МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
33039—
2014**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Пчелы медоносные: тест на острую контактную токсичность

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 центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») 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 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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2014 г. № 1988-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33039—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test No. 214:1998 «Пчелы медоносные: тест на острую контактную токсичность» («Honeybees, Acute Contact Toxicity Test», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 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, 2015, 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 Исходные положения 1
4 Принцип теста 1
5 Достоверность теста 2
6 Описание теста 2
7 Процедура теста 3
8 Данные и отчет о проведении теста 4
Библиография 6

Введение

Данное руководство описывает лабораторный метод тестирования, предназначенный для оценки острой контактной токсичности пестицидов и других химических веществ в отношении рабочих особей медоносных пчел. Оно основано главным образом 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 взаимодействий растение—пчела (ICPBR) на 5-м Международном симпозиуме по опасности пестицидов для пчел, проходившем в Вагенингене (Нидерланды) в 1993 г. [2]. Также учитывались другие существующие руководства [3], [4], [5].

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Пчелы медоносные: тест на острую контактную токсичность

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

Дата введения — 2015—08—01

1 Область применения

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

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применимы термины со следующими определениями:

2.1 **острая контактная токсичность** (acute contact toxicity): Неблагоприятные последствия, происходящие под действием прямого однократного нанесения дозы тестируемого вещества на протяжении периода максимум 96 ч.

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

2.3 LD_{50} **контактная** (медианное значение летальной дозы) (median lethal dose) contact): Статистически определенная однократная доза вещества, вызывающая смерть 50 % подопытных насекомых при применении его контактным 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 контактной токсичности для пчел, если вероятно воздействие на них применяемого химического вещества. Оценка острой контактной 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.

4 Принцип теста

Взрослых рабочих особей медоносных пчел подвергают воздействию серии доз тестируемого вещества, растворенного в подходящем носителе, путем прямого нанесения (капельным способом) на

Издание официальное

грудную область. Продолжительность опыта — 48 часов. 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). Смертность регистрируют ежедневно и сравнивают с контролем. 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 известной 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 пчелиного 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 (садок). 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), пища должна предоставляться неограниченно (*ad libitum*). 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

6.4.1 Отобранные пчелы могут быть подвергнуты анестезии обработкой углекислым газом или азотом перед нанесением испытуемого вещества. Количество анестетика и время его воздействия должны быть минимизированы. Умирающие пчелы не пригодны к использованию и должны быть заменены на здоровых до начала опыта.

6.4.2 Тестируемое вещество следует наносить в виде раствора в подходящем растворителе (органическом или воде). Предпочтительным органическим растворителем является ацетон, но можно использовать и другие малотоксичные для пчел растворители (диметилформамид, диметилсульфоксид). Для тестируемых воднодиспергируемых препаратов и высокополярных органических веществ, нерастворимых в органических растворителях, может быть рекомендован вариант их нанесения с разбавленными растворами смачивателей типа Аграл, Цитовет, Люброл, Тритон, Твин (Agral, Citowett, Lubrol, Triton, Tween).

6.4.3 Использование растворителей и диспергаторов следует учитывать при подготовке контрольных растворов. Так, если растворитель или диспергатор использовали для растворения испытуемого вещества, должны быть изучены 2 контроля: группа, обработанная водой, и группа, обработанная растворителем /диспергатором.

6.4.4 Собранных пчел случайным образом распределяют в клетках для испытаний, которые в случайном порядке расставлены в комнате для испытаний. Можно организовать голодание пчел в течение 2 часов до проведения теста. Желательно, чтобы пчелы были отлучены от пищи до обработки, для того чтобы содержимое кишечника всех пчел было одинаковым на момент начала теста. Умирающие пчелы не годны к использованию и должны быть заменены на здоровых до начала опыта.

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.

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 контактная токсичность:

LD_{50} (24 часа) = 0,10—0,30 мкг/пчела [7]. Однако могут использоваться и другие токсичные для пчел вещества, если для них имеется достаточно проверенных данных (например, паратион).

7.3 Нанесение тестируемого вещества

Анестезированных пчел обрабатывают индивидуально путем местного нанесения испытуемого вещества. Пчел для нанесения тестируемых доз и для контролей отбирают случайным образом. Объем 1 мкл раствора, содержащего тестируемое вещество в соответствующей концентрации, должен быть нанесен микроаппликатором на верхнюю часть грудной области каждой пчелы. Другие объемы тестируемого вещества также могут быть использованы, если это необходимо. После нанесения вещества пчел помещают в клетку и обеспечивают раствором сахарозы.

7.4 Условия теста

Пчелы должны содержаться в экспериментальной комнате в темноте 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. Если смертность продолжает возрастать более чем на 10 % между 24 и 48 часами, опыт нужно продлить максимально до 96 ч при условии, что смертность на контроле менее 10 %.

7.6 Наблюдения

Смертность учитывают спустя 4 ч после начала теста и далее через 24 и через 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 %. 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, чтобы показать, что LD_{50} больше этой концентрации. Он проводится по аналогичной схеме — с использованием трех репликатов для тестируемой дозы, соответствующих контролей, с оценкой количества потребленной пищи и с использованием токсичного вещества сравнения. При появлении смертности должно быть осуществлено полное исследование. Проявление сублетальных явлений (см. 7.6) должно быть зарегистрировано.

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]. 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 концентрация действующего вещества (веществ)).

Тестируемые пчелы:

- 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 число 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 180pp.

[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 IDT

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

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 02.04.2019. Подписано в печать18.04.2019. Формат 60×84$^{1}/_{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,12.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении 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