
МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
33035—
2014

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ
ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ
ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Птицы: репродукционный тест

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2019

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 20 октября 2014 г. № 71-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 |
|---|------------------------------------|---|
| Азербайджан | AZ | Азстандарт |
| Армения | AM | Минэкономики Республики Армения |
| Беларусь | BY | Госстандарт Республики Беларусь |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Молдова | MD | Молдова-Стандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Таджикистан | TJ | Таджикстандарт |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1697-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33035—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test No. 206:1984 «Птицы: репродукционный тест» («Avian Reproduction 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»

© Стандартиформ, 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, определения и единицы измерения | 1 |
| 3 Сущность теста | 1 |
| 4 Информация о тестируемом веществе | 1 |
| 5 Вещество сравнения | 2 |
| 6 Достоверность теста | 2 |
| 7 Описание теста | 2 |
| 8 Проведение теста | 4 |
| 9 Наблюдения | 5 |
| 10 Данные и отчет о проведении теста | 5 |
| 11 Библиография | 7 |

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ,
ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ****Птицы: репродукционный тест**Test methods for of chemicals of environmental hazard Avian reproduction test

Дата введения — 2015—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод оценки воздействия химических веществ на репродуктивную функцию птиц.

2 Термины, определения и единицы измерения

В настоящем стандарте применимы термины со следующими определениями:

2.1 НОЕС (недействующая концентрация) (no observed effect concentration): Максимальная концентрация химических веществ, используемая для тестирования, при которой не наблюдается вредных эффектов.

2.2 основной рацион (basal diet): Корм, пригодный для данного вида птиц и по своей питательной ценности, отвечающей потребностям молодых птиц.

2.3 кладка яиц (eggs set): Инкубируемые яйца или все отложенные яйца за исключением тех, которые разбивают и затем удаляют для измерения толщины скорлупы.

3 Сущность теста

Птицы получают корм, содержащий тестируемое вещество в разных концентрациях, не менее 20 недель. Птиц стимулируют откладывать яйца, изменяя продолжительность светового периода. Яйца, собранные в течение 10 недель, искусственно инкубируют, дожидаясь вылупления и молодых особей выдерживают в течение 14 дней. Смертность взрослых особей, количество отложенных яиц, разбитые яйца, толщина скорлупы, жизнеспособность, вылупляемость и воздействие на молодых птиц сравнивают с соответствующими показателями при контроле.

Дополнительная информация приведена в [1]—[7].

4 Информация о тестируемом веществе

Должна быть известна следующая информация о тестируемом веществе:

- растворимость в воде;
- давление паров;
- токсичность для птиц при скармливании;
- структурная формула;
- чистота;
- метод анализа тестируемого вещества в корме птиц;
- химическая стабильность в воде, на свету и в корме;
- коэффициент распределения н-октанол/вода;
- результаты теста на способность к биоразложению.

5 Вещество сравнения

Для данного теста не предусмотрено применение веществ сравнения.

6 Достоверность теста

Показания:

- смертность в контрольном варианте в конце испытания не должна превышать 10 %;
- среднее количество выживших 14-дневных птенцов на несушку в контроле должно быть: для маллардских уток — не менее 14, для американских куропаток — не менее 12 или японских куропаток — не менее 24;
- средняя толщина скорлупы яиц в контрольной группе должна быть не менее 0,34, 0,19 и 0,19 мм для маллардских уток, американских куропаток или японских куропаток, соответственно;
- если при рекомендованной схеме концентраций не отмечен эффект воздействия на репродукцию, то результаты могут быть представлены NOEC, равной самой высокой концентрации в тесте;
- должно быть показано, что концентрация тестируемого вещества поддерживается в корме на одном уровне в течение всего периода тестирования (она должна быть не менее 80 % от номинальной).

7 Описание теста

7.1 Подготовка

Необходимы подходящие условия для выращивания птиц, предпочтительно в помещении, которые позволяют контролировать вентиляцию, температуру, влажность и освещение. Искусственное освещение по спектру должно быть близко к дневному свету и автоматически контролироваться. Рекомендуются 15—30-минутный период сумерек.

Птиц случайным образом распределяют между тестовой и контрольной группами. Тестовая и контрольная группы птиц должны привыкать к условиям и основному рациону кормления в течение минимум двух недель. Птицы, плохо переносящие условия теста, могут быть перегруппированы в течение первой недели акклиматизации.

Популяцию птиц не следует использовать в тесте, если более чем 3 % обоих полов умирают или становятся истощенными в течение периода акклиматизации.

7.2 Оборудование

Необходимо следующее оборудование:

- чистые загоны для птиц, обеспечивающие способность к размножению и выведению птенцов; следует использовать чистую подстилку; место для высидывания птенцов должно иметь устройство для контроля температуры;
- инкубаторы, предпочтительно с автоматическим контролем температуры и влажности и устройством для переворачивания яиц;
- оборудование для хранения яиц при постоянной температуре и влажности.

7.3 Экспериментальные животные

7.3.1 Выбор видов

Один и более вид могут быть использованы в тесте. Виды должны быть выбраны в соответствии с целью проведения теста. Рекомендуются маллардская утка (*Anas platyrhynchos*), американская куропатка (*Colinus virginatus*) и японская куропатка (*Coturnix coturnix japonica*). Эти виды хорошо разводятся и легкодоступны. Если используют другие виды птиц, то обоснование должно быть представлено в отчете. Птицы могут быть приобретены или выведены в лаборатории. Птицы должны быть обследованы, не должно быть больных или поврежденных особей. Все птицы контрольной и тестовой групп должны быть из одной и той же популяции от известных производителей. Тестовые маллардские утки и американские куропатки должны быть внешне схожи с дикими особями этих видов.

7.3.2 Условия содержания и кормления

Взрослые птицы должны содержаться в хорошо вентилируемых помещениях при температуре 22 ± 5 °C и относительной влажности 50—75 %. В таблице 1 представлены дополнительные специфические условия для разных видов.

Кроме отсутствия тестируемого вещества в корме, условия содержания должны быть одинаковыми для периода акклиматизации и периода теста. Применение химических и медицинских препаратов должно быть по возможности исключено, их использование должно быть отмечено в отчете.

Т а б л и ц а 1 — Рекомендуемые условия содержания взрослых птиц

| Виды | Возраст в начале теста | Диапазон возраста во время теста | Минимальная площадь на пару птиц* |
|---|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Маллардская утка | 9—12 месяцев | ±2 недели | 1 м ² |
| Американская куропатка | 20—24 недели | ±1 неделя | 0,25 м ² |
| Японская куропатка | ** | ±1/2 недели | 0,15 м ² |
| * Если используют большие группы, площадь должна быть пропорционально увеличена; ** Эта рекомендация для японских куропаток перед использованием в тесте была проверена в бридерах (таблица 3) и сделана для уменьшения вариабельности с этими видами. | | | |

Любые отклонения от условий содержания, которые могут изменить поведение птиц, должны быть исключены.

Условия содержания для яиц и птенцов представлены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 — Рекомендуемые условия для яиц и птенцов

| Условия | Температура (°С) | Относительная влажность (%) | Поворачивание |
|-------------------------------|------------------|-----------------------------|----------------|
| <i>Маллардская утка</i> | | | |
| Хранение | 14—16 | 60—85 | Не обязательно |
| Инкубация | 37,5 | 60—75 | Да |
| Выведение | 37,5 | 75—85 | Нет |
| Птенцы, 1-я неделя | 32—35 | 60—85 | — |
| Птенцы, 2-я неделя | 28—32 | 60—85 | — |
| <i>Американская куропатка</i> | | | |
| Хранение | 15—16 | 55—75 | Не обязательно |
| Инкубация | 37,5 | 50—65 | Да |
| Выведение | 37,5 | 70—75 | Нет |
| Птенцы, 1-я неделя | 35—38 | 50—75 | — |
| Птенцы, 2-я неделя | 30—32 | 50—75 | — |
| <i>Японская куропатка</i> | | | |
| Хранение | 15—16 | 55—75 | Не обязательно |
| Инкубация | 37,5 | 50—65 | Да |
| Выведение | 37,5 | 70—75 | Нет |
| Птенцы, 1-я неделя | 35—38 | 50—75 | — |
| Птенцы, 2-я неделя | 30—32 | 50—75 | — |

Температура и влажность приведены для инкубаторов и хетчеров с принудительной вентиляцией. Для инкубаторов и хетчеров с естественной вентиляцией и гравитационно-вентилируемых температура должна быть на 1,5—2 °С выше и относительная влажность должна быть увеличена на 10 %. Для больших высот необходима большая относительная влажность. Температура в брудере должна измеряться в 2,5—4 см выше гнезда.

7.4 Условия проведения теста

Для теста необходимы минимум три концентрации тестируемого вещества. Используемые в тесте концентрации должны базироваться на результатах теста LC_{50} (при скармливании). Наивысшие концентрации должны составлять примерно половину LC_{10} . Более низкие концентрации должны быть разбиты на интервалы в геометрической прогрессии от максимальной дозы (то есть 1/6 и 1/36 от максимальной дозы). Рекомендуемая максимальная доза — 1000 мг/кг.

Корм, содержащий требуемые количества тестируемого вещества, должен быть приготовлен единообразно смешиванием тестируемого вещества с кормом для взрослых птиц. Равномерное распределение вещества в корме является критерием для выбора метода смешивания. Обычно для обеспечения равномерного распределения используется носитель с низкой токсичностью для птиц. Носители не должны превышать 2 % от массы пищи. Если для тестируемого корма используется носитель, то такие же количества его должны быть добавлены к корму птиц в контроле. Приемлемы в качестве носителей вода, кукурузное масло или другие носители, которые не влияют на токсичность тестируемого вещества. Требуется экспериментальное подтверждение для носителей, у которых нет хорошего документального подтверждения того, что они не взаимодействуют с тестируемым веществом.

К пище птенцов не добавляют никаких тестируемых веществ или носителей.

8 Проведение теста

Птицы могут содержаться в гнездах как парами, так и группами из одного самца и двух (американская и японская куропатка) или трех (маллардская утка) самок. Не исключены другие компоновки, если имеется такая практика. Контрольных и обрабатываемых птиц содержат в одинаковых экспериментальных условиях. Для парных тестов, по крайней мере, двенадцать гнезд должны использоваться для каждой концентрации и для контроля. Для тестов с группами не менее 8-ми гнезд маллардской утки и 12-ти гнезд американской и японской куропаток следует использовать для каждой концентрации и контроля.

Тест начинают с внесения в корм птиц тестируемого вещества. Кормление взрослых птиц тестируемым веществом должно осуществляться на протяжении всего теста. В корм птенцов, появляющихся во время проведения теста, не добавляют ни тестируемое вещество, ни носитель. Чистая вода должна быть доступна без ограничений.

Если тест проводят в искусственных условиях в закрытых помещениях, то птиц следует выдерживать в условиях короткого светового дня (от 7 до 8 ч света в день) в течение восьми недель после начала теста. В это время период темноты не должен прерываться. Затем световой период увеличивают до 16—18 световых часов в день, чтобы создать птицам условия для размножения. Яйцекладка должна начаться через 2—4 недели после удлинения светового периода.

Если тест проводят в открытом помещении, время теста должно соответствовать естественному сезону размножения видов в месте проведения теста. Птицы должны получать корм, содержащий тестируемое вещество, по крайней мере, в течение 10 недель перед тем, как начнется нормальная яйцекладка.

Для других условий тест должен продолжаться не менее восьми недель, предпочтительно 10 недель после того, как начнется яйцекладка.

Концентрация испытуемого вещества в корме не должна быть ниже 80 % от ожидаемой концентрации после первой недели теста. В течение первой недели теста корм, содержащий наивысшую и наиминимальную концентрации, должен быть проанализирован немедленно после начального смешивания и повторно в течение четырех часов, пока не будет адекватно продемонстрирована стабильность концентрации тестируемого вещества в корме. Если все результаты лежат в пределах 80 % от ожидаемой концентрации, дальнейшее проведение анализов не требуется и тестируемый корм должен все чаще обновляться, чтобы обеспечить нужную концентрацию.

Если обе серии анализов показывают, что концентрации испытуемого вещества менее 80 % от ожидаемой концентрации, должна быть проведена корректировка, чтобы поднять начальную концентрацию или поддерживать актуальную концентрацию более частыми добавлениями. Во вторую неделю теста должны быть проведены дополнительные анализы, чтобы быть уверенными, что корректирующие действия привели к значению концентрации 80 %.

Независимо от поддержания стабильной концентрации испытуемого вещества в корме, он должен обновляться, по крайней мере, раз в неделю. Если вещество стабильно, причем исключительно в пределах, когда корм необходимо обновлять ежедневно, такой тест считается неприемлемым.

После начала кладки яиц их следует собирать ежедневно, необходимо отмечать, из какого гнезда они отобраны. Яйца должны храниться и поворачиваться еженедельно или каждую неделю до инкубации (таблица 2). Перед инкубацией все яйца должны быть осмотрены для выявления трещин. Треснувшие яйца не должны инкубироваться. Кладки яиц для инкубации следует снова осмотреть через 6—11 дней для определения их жизнеспособности.

Не менее двух яиц из каждого гнезда, заранее (то есть третье и десятое яйца или все яйца, собранные на 5, 20 и 35-й дни кладки) должны быть отобраны для измерения толщины скорлупы. Треснувшие яйца не следует измерять, но их количество необходимо записать в отчете. Яйца должны быть открыты, вымыты, высушены в ненарушенном виде и измерены в трех или четырех точках. Яйца должны быть перемещены из инкубационных условий в условия высиживания для маллардских уток на 23-й день, американских куропаток — на 21-й, для японских — на 16-й. Высиживание должно быть завершено для маллардских уток на 25—27-й день, американских куропаток — на 23—24-й, японских — на 17—18-й день.

Птенцы должны быть собраны в группы, согласно изначальным гнездам или индивидуально помечены и собраны вместе. Птенцам необходима нужная диета (без испытуемого вещества) в течение 14 дней. Температура и влажность для содержания птенцов приведены в таблице 2. Предпочтительна имитация суточного освещения (то есть 14 часов света, 10 часов темноты) с 15—30 мин. переходного освещения; допустимы другие режимы освещения.

9 Наблюдения

Следующие наблюдения должны быть выполнены во время теста:

- смертность и признаки токсичности: ежедневно;
- масса тела взрослых особей: в начале эксперимента, перед кладкой яиц и в конце исследования;
- масса тела птенцов: в возрасте 14 дней;
- потребление пищи взрослыми птицами с одно-, двухнедельными интервалами за время эксперимента;
- потребление корма птенцами: в первую и вторую неделю после вылупливания;
- всестороннее обследование для всех взрослых птиц.

Анализ остатков тестируемого вещества в отобранных тканях птиц может быть полезен, особенно для тестируемого вещества со значением $\log P$ (n-октанол/вода) выше 3,0.

10 Данные и отчет о проведении теста

10.1 Обработка результатов

Тест-группы должны индивидуально сравниваться с контрольной группой с помощью статистических процедур, указанных в плане работ. Любой подходящий статистический метод, например, дисперсионный анализ или другие пригодные методы, представленные в библиографии [8] могут быть использованы. В статистический анализ должны быть включены параметры, представленные в таблице 3, и также, если возможно, процент отложенных яиц, масса тела взрослых птиц и масса тела выживших 14-дневных птенцов.

10.2 Отчет о тесте

Отчет должен включать следующую информацию:

- тестируемое вещество: данные по химической идентификации;
- тестируемые особи: научные названия видов птиц, возраст птиц в начале теста (в неделях или месяцах), состояние птиц, предварительная обработка и т. п.;
- описание основного рациона, включая источник, состав, производственные анализы корма (белки, углеводы, жиры, кальций, фосфор и т. п.), любые другие добавки и носители;
- корм в тесте: способ приготовления, число использованных концентраций, номинальные (если определялись) измеренные концентрации тестируемого вещества в корме на каждом уровне, аналити-

ческие методы определения концентраций, используемые в процессе проведения теста, частота смешивания и обновления, носители (если использовались), условия хранения, способы обработки;

- процедуры акклиматизации и метод случайного отбора птиц для распределения по гнездам и любые перестановки, появляющиеся при какой-либо несовместимости птиц;
- количество птиц в гнезде и число повторностей гнезд на одну концентрацию и на контроль;
- методы идентификации яиц и птиц;
- условия хранения яиц, инкубации и высживания, включая температуру, влажность и частоту переворачивания;
- название токсиканта, используемого в качестве вещества сравнения и метод приготовления тестируемых концентраций.

Результаты:

- частота, продолжительность, описание проявления токсичности по мере увеличения концентрации, число особей с признаками интоксикации и любые ремиссии;
- потребление пищи и масса тела для взрослых птиц и птенцов;
- детали макроскопического обследования;
- результаты анализа остатков тестируемого вещества (если его проводили);
- количество снесенных яиц, кладка яиц, жизнеспособность, вылупляемость (включая нормальных вылупившихся птенцов), выживаемость птенцов и толщина скорлупы (в целом по каждому уровню концентрации и для каждого гнезда понедельно в течение проведения теста, предпочтительно в форме таблиц);
- методы статистического анализа и интерпретация результатов;
- NOEC и другие статистически значимые уровни воздействия;
- что-либо необычное во время теста и другая значимая информация, которая может иметь влияние на результаты.

Т а б л и ц а 3 — Нормальные* значения параметров репродукции

| Параметр | Маллардские утки | Американские куропатки | Японские куропатки |
|--|------------------|------------------------|--------------------|
| Продуцирование яиц — число отложенных яиц на несушку (10 нед.) | 28—38 | 28—38 | 65—80 |
| Процент треснувших яиц | 0,6—6 | 0,6—2 | — |
| Жизнеспособность (процент жизнеспособных эмбрионов от числа отложенных яиц) | 85—98 | 75—90 | 80—92 |
| Вылупляемость (число вылупившихся от числа отложенных яиц) | 50—90 | 50—90 | 65—80 |
| Процент выживших за 14 дней от числа вылупившихся | 94—99 | 75—90 | 93 |
| Число 14-дневных птенцов на несушку | 16—30 | 14—25 | 28—38 |
| Толщина скорлупы, мм | 0,35—0,39 | 0,19—0,24 | 0,19—0,23 |
| * Эти значения типичные, но не обязательно представительные для всех условий. Если у контрольной группы птиц эти значения не встречаются или даже приблизительно не достигают этих значений, тестовые процедуры и условия содержания должны быть исследованы в связи с возможным возникновением проблем. | | | |

Библиография

- [1] U.S. EPA: Registration of Pesticides in the United States — Proposed Guidelines, *Federal Register* 43, No. 132 (July 10, 1978).
- [2] Toxic Substances Control Act, Section 4: Five-day Dietary Toxicity Test Standard for Mallard and Bobwhite, Office of Toxic Substances, U.S. EPA, Washington, D.C.
- [3] National Research Council Laboratory Animal Management^A Wild Birds. U.S. National Academy of Sciences, Washington D.C. (1977).
- [4] National Research Council: Coturnix. Standards and Guidelines for the Breeding, Care, and Management of Laboratory Animals, U.S. National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1969).
- [5] R.G. Heath, J.W. Spann and J.F. Kreitzer, *Nature* 224, 47—48 (1969).
- [6] R.G. Heath and J.W. Spann, in *Pesticides and the Environment: A Continuing Controversy*, pp. 421—435, Symposia Specialists, North Miami, Florida (1973).
- [7] G.Heinz, *Bull. Env .Cont. Toxic.* 386—392 (1974).
- [8] D.J. Finney, *Statistical Methods in Biological Assay*, 3rd ed., Griffin, Weycombe, U.K. or Macmillan, New York (1978).

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, токсичность, репродуктивность, птицы

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *Е.Е. Кругова*

Сдано в набор 02.04.2019. Подписано в печать 25.04.2019. Формат 60×84¹/₈. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,00.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта