 1—103

[3] Hackman W. (1956): The Scatophagidae (Dipt.) of eastern Fennoscandia, Tilgmann, Helsingsforsiae, p. 1—67

[4] Gorodkov K.B. (1984): 100. Family Scathophagidae. In: Keys to the Insects of the European Part of the USSR, p. 732—759

[5] Blume R.R. (1985): A checklist, distributional record, and annotated bibliography of the insects associated with bovine droppings of pastures in America north of Mexico. Southwest. Entomol. Suppl. 9: 1—54

[6] Sifner F. (2003): The family Scathophagidae (Diptera) of the Czech and Slovak Republics (with notes on selected Palaearctic taxa). In: Acta musei nationalis Pragae, series B-Historia Naturalis. 59: 1—90

[7] Kunz S.E., Murrell K.D. et al. (1991): Estimated losses of livestock to pests. CRC Handbook of Pest Management in Agriculture. 2nd. Ed.,Boston, CRC Press, Inc. I: 69—105

[8] Webb J.D., Burg J.G. et al. (1991): Moxidectin Evaluation against *Solenoptes capillatus* (Anoplura: Linognathidae*), Bovicola bovis* (Mallophaga: Trichodectidae), and *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) on Cattle. Journal of Economic Entomology 84: 1266—1269

[9] Sommer C., Steffansen B., Overgaard Nielsen B., Gronvold J., Vagn Jensen K.M., Brochner J., Jespersen J., Springborg J. and Nansen P. (1992): Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: concentrations and impact on dung fauna. Bulletin of Entomological Research 82: 257—264

[10] Strong L. and James S. (1993): Some effects of rearing the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* in cattle dung containing Ivermectin. Entomol. Exp. Appl. 63: 39—45

[11] Surgeoner G.A., Lindsay L.R. and Heal J.D. (1996). Field Evaluation of Eliminator, Protector and Stockaid Ear Tags for Control of Face Flies and Pyrethroid-Resistant Horn Flies on Beef Cattle. University of Guelph, Canada. http://bru.aps.uoguelph.ca/articles96

[12] Bernasconi M.V., Pawlowski J., Valsagiacomo C., Piffaretti J-C. and Ward P.I. (2000): Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera, Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics & Evolution 16: 308—315

[13] Blanckenhorn W.U. (2007): Causes and Consequences of Phenotypic Plasticity in Body Size: The case of the Yellow Dung Fly *Scathophaga stercoraria* (Diptera: Scathophagidae). In press in *Insect phenotypic plasticity* (ed. by T.N. Ananthakrishnan and D.W. Whitman)

[14] Römbke J., Barrett K., Gray J., Knäbe S., Lehmhus J., Rosenkranz B., Sekine T., Scheffczyk A., Schmidt T. & Sharples A. 2006. Results of an International Ring test according to the Draft Guideline «Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies [*Scathophaga stercoraria* L. (Scathophagidae), *Musca autumnalis* De Geer (Muscidae)]. In prep

[15] Hughes J. (2003): Draft Protocol. Determination of Acute Toxicity of a Test Chemical to Dung Flies. A standardised bioassay procedure for *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae), *Musca vetustissima* Walker (Diptera: Muscidae) and *Scathophaga stercoraria* L. (Diptera: Scatophagidae). Unpublished Report, Invesresk Ltd., UK, 8 p

[16] Skidmore P. (1991): Insects of the British cow-dung community. Field Studies Council. Occasional Papers Series No. 21. Shrewsbury, UK. 166 p

[17] ISO 11461 (1992): Soil Quality — Determination of soil water content on a volume basis — Gravimetric method

[18] ISO 10390 (1994): Soil Quality — Determination of pH

[19] Tilman D. and Wedin D. (1991): Plant traits and resource reduction for five grasses growing on a nitrogen gradient. Ecology 72: 685—700

[20] Hesse P.R. (1971): A textbook on soil chemical analysis. John Murray, London

[21] ISO 10694 (1995a): Soil quality — Determination of organic carbon and total carbon after dry combustion

[22] ISO 11261 (1995b): Soil Quality — Determination of total nitrogen — Modified Kjeldahl method using titanium dioxide as catalyst

[23] ISO 13878 (1997): Soil Quality — Determination of total nitrogen content after dry combustion (element analysis)

[24] OECD (2004): Draft Guidance Document on the statistical analysis of ecotoxicity data. Envir. Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. 214 p

[25] Abbot W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology. 18: 265—267

[26] OECD No. 220 (2003): OECD Guidelines: for the Testing of Chemicals. Enchytraeid Reproduction Test

[27] OECD No. 218 (2004): OECD Guidelines: for the Testing of Chemicals. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment

[28] VICH (2005): Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) — Phase II Guidance. VICH Guideline 38 (Ecotoxicity Phase II), Bruxelles (Belgium), October 2004

[29] Failes E.S., Whistlecraft J.W. and Tomlin A.D. (1992): Predatory behaviour of *Scatophaga stercoraria* under laboratory conditions. Entomophaga 37: 205—213

[30] Lumaret J-P., Alvinerie M., Hempel H., Schallnaß H-J., Claret D. & Römbke J. (2006): New screening test to predict the potential impact of ivermectin-contaminated cattle dung on dung beetles. Veterinary Research 38: 15—24

[31] ISO 10694 (1995): Soil Quality — Determination of organic carbon and total carbon after dry combustion

УДК 658.382.3:006.354 МКС 13.020.01 MOD

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, эмбриональная токсичность, навозные двукрылые мухи

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.И. Рычкова*
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 03.06.2019. Подписано в печать 29.07.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,33. Уч.-изд. л. 1,80.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru