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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33643— 2015

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Хищные клещи: репродуктивный тест в почве

(OECD, Test No. 226:2008,
MOD)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 ноября 2015 г. № 1864-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33643—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. 226:2008 «Хищные клещи: репродуктивный тест в почве» [«Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil», MOD] путем изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного документа приведено в дополнительном 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 . . . 2
4 Информация об испытуемом веществе . . . 2
5 Достоверность испытания . . . 2
6 Стандартные вещества . . . 2
7 Описание метода . . . 3
7.1 Испытуемые сосуды и оборудование . . . 3
7.2 Приготовление искусственной почвы . . . 3
7.3 Выбор и подготовка тестовых организмов . . . 4
7.4 Подготовка испытуемых концентраций . . . 4
8 Проведение испытания . . . 5
8.1 Опытные группы и контроли . . . 5
8.2 Условия испытаний . . . 5
8.3 Кормление . . . 6
8.4 Выбор испытуемых концентраций . . . 6
8.5 Дизайн испытания . . . 6
8.6 Продолжительность испытаний и измерения . . . 7
9 Данные и отчет о проведении испытания . . . 7
9.1 Обработка результатов . . . 7
9.2 Отчет о проведении испытания . . . 8
Приложение А (рекомендуемое) Определение максимальной водоудерживающей способности почвы . . . 10
Приложение В (рекомендуемое) Определение pH почвы . . . 11
Приложение С (рекомендуемое) Культивирование амбарных клещей *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* и синхронизация культуры . . . 12
Приложение D (рекомендуемое) Методы выделения . . . 13
Приложение Е (рекомендуемое) Идентификация *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* . . . 15
Приложение F (рекомендуемое) Общая информация по биологии *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* . . . 16
Приложение G (рекомендуемое) Краткое описание и временной график основных действий, которые следует выполнить для проведения испытания на *Hypoaspis* . . . 17
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа . . . 18
Библиография . . . 20

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

Хищные клещи: репродуктивный тест в почве

Testing of chemicals of environmental hazard.
Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil

Дата введения — 2016—09—01

1 Область применения

1.1 Настоящий стандарт устанавливает метод оценки влияния химических веществ, находящихся в почве, на репродуктивную активность почвенных клещей вида *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer Canestrini* (клещи: *Laelapidae*) и тем самым оценить ингибирование специфической скорости роста в популяции клещей [1], [2]. В данном случае репродуктивная активность представляет количество неполовозрелых особей в конце периода испытания. *H. aculeifer* представляет собой трофический уровень, дополнительный к видам, для которых уже существуют стандарты. Репродуктивный тест, в который не входят дифференциация и количественная оценка различных стадий репродуктивного цикла, считается приемлемым для целей настоящего стандарта по проведению исследования. Могут быть подходящими другие подходы для веществ с другим протоколом воздействия, чем через почву [3].

1.2 *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* считается типичным представителем почвенной фауны и, в частности, хищных клещей.

1.3 Он распространен по всему миру [5], и его легко собрать и культивировать в лабораторных условиях. Краткая информация по биологии *H. aculeifer* приводится в приложении F. Имеющаяся информация по экологии видов клещей и использовании в экотоксикологических испытаниях представлена в [4]—[12].

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **репродуктивная активность** (reproductive output): Количество неполовозрелых особей в конце периода испытания.

2.2 **NOEC** (no observed effect concentration): Неэффективная наблюдаемая концентрация представляет собой концентрацию испытуемого вещества, при которой не наблюдается эффекта; в настоящем испытании концентрация, соответствующая NOEC, не имеет статистически значимого эффекта ($p < 0,05$) в течение определенного периода воздействия по сравнению с контролем.

2.3 **LOEC** (lowest observed effect concentration): Наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация представляет собой самую низкую концентрацию испытуемого вещества, которая имеет статистически значимый эффект ($p < 0,05$) в течение определенного периода воздействия по сравнению с контролем.

2.4 **EC_x** (effect concentration for x % effect): Эффективная концентрация для x %-ного эффекта представляет собой концентрацию, которая вызывает x %-ный эффект на тестовые организмы в течение определенного периода воздействия по сравнению с контролем: например, EC_{50} представляет концентрацию, вызывающую эффект в конечной точке испытания в 50 % популяции, подвергшейся воздействию в течение определенного периода воздействия.

Издание официальное

3 Принцип метода

Взрослые самки подвергаются воздействию различных концентраций испытуемого вещества, смешанного с почвой. Испытание начинается с внесения 10 взрослых самок на повторность. Самцы не используются в испытании, поскольку показано, что самки спариваются сразу же или вскоре после выхода со стадии дейтонимфы, если присутствуют самцы. Кроме того, включение самцов приведет к удлинению испытания, поскольку в этом случае потребуется определение возрастных стадий. Таким образом, само спаривание не входит в испытание. Самки включаются в испытание через 28—35 сут после начала яйцекладки в синхронизации (см. приложение С), поскольку тогда самок можно считать уже спаренными и прошедшими стадию, предшествующую яйцекладке. При температуре 20 °С испытание завершается на 14-е сутки после внесения самок (день 0), что позволяет первому потомству в контроле достичь стадии дейтонимфы (см. приложение С). В качестве основного измеряемого параметра определяют количество неполовозрелых особей на испытуемый сосуд и, кроме того, количество выживших самок. Репродуктивную активность клещей, подвергшихся воздействию испытуемого вещества, сравнивают с контролем для определения EC_x (например EC_{10}, EC_{50}) или концентрации, не вызывающей видимого эффекта (NOEC), в зависимости от дизайна опыта (см. 8.5.1.2). Общая схема испытания приведена в приложении G.

4 Информация об испытуемом веществе

4.1 Предпочтительно располагать информацией о растворимости в воде, коэффициенте распределения в системе «октанол — вода», log K_{ow}, коэффициенте распределения в почве и воде и давлении паров испытуемого вещества. Необходима дополнительная информация о поведении испытуемого вещества в почве, например скорости биотической и абиотической деградации.

4.2 Настоящий стандарт может использоваться для испытания растворимых или нерастворимых в воде веществ. Однако способ внесения испытуемого вещества соответственно будет различаться. Стандарт не распространяется на летучие вещества, т. е. вещества, для которых постоянная Генри или коэффициент распределения воздух/вода более единицы, или вещества, для которых давление пара превышает 0,0133 Па при температуре 25 °С.

5 Достоверность испытания

Для того чтобы результаты испытаний считались достоверными, в необработанных контролях должны быть выполнены следующие критерии достоверности:

- средняя смертность взрослых самок не должна превышать 20 % в конце испытания;
- среднее число неполовозрелых особей на повторность (с 10 внесенными взрослыми самками) должно составлять не менее 50 особей в конце испытания;
- коэффициент вариации, рассчитанный для числа неполовозрелых клещей на повторность, не должен превышать 30 % в конце определенного испытания.

6 Стандартные вещества

Определяют EC_x и/или NOEC стандартного вещества для подтверждения того, что условия лабораторных испытаний являются адекватными и реакция испытуемых организмов не изменяется с течением времени. Диметоат (CAS 60-51-5) является подходящим стандартным веществом, которое, как установлено, оказывает влияние на численность популяции [4]. В качестве альтернативного стандартного вещества используют борную кислоту (CAS 10043-35-3). С этим веществом имеется меньший опыт использования. Возможны два варианта дизайна:

- стандартное вещество испытывают параллельно с определением токсичности каждого испытуемого вещества в одной концентрации, которая приводит к уменьшению потомства более чем на 50 % по данным заранее проведенного опыта по изучению зависимости «доза — эффект». В данном случае количество повторностей должно быть таким же, как в контрольной группе (см. 8.5.1.2);
- в альтернативном варианте стандартное вещество испытывается один-два раза в год при определении зависимости «доза — эффект». В зависимости от выбранного дизайна различается количество концентраций и повторностей и интервал между концентрациями (см. 8.5.1.2), но следует доби-

ваться 10 % — 90 % эффекта (интервал между концентрациями 1,8). Значение EC_{50} для диметоата по количеству неполовозрелых особей должно находиться в диапазоне 3,0—7,0 мг · ДВ/кг сухой почвы. На основании данных, полученных для борной кислоты, значение EC_{50} по количеству неполовозрелых особей должно находиться в диапазоне 100—500 мг/кг сухой почвы.

7 Описание метода

7.1 Испытуемые сосуды и оборудование

7.1.1 Используются испытуемые сосуды диаметром от 3 до 5 см (высота слоя почвы должна быть не менее 1,5 см), изготовленные из стекла или другого химически инертного материала, с плотно прилегающими крышками. Завинчивающиеся крышки являются предпочтительными, и в таком случае сосуды аэрируют два раза в неделю. В качестве альтернативы можно использовать колпачки, обеспечивающие прямой газообмен между субстратом и атмосферой (например, марлевые). Поскольку во время испытания содержание влаги должно поддерживаться на достаточно высоком уровне, то важно контролировать массу каждого испытуемого сосуда во время тестирования и при необходимости доливать воду. Это особенно важно, если отсутствуют завинчивающиеся крышки. Если используется непрозрачный испытуемый сосуд, то крышка должна быть изготовлена из материала, обеспечивающего доступ света (например, с перфорированным прозрачным покрытием), одновременно предупреждающего выход клещей. Размер и тип испытуемого сосуда зависят от способа выделения клещей (подробное описание приведено в приложении G). Если применяется выделение с тепловой обработкой непосредственно в испытуемом сосуде, то используют сетчатое дно с соответствующим размером отверстий (герметично закрытое до выделения), и высота слоя почвы должна быть достаточной для обеспечения градиента температуры и влажности.

7.1.2 Требуется стандартное лабораторное оборудование, в частности следующее:

- предпочтительно стеклянные сосуды с завинчивающимися крышками;
- сушильный шкаф;
- стереомикроскоп;
- кисточки для переноса клещей;
- pH-метр и люксметр;
- подходящие точные весы;
- соответствующее оборудование для контроля температуры;
- соответствующее оборудование для контроля влажности воздуха (не имеет особого значения, если испытуемые сосуды покрыты крышками);
- термостат или камера с регулируемой температурой;
- оборудование для выделения клещей (см. приложение G) [13];
- верхняя световая панель с функцией контроля освещенности;
- банки для сбора выделенных клещей.

7.2 Приготовление искусственной почвы

7.2.1 Для данного испытания используется искусственная почва. Искусственная почва состоит из следующих компонентов (все значения на основе сухой массы):

- 5 % сфагнового торфа, высушенного на воздухе и мелко измельченного [приемлемый размер частиц (2 ± 1) мм];
- 20 % каолиновой глины (содержание каолинита предпочтительно выше 30 %);
- примерно 74 % высушенного на воздухе промышленного песка (в зависимости от необходимого количества $CaCO_3$), преимущественно это мелкозернистый песок, в котором более чем 50 % частиц имеет размер в диапазоне от 50 до 200 мкм (микрон). Точное количество песка зависит от количества $CaCO_3$ (см. ниже), совместно доводятся до 75 %;
- менее 1,0 % карбоната кальция (измельченный $CaCO_3$ ч. д. а.) для получения pH (6,0 ± 0,5); добавляемое количество карбоната кальция может зависеть преимущественно от качества/источника торфа (см. примечание 1).

Примечания

1 Требуемое количество $CaCO_3$ зависит от компонентов почвенного субстрата, и его определяют по измерению pH в дополнительных пробах почвы непосредственно перед испытанием [14].

2 Содержание торфа в искусственной почве отличается от других стандартов ОЭСР по почвенным организмам, где в большинстве случаев используется 10 % торфа (например, [15]). Однако, согласно ЕОКЗР [16], обычная сельскохозяйственная почва содержит не более 5 % органического вещества, и снижение содержания торфа, таким образом, отражает уменьшение способности природной почвы адсорбировать испытуемое вещество к органическому углероду.

3 При необходимости, например для определенных целей испытания, природные почвы из незагрязненных мест могут также служить в качестве испытуемого и/или культурального субстрата. Однако если используется природная почва, то ее следует охарактеризовать по меньшей мере по источнику (месту сбора), pH, текстуре (распределению частиц по размеру) и содержанию органического вещества. По возможности должна быть информация о типе и названии почвы согласно классификации почв, и почва должна быть свободна от любых загрязнений. Если испытуемое вещество представляет собой металл или металлорганическое соединение, то также должна быть определена емкость катионного обмена (CEC) природной почвы. Особое внимание должно быть обращено на соответствие критериям достоверности, поскольку справочная информация о природных почвах в этом отношении обычно бывает редко.

7.2.2 Сухие компоненты почвы тщательно перемешивают (например, в большом лабораторном смесителе). Для определения pH используют смесь почвы и раствор 1 М хлорида калия (KCl) или 0,01 М хлорида кальция ($CaCl_2$) в соотношении 1:5 (см. [14] и приложение В). Если почва кислее, чем требуемый диапазон (см. 7.2.1), то ее pH корректируют добавлением соответствующего количества $CaCO_3$. Если почва слишком щелочная, то pH корректируют добавлением большего количества смеси, содержащей первые три компонента, описанные в 7.2.1, но исключив $CaCO_3$.

7.2.3 Максимальную водоудерживающую способность *WHC* искусственной почвы определяют в соответствии с методиками, описанными в приложении А. За 2—7 сут до начала испытания сухую искусственную почву предварительно увлажняют добавлением достаточного количества дистиллированной или деионизированной воды для получения примерно половины от конечного содержания воды, что составляет 40 % — 60 % максимальной *WHC*. Содержание влаги доводят до 40 % — 60 % максимальной *WHC* добавлением раствора испытуемого вещества и/или добавлением дистиллированной или деионизированной воды (см. 7.4.2.1—7.4.4.1). Проводят дополнительный грубый контроль необходимой влажности почвы, мягко сжимают почву в руке, и если содержание влаги требуемое, то между пальцами появляются мелкие капли воды.

7.2.4 В начале и конце испытания определяют влажность почвы высушиванием до постоянной массы при температуре 105 °С в соответствии с [17] и pH почвы в соответствии с приложением В или [14]. Эти измерения проводят на дополнительных образцах почвы без клещей для контрольной почвы и почвы с каждой концентрацией испытуемого вещества. pH почвы не следует доводить, когда испытывают кислые или основные вещества. Содержание влаги должно контролироваться в течение всего испытания периодическим взвешиванием сосудов (см. 8.1.2 и 8.2.3).

7.3 Выбор и подготовка тестовых организмов

Используемым в испытании видом является *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Для начала испытания требуются взрослые самки клещей, полученные из синхронной культуры. Клещей вносят примерно через 7—14 сут после созревания взрослых особей, 28—35 сут после начала яйцекладки в синхронизации (см. 3.1 и приложение С). Регистрируют источник клещей или поставщика и поддержание лабораторной культуры. Если поддерживается лабораторная культура, то рекомендуется подтверждать видовую идентичность не менее одного раза в год. Идентификационный лист приведен в приложении Е.

7.4 Подготовка испытуемых концентраций

7.4.1 Испытуемое вещество смешивают с почвой. Органические растворители, которые используются для упрощения обработки почвы испытуемым веществом, выбирают с учетом их низкой токсичности для клещей, и в дизайн испытания включают соответствующий контроль на растворитель (см. 8.5.1.2).

7.4.2 Испытуемое вещество, растворимое в воде

Раствор испытуемого вещества готовят в деионизированной воде в количестве, достаточном для всех повторностей для каждой испытуемой концентрации. Используют соответствующее количество воды для обеспечения необходимого содержания влаги, т. е. 40 % — 60 % от максимальной *WHC* (см. 7.2.3). Каждый раствор испытуемого вещества тщательно перемешивают с партией предварительно увлажненной почвы перед внесением в испытуемый сосуд.

7.4.3 Испытуемое вещество, нерастворимое в воде

Испытуемые химические вещества, не растворимые в воде, но растворимые в органических растворителях, растворяют в минимальном объеме подходящего растворителя (например, ацетона). Используют только летучие растворители. Если используются такие растворители, то растворы всех испытуемых концентраций и контроль должны содержать одинаковое минимальное количество растворителя. Растворитель наносится распылением или смешивается с небольшим количеством, например 10 г, мелкого кварцевого песка. Общее содержание песка в субстрате должно быть скорректировано с учетом этого количества. Растворитель удаляют выпариванием под вытяжкой в течение не менее 1 ч. Приготовленную смесь кварцевого песка и испытуемого вещества добавляют к предварительно увлажненной почве и тщательно перемешивают, добавляя соответствующее количество деионизированной воды для получения требуемой влажности. Конечную смесь помещают в испытуемые сосуды. Следует отметить, что некоторые растворители могут быть токсичными для клещей. Таким образом, рекомендуется сделать дополнительный контроль на воду без растворителя, если токсичность растворителя для клещей неизвестна. Если обоснованно показано, что растворитель (в используемых концентрациях) не является токсичным для клещей, то контроль на воду может быть исключен.

7.4.4 Испытуемое вещество, слаборастворимое в воде и органических растворителях

Для веществ, слаборастворимых в воде и органических растворителях, порцию 2,5 г мелко измельченного кварцевого песка в испытуемом сосуде (например, 10 г мелкого кварцевого песка на четыре повторности) смешивают с количеством испытуемого вещества с получением требуемой испытуемой концентрации. Общее содержание песка в субстрате должно быть скорректировано с учетом этого количества. Приготовленную смесь кварцевого песка и испытуемого вещества добавляют к предварительно увлажненной почве и тщательно перемешивают после добавления соответствующего количества деионизированной воды для получения требуемого содержания влаги. Конечную смесь распределяют между испытательными сосудами. Процедуру повторяют для каждой испытуемой концентрации и также готовят соответствующий контроль.

8 Проведение испытания

8.1 Опытные группы и контроли

8.1.1 Для каждого контрольного и испытуемого сосуда используют десять взрослых самок в 20 г искусственной почвы по сухой массе. Тестовые организмы вносят в течение 2 ч после подготовки конечного испытуемого субстрата (т. е. после внесения испытуемого объекта). В отдельных случаях (например, когда созревание, как полагают, является определяющим фактором) период времени между подготовкой конечного испытуемого субстрата и внесением клещей может быть увеличен (подробнее такое созревание см. [18]). Однако в таких случаях должно быть предоставлено научное обоснование.

8.1.2 После внесения клещей в почву насекомых кормят и измеряют первоначальную массу каждого испытуемого сосуда в качестве показателя контроля содержания влаги в почве в течение всего испытания, как описано в 8.2.3. Затем испытуемые сосуды закрывают, как описано в 7.1.1, и помещают в испытуемую камеру.

8.1.3 Готовят соответствующие контроли для каждого способа внесения испытуемого вещества, описанного в 7.4.1—7.4.4. Соответствующие описанные процедуры используют для приготовления контролей, где исключается внесение испытуемого вещества. Таким образом, при необходимости органические растворители, кварцевый песок или другие растворители используют для контролей в концентрациях/количествах, аналогичных в опыте. При использовании растворителя или другого носителя для внесения испытуемого вещества должен быть также приготовлен и испытан дополнительный контроль без растворителя или испытуемого вещества в том случае, если токсичность растворителя неизвестна (см. 7.4.3).

8.2 Условия испытаний

8.2.1 Температура при испытании должна составлять (20 ± 2) °С. Температуру контролируют по меньшей мере ежедневно и при необходимости регулируют. Испытание проводят при контролируемых циклах «свет — темнота» (предпочтительно 16 ч свет и 8 ч темнота) с освещенностью в пределах от 400 до 800 лк в непосредственной близости от испытательных сосудов. Для сопоставления эти условия являются такими же, как в других экотоксикологических испытаниях с почвой [15].

8.2.2 Газообмен обеспечивается аэрацией испытуемых сосудов по меньшей мере два раза в неделю в случае использования завинчивающихся крышек. Если используются марлевые колпачки, то особое внимание уделяют поддержанию влажности почвы (см. 7.1.1 и 8.2.3).

8.2.3 Содержание воды в почвенном субстрате в испытуемых сосудах поддерживается на протяжении всего испытания путем взвешивания сосудов и при необходимости периодически в испытуемые сосуды дополнительно заливают воду (например, раз в неделю). По мере необходимости потери за счет испарения восполняются деионизированной водой. Во время испытания содержание влаги не должно отличаться более чем на 10 % от исходного значения.

8.3 Кормление

8.3.1 Сырные клещи [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] являются подходящим источником питания. Также можно использовать мелкие коллемболы (например, неполовозрелые особи *Folsomia candida Willem*, 1902 или *Onychiurus fimatus* [19], [20]), энхитреиды (например, *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) или нематоды (например, *Turbatrix silusiae* de Man, 1913 [21]). Рекомендуется проверять корм, прежде чем его использовать в испытании. Тип и количество корма должны обеспечивать достаточное количество неполовозрелых особей для соответствия критериям достоверности (см. 5). Выбор кормового объекта следует делать с учетом механизма действия испытуемого вещества (например, акарицид может быть также токсичным для амбарных клещей (см. 8.3.2)].

8.3.2 Корм дается вволю [т. е. каждый раз небольшое количество (на кончике шпателя)]. Для этой цели можно также использовать слабо всасывающий аспиратор, как это предлагается в испытании с коллемболами, или также тонкую кисточку. Обычно достаточным является внесение корма в начале испытания и два-три раза в неделю. Если испытуемое вещество окажется токсичным для кормового объекта, то следует увеличить частоту кормления и/или перейти на альтернативный источник кормления.

8.4 Выбор испытуемых концентраций

Предварительная информация о токсичности испытуемого вещества облегчит выбор соответствующих испытуемых концентраций: например, проводятся с пятью концентрациями испытуемого вещества в диапазоне 0,1—1000 мг/кг сухой почвы с не менее одной повторностью в опыте и контроле. Продолжительность испытания по определению диапазона предельных концентраций составляет 14 сут, после чего определяются смертность взрослых клещей и количество неполовозрелых особей. Диапазон концентраций для конечного испытания предпочтительно выбирают таким образом, чтобы он включал концентрации, оказывающие отрицательное влияние на количество неполовозрелых особей и одновременно не действующие на выживаемость родительского поколения. Однако это не подходит для веществ, вызывающих летальный и сублетальный эффект практически в одинаковых концентрациях. Эффективная концентрация (например, EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) и диапазон концентраций, в котором оценивается эффект испытуемого вещества, должны входить в диапазон концентраций, включенных в испытание. Экстраполяцию значительно ниже самой низкой концентрации, влияющей на тестовые организмы, или выше самой высокой испытанной концентрации следует выполнять только в исключительных случаях, и тогда приводят исчерпывающее обоснование в отчете.

8.5 Дизайн испытания

8.5.1 Определение зависимости «доза — эффект»

8.5.1.1 Предлагаются три дизайна испытания на основе рекомендаций, приведенных для другого кольцевого теста (репродуктивный тест с энхитреидами [22]). Общая применимость всех этих дизайнов подтверждена результатами оценки достоверности для *H. Aculeifer*.

8.5.1.2 При установлении диапазона концентраций должно учитываться следующее:

- для определения EC_x (например, EC_{10}, EC_{50}) испытывают 12 концентраций. Рекомендуется использовать не менее двух повторностей для каждой испытуемой концентрации и шесть повторностей в контроле. Интервал между концентрациями может быть различным, т. е. ниже или равным 1,8 в предполагаемом диапазоне эффекта и выше 1,8 при более высоких и более низких концентрациях;
- для определения значения NOEC тестируют не менее пяти концентраций в геометрической прогрессии. Рекомендуется использовать четыре повторности для каждой испытуемой концентрации плюс восемь повторностей в контроле. Интервал между концентрациями не должен превышать 2,0;

- комбинированный подход позволяет определить значения NOEC и EC_x. В опыте используют восемь концентраций в геометрической прогрессии. Рекомендуется четыре повторности для каждой обработки плюс восемь повторностей в контроле. Интервал между концентрациями не должен превышать 1,8.

8.5.2 Определение диапазона предельных концентраций

Если в самой высокой концентрации при определении диапазона предельных концентраций (т. е. 1000 мг/кг сухой почвы) эффекты отсутствовали, то конечный репродуктивный тест проводится как испытание на предельные концентрации с использованием испытуемой концентрации 1000 мг/кг сухой почвы. Испытание на предельные концентрации обеспечит возможность показать, что значения NOEC или EC_{10} в отношении репродукции выше предельной концентрации, в то же время сводя к минимуму количество клещей, используемых в испытании. Следует использовать по восемь повторностей для обработанной и контрольной почвы.

8.6 Продолжительность испытаний и измерения

8.6.1 Регистрируют любые различия, наблюдаемые в поведении и морфологии клещей в контрольных и обработанных сосудах.

8.6.2 На 14 сут выживших клещей выделяют из почвы с помощью тепловой/световой обработки или другим подходящим способом (см. приложение D). Подсчитывается отдельно количество неполовозрелых особей (т. е. личинок, протонимф и дейтонимф) и взрослых особей. Все взрослые клещи, не обнаруженные на момент учета результатов, расцениваются как мертвые, полагая, что такие клещи пали и разложились до начала оценки. Эффективность выделения следует проверять один или два раза в год в контрольной группе с известным количеством взрослых и неполовозрелых клещей. В среднем эффективность должна быть более 90 % для всех стадий развития (см. приложение D). Количество взрослых и неполовозрелых особей не корректируется с учетом эффективности.

9 Данные и отчет о проведении испытания

9.1 Обработка результатов

9.1.1 Информация по статистическим методам, которые можно использовать для анализа результатов испытаний, приведена в 9.1.4—9.1.6.2. Кроме того, следует принять во внимание документ ОЭСР 54 «Современные подходы к статистическому анализу экотоксичности: руководство к применению».

9.1.2 Основной конечной точкой испытания является репродуктивная активность, в данном случае число неполовозрелых особей в пересчете на каждый параллельный испытуемый сосуд (с 10 внесенными взрослыми самками). Для статистического анализа требуется среднее арифметическое (X) и дисперсия (s^2) для репродуктивной активности на каждую обработку и контроль. X и s^2 используются для методов ANOVA, таких как *t*-критерий Стьюдента, критерий Даннета или критерий Вильямса, а также для вычисления 95%-ной доверительной вероятности интервалов.

Примечание — Эта основная конечная точка эквивалентна фертильности, определенной как количество живых неполовозрелых особей, полученных в ходе испытания, деленное на число самок, внесенных в начале испытания.

9.1.3 Число выживших самок в необработанных контрольных сосудах является основным критерием достоверности, и он должен быть зарегистрирован. Как и в исследовании по определению диапазона предельных концентраций, в заключительном отчете приводят все другие признаки негативного воздействия испытуемого вещества.

9.1.4 EC_x

EC_x-значения, включая связанные с ними нижние и верхние 95%-ные пределы доверительного интервала для параметра, описанного в 9.1.2, вычисляют с использованием соответствующих статистических методов (например, пробит-анализа, логистического распределения или распределения Вейбулла, усеченного метода Спирмена — Карбера или простой интерполяцией). EC_x рассчитывают, подставляя значение, соответствующие x % средних значений в контроле в найденное уравнение. Для вычисления EC_{50} или любой другой EC_x средние значения обработки (x) должны быть подвергнуты регрессионному анализу.

9.1.5 NOEC/LOEC

9.1.5.1 Если статистический анализ предназначен, чтобы определить NOEC/LOEC, то необходима статистика на сосуд (отдельные сосуды рассматриваются в качестве повторностей). Используют подходящие статистические методы (в соответствии с документом ОЭСР 54 на «Современные подходы к статистическому анализу экотоксичности: руководство к применению»). В общем, отрицательные эффекты испытуемого объекта по сравнению с контролем исследуются с помощью односторонней (более короткой) проверки гипотезы при $p \leq 0,05$. Примеры приведены в следующих пунктах.

9.1.5.2 Нормальное распределение данных можно проверить, например, с помощью критерия согласия Колмогорова — Смирнова, соотношения «диапазон — стандартное отклонение (R/S-тест)» или критерия Шапиро — Уилка (двустороннего, $p \leq 0,05$). Критерий Кохрана, критерий Левена или критерий Бартлетта (двусторонние, $p \leq 0,05$) могут использоваться для оценки однородности дисперсии. Если требования параметрических процедур испытания (нормальность, однородность дисперсии) выполняются, то проводят однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и последующие многократные сравнительные критерии. Множественное сравнение (например, *t*-критерий Даннета) или понижающий тренд испытаний (например, критерий Вильямса в случае монотонной зависимости «доза — эффект») используют для того, чтобы вычислить, существуют ли значительные различия ($p \leq 0,05$) между контролями и различными концентрациями испытуемого вещества (выбор рекомендуемого теста в соответствии с документом ОЭСР 54 на «Современные подходы к статистическому анализу экотоксичности: руководство к применению»). В противном случае используют непараметрические методы (например, *U*-критерий Бонферрони согласно Холму или Джонкхиеру — Терпстру критериям тренда) для определения NOEC и LOEC.

9.1.6 Определение диапазона предельных концентраций

9.1.6.1 Если проведено определение предельных концентраций (сравнение контроля и только одной обработки) и выполняются требования для параметрических методов испытания (нормальность, однородность), то метрические отклики оцениваются с помощью критерия Стьюдента (*t*-критерий). Неодинаковая дисперсия, *t*-критерий (*t*-критерий Уэлча) или непараметрический критерий, например *U*-критерий Манна — Уитни, используются, если данные требования не будут выполнены.

9.1.6.2 Для определения значимых различий между контролями (контроль и контроль на растворитель) повторности каждого контроля проверяют, как описано для определения диапазона предельных концентраций. Если существенные различия не выявляются, то все повторности контроля и контроля растворителя можно объединить. В противном случае все обработки следует сравнивать с контролем на растворитель.

9.2 Отчет о проведении испытания

Отчет о проведении испытания должен включать в себя следующую информацию.

9.2.1 Испытуемое вещество:

- идентификация испытуемого вещества, наименование, партия, серия и CAS-номер, чистота;
- физико-химические свойства испытуемого вещества [например, log K_{ow}, растворимость в воде, давление пара, постоянная Генри (H) и предпочтительно информация о поведении исследуемого вещества в почве].

9.2.2 Тестовые организмы:

- идентификация и поставщик тестовых организмов, описание условий культивирования;
- возраст тестовых организмов.

9.2.3 Условия испытания:

- описание дизайна и методов, используемых в эксперименте;
- подробная информация о подготовке почвы к испытанию;
- подробная спецификация, если используется природная почва (источник, описание, распределение частиц по размеру, pH, содержание органического вещества и при возможности классификация почвы);
- максимальная водоудерживающая способность почвы;
- описание метода, используемого для внесения испытуемого вещества в почву;
- сведения о вспомогательных веществах, используемых для внесения испытуемого вещества;
- размер испытуемых сосудов и сухая масса испытуемой почвы на сосуд;
- условия испытания: интенсивность света, продолжительность циклов «свет — темнота», температура;

- описание режима кормления, тип и количество корма, используемого в испытании, график кормления;
- pH и содержание воды в почве в начале и конце испытания (контроль и каждая обработка);
- подробное описание метода экстракции и эффективности экстракции.

9.2.4 Результаты испытания:

- число неполовозрелых, определенных в каждом испытуемом сосуде в конце испытания;
- число взрослых самок и смертность взрослых особей (в процентах) в каждом испытуемом сосуде в конце испытания;
- описание наблюдаемых симптомов или отдельных изменений в поведении;
- результаты, полученные с эталонным испытуемым веществом;
- сводные статистические данные (EC_x и/или NOEC), включая 95%-ную доверительную вероятность интервалов и описание метода расчета;
- график зависимости «доза — эффект»;
- отклонения от процедур, описанных в настоящем стандарте, и любых необычных происшествий (редких явлений) во время испытания.

Приложение А
(рекомендуемое)

Определение максимальной водоудерживающей способности почвы

Приведенный метод определения максимальной водоудерживающей способности почвы является подходящим. Он описан в приложении С [23].

Отбирают определенное количество (например, 5 г) испытуемого почвенного субстрата с помощью подходящего устройства для отбора проб (шнековое устройство и т. п.). Дно пробирки покрывают кусочком фильтровальной бумаги, смоченной водой, и затем пробирку помещают на стойку водяной бани. Пробирку постепенно погружают в баню, пока уровень воды не будет выше поверхности почвы. Затем пробирку оставляют в воде примерно на 3 ч. Поскольку не вся вода поглощается почвенными капиллярами, проводят дренаж пробы почвы в течение 2 ч, поместив пробирку на слой очень тонко измельченного мокрого кварцевого песка, находящегося в закрытом сосуде (для предупреждения высыхания). Затем пробу взвешивают, высушивают до постоянной массы при температуре 105 °С. Водоудерживающую способность *WHC* рассчитывают по следующей формуле

$$WHC, \text{ \% сухой массы, } = \frac{S - T - D}{D} \cdot 100,$$

где S — насыщенный водой субстрат плюс масса пробирки плюс масса фильтровальной бумаги;
T — масса тары (масса пробирки плюс масса фильтровальной бумаги);
D — сухая масса субстрата.

Приложение В
(рекомендуемое)

Определение pH почвы

Приведенный ниже метод определения pH почвы основан на описании, приведенном в [16].

Определенное количество почвы высушивают при комнатной температуре в течение не менее 12 ч. Затем готовят суспензию почвы (содержащую не менее 5 г почвы) в пять раз большем объеме 1 М раствора хлорида калия (KCl) ч. д. а. или 0,01 М раствора хлорида кальция ($CaCl_2$) ч. д. а. После этого суспензию тщательно встряхивают в течение 5 мин, затем оставляют для осаждения не менее чем на 2 ч, но не более чем на 24 ч. Затем измеряют pH жидкой фазы с помощью pH-метра, откалиброванного перед каждым измерением с помощью соответствующих буферных растворов (например, pH 4,0 и 7,0).

Приложение С
(рекомендуемое)

Культивирование амбарных клещей *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* и синхронизация культуры

Культивирование *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Культуры могут содержаться в пластиковых сосудах или стеклянных банках, заполненных смесью гипса/угольного порошка (9:1). При необходимости гипс увлажняют добавлением нескольких капель дистиллированной или деионизированной воды. Оптимальная температура культивирования составляет (20 ± 2) °С, цикл «свет — темнота» не важен для этого вида. Кормовым объектом могут быть клещи *Typrophagus putrescentiae* или *Caloglyphus sp.* (с амбарными клещами следует обращаться с осторожностью, поскольку они могут вызвать аллергию у людей), но также в качестве корма подходят нематоды, энхитреиды и коллемболы. Их источники регистрируют. Развитие популяции начинается с одной самки, поскольку самцы развиваются в неоплодотворенных яйцах. Поколения в основном перекрываются. Самка живет не менее 100 сут и за время своего существования может отложить примерно 100 яиц. Максимальный уровень яйцекладки имеет место в период между 10—40 сут (после развития до взрослой стадии) и составляет 2,2 яйца самка$^{-1}$/день$^{-1}$. Время развития от яйца до взрослой самки равняется примерно 20 сут при температуре 20 °С. Следует поддерживать и хранить заранее более чем одну культуру.

Культивирование *Typrophagus putrescentiae*

Клещей содержат в стеклянном сосуде, заполненном мелким порошком пивных дрожжей, который помещают в пластмассовое ведро, заполненное раствором KNO_3 во избежание выхода насекомых. Амбарных клещей помещают поверх порошка. Затем их тщательно перемешивают с порошком (который меняют два раза в неделю) с помощью шпателя.

Синхронизация культуры

Клещи, используемые в испытании, должны быть одинакового возраста (около 7 сут после достижения взрослой стадии). При температуре 20 °С культивирование проводится следующим образом:

- самок переносят в чистый культуральный сосуд и добавляют достаточное количество корма;
- после кладки яиц в течение 2—3 сут самок удаляют;
- для испытания отбирают взрослых самок на 28—35 сут после внесения взрослых самок в чистые сосуды для культивирования.

Взрослых самок можно легко отличить от самцов и других стадий развития по их крупному размеру, раздутой форме и коричневому спинному панцирю (самцы меньше и плоские), неполовозрелые особи — бело-кремового цвета. Развитие клещей при температуре 20 °С происходит по схеме, приведенной ниже (см. рисунок С.1): яйцо — 5 сут, личинка — 2 сут, протонимфа — 5 сут, дейтонимфа — 7 сут, период перед яйцекладкой у самок — 2 сут. Затем клещи — взрослые.

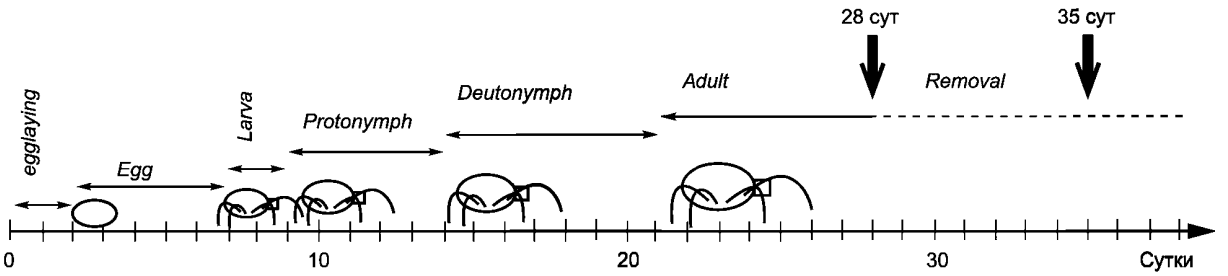


Рисунок С.1 — Развитие *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* при температуре 20 °С

Испытуемых взрослых самок извлекают из синхронной культуры и вносят в испытуемые сосуды на 28 и 35 сут после начала яйцекладки самками (т. е. 7—14 сут после достижения взрослой стадии). Такая процедура гарантирует, что тестовые организмы уже прошли период перед яйцекладкой и были оплодотворены самцами, которые также находятся в культуральном сосуде. На основе наблюдений за лабораторными культурами можно предположить, что самки спариваются сразу или вскоре после развития до взрослых особей, если присутствуют самцы (Ruf, Vaninnen, pers. obs.). Период 7 сут выбран для упрощения внедрения метода в лабораторную практику и для нивелирования индивидуальных различий в развитии в популяции клещей. Яйцекладка начинается с такого же количества самок, какое в конечном итоге требуется (если, например, для испытания требуется 400 самок, то не менее чем 400 самок откладывают яйца в течение 2—3 сут). Не менее 1200 яиц должны быть отправной точкой для синхронной популяции (соотношение полов примерно 0,5; смертность примерно 0,2). Для предотвращения каннибализма целесообразно, чтобы в одном сосуде находилось не более 20—30 самок, откладывающих яйца.

Приложение D
(рекомендуемое)

Методы выделения

Для микрочленистоногих выделение на основе тепловой обработки является подходящим методом для выделения насекомых из почвы/субстрата (см. рисунок D.1). Метод основан на активности организмов, поэтому регистрации поддаются только движущиеся особи. Принцип выделения с тепловым воздействием заключается в постепенном ухудшении условий для организмов в пробе, что заставляет их покинуть субстрат, и в результате они попадают в фиксирующую жидкость (например, этанол). Определяющими факторами являются продолжительность выделения и переход условий от хороших или умеренных к плохим. Продолжительность выделения в экотоксикологических тестах должна быть как можно более короткой, потому что любой прирост популяции во время выделения приводит к получению ложных результатов. С другой стороны, температура и содержание влаги в пробе всегда должны находиться в диапазоне, который позволяет клещам двигаться. Нагревание образца почвы приводит к высыханию субстрата. Если высыхание происходит слишком быстро, то некоторые клещи также могут высохнуть, прежде чем они сумеют выйти из субстрата.

Таким образом, предлагается следующая процедура [24], [25].

Оборудование: аппарат Туллгрена или использование аналогичных устройств, таких как, например, McFadyen (нагрев сверху, образец помещают на воронку) (рисунок D.1).

Режим нагревания: 25 °С в течение 12 ч, 35 °С в течение 12 ч, 45 °С в течение 24 ч (в общем — 48 ч). Измеряют температуру в субстрате.

Фиксирующая жидкость: 70%-ный этанол.

Подробное описание: берут стеклянный сосуд, который использовали для испытания. Снимают крышку и отверстие обертывают куском сетки или ткани. Ткань должна иметь размер отверстий в диапазоне от 1,0 до 1,5 мм. Ткань закрепляют резинкой. Осторожно переворачивают сосуд вверх дном и помещают его в устройство для выделения. Ткань предотвращает попадание субстрата в фиксирующую жидкость, но позволяет клещам покинуть пробу. Начинают режим нагревания после установки всех сосудов. Выделение завершают через 48 ч. Удаляют зафиксированные сосуды и подсчитывают количество клещей с помощью препаровальной лупы (рисунок D.2).

Эффективность выделения выбранного метода подтверждают один или два раза в год с использованием сосудов, содержащих известное количество неполовозрелых особей и взрослых клещей, находящихся в необработанном испытуемом субстрате. Эффективность в среднем должна составлять не менее 90 % для всех стадий развития клещей.



Рисунок D.1 — Устройство для выделения типа Туллгрена

Подготовка испытуемого сосуда после окончания испытания перед выделением клещей приведена на рисунке D.2.

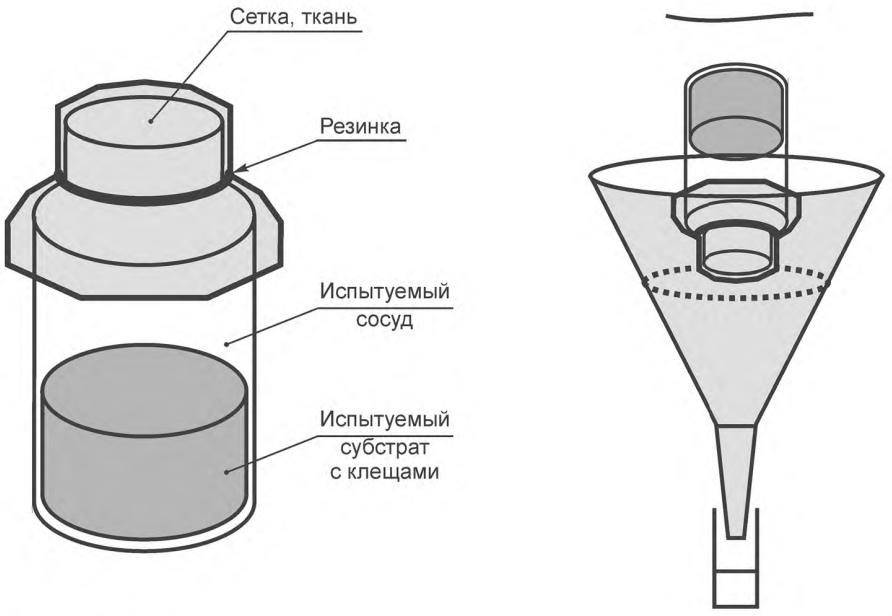


Рисунок D.2 — Подготовка испытуемого сосуда после окончания испытания перед выделением клещей

Приложение Е
(рекомендуемое)

Идентификация Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

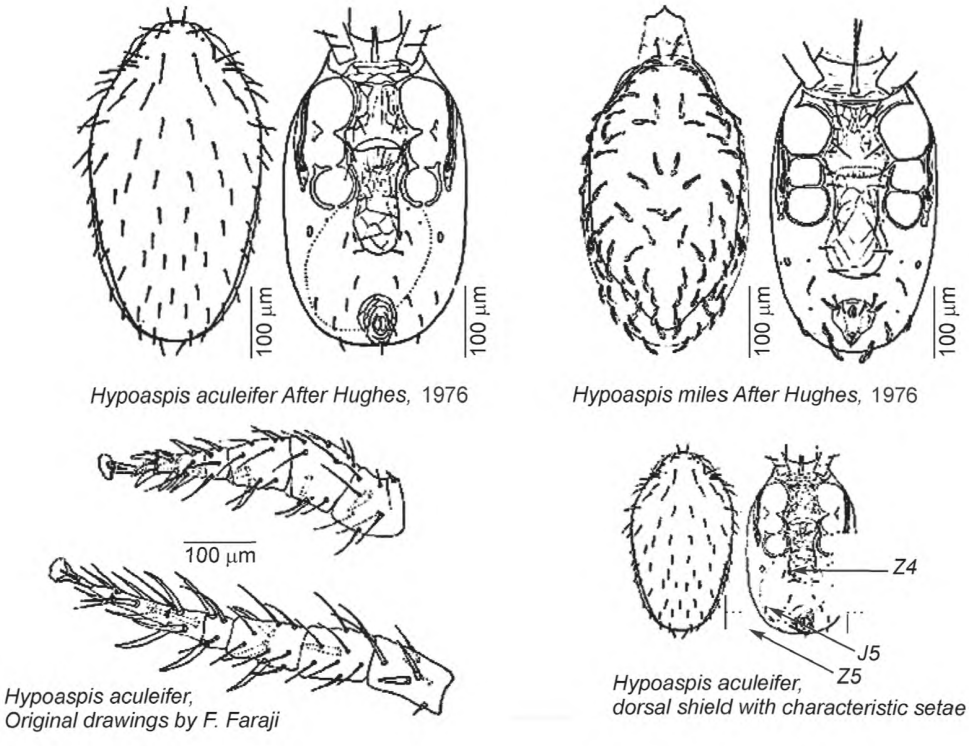
Подкласс/подотряд/отряд — Acari/Parasitiformes/Gamasida.
Семейство — Laelapidae.
Род/подрод/вид — Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer.
Автор и дата: F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 января 2007 г.

Использованная литература

Karg W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1—523.
Hughes A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 pp.
Krantz G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

Детерминированные характеристики (рисунок Е.1)

Тектум с округленными зазубренными краями; гипостомальные желобки более чем с шестью зубчиками; задние спинные щетинки Z4 не очень длинные; щетинообразные спинные щетинки; генитальный панцирь нормальный, не очень расширенный и не достигающий анального панциря; задняя половина спинного панциря без непарных щетинок; ноги II и IV с небольшим количеством толстых макрощетинок; спинные щетинки Z5 примерно в два раза длиннее, чем J5; фиксированные щупальца хелицеры с 12—14 зубчиками и движущиеся щупальца с двумя зубчиками; идиосома 520—685 в длину.
Hypoaspis miles также используется в биологическом контроле и может быть перепутан с *H. aculeifer*. Основное различие заключается в том, что *H. miles* принадлежит к подроду *Cosmolaelaps* и имеет кинжалоподобные спинные щетинки, в то время как *H. aculeifer* принадлежит к подроду *Geolaelaps* и имеет щетинообразные спинные щетинки.



Hypoaspis aculeifer After Hughes, 1976

Hypoaspis miles After Hughes, 1976

Hypoaspis aculeifer,
Original drawings by F. Faraji

Hypoaspis aculeifer,
dorsal shield with characteristic setae

Рисунок Е.1 — Детерминированные характеристики

Приложение F
(рекомендуемое)

Общая информация по биологии *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer относится к семейству *Lealapidae*, отряду *Acari* (клещи), классу *Arachnida*, типу *Arthropoda*. Они обитают в почве всех видов и питаются другими клещами, нематодами, энхитреидами и коллемболами [26]. В случае нехватки корма они переключаются на каннибализм [27]. Тело хищных клещей подразделяется на идиосому и гнатосому. Четкое отделение идиосомы от просомы (головки) и опистосомы (брюшка) отсутствует. Гнатосома (головной панцирь) содержит аппарат для питания, такой как щупальца и хелицеры. Хелицеры являются разветвленными в трех направлениях и выступающими с зубчиками разной формы. Помимо захвата корма самцы используют свои хелицеры преимущественно для переноса сперматофор самкам. Спинной панцирь покрывает почти полностью идиосому. Большую часть идиосомы у самок занимают репродуктивные органы, которые хорошо различимы, в особенности незадолго до яйцекладки. В брюшке находятся два панциря, грудной и генитальный. Все конечности снабжены щетинками и шипами. Щетинки служат для закрепления при перемещении внутри или на поверхности почвы. Первая пара конечностей в основном используется в качестве антенны. Вторая пара конечностей используется не только для движения, но и для захватывания корма. Шипы четвертой пары конечностей могут служить защитой, а также в качестве «движущегося мотора» [28]. Самцы имеют длину от 0,55 до 0,65 мм и массу от 10 до 15 мкг. Самки имеют длину от 0,8 до 0,9 мм и массу от 50 до 60 мкг [8], [28] (см. рисунок F.1).

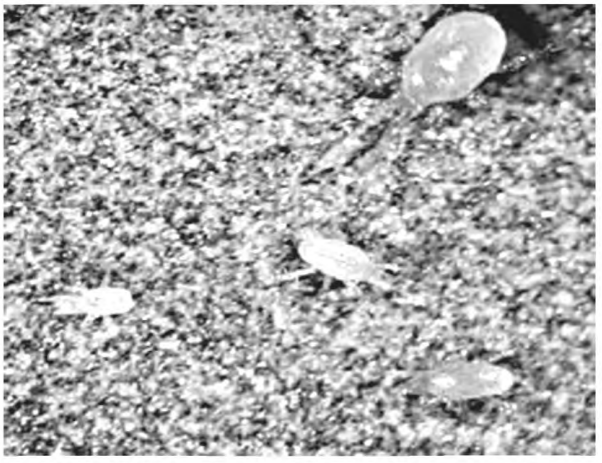


Рисунок F.1 — Самка, самец, протонимфа и личинка *H. aculeifer*

При температуре 23 °С клещи становятся половозрелыми через 16 сут (самки) и 18 сут (самцы) соответственно [6]. Самки переносят сперматозоиды соленостомом, где они затем переходят в яичник. В яичнике сперматозоиды созревают и хранятся. Оплодотворение происходит только после созревания сперматозоидов в яичнике. Оплодотворенные или неоплодотворенные яйца сохраняются у самок в виде сгустков или по отдельности, предпочтительно в расщелинах или отверстиях. Спарившиеся самки могут продуцировать неполовозрелые особи обоего пола, в то время как из яиц неспарившихся самок вылупляются только неполовозрелые самцы. Развитие до взрослой стадии проходит в четыре стадии (яйцо — личинка, личинка — протонимфа, протонимфа — дейтонимфа, дейтонимфа — взрослая особь).

Яйцо — молочно-белого цвета, гиалиновое, эллиптической формы и длиной примерно 0,37 мм с твердой мантией. Согласно [8] личинки имеют размер от 0,42 до 0,45 мм. У них имеется только три пары конечностей. В области головки развиваются щупальца и хелицеры. Хелицеры, имеющие несколько небольших зубчиков, используются для вылупления из яйца. После первой линьки на 1—2-е сут после вылупления развиваются протонимфы. Они также белые, размерам от 0,45 до 0,62 мм [8] и имеют четыре пары конечностей. На хелицерах полностью присутствуют зубчики. Именно с этой стадии клещи начинают добывать корм. Для этого кутикула жертвы прокалывается хелицерами, и секрет для дополнительного кишечного пищеварения вспрыскивается в добычу. Затем мягкая кормовая масса может всасываться клещом. Также хелицеры могут использоваться для разделения более крупных частиц в пищевых комках [28]. После следующей линьки развиваются дейтонимфы. Они имеют размер от 0,60 до 0,80 мм [8] и цвет от желтого до светло-коричневого. Начиная с этой стадии их можно разделить на самок и самцов. После еще одной линьки клещи становятся взрослыми, в течение этого периода они неактивны, и у них образуется коричневый панцирь (приблизительно через 14 сут) [28]—[30]. Продолжительность жизни клещей составляет от 48 до 100 сут при температуре 25 °С [27].

Приложение G
(рекомендуемое)

Краткое описание и временной график основных действий, которые следует выполнить для проведения испытания на *Hypoaspis*

Таблица G.1

Срок (начало испытания) — сут 0, сут	Деятельность/задача
Сутки — 35 до — 28	Переносят самок из маточной культуры в чистые сосуды для синхронизации. Через 2 сут: удаление самок. Два или три раза в неделю: кормление с обеспечением достаточного количества корма
Сутки — 5 (+/–2)	Подготовка искусственной почвы
Сутки — 4 (+/–2)	Определяют *WHC* искусственной почвы. Высушивают в течение ночи. На следующие сутки: взвешивают образцы и рассчитывают *WHC*
Сутки — 4 (+/–2)	Предварительное увлажнение искусственной почвы для достижения от 20 % до 30 % *WHC*
Сутки 0	Начало испытаний: вносят испытуемое вещество в искусственную почву. Вносят 10 самок в каждую повторность. Взвешивают каждую повторность. Устанавливают абиотические контроли для определения содержания влаги и pH, две повторности для каждой обработки. Высушивают контроли, предназначенные для определения влажности, в течение ночи. На следующие сутки: взвешивают контроли, предназначенные для определения влажности. На следующие сутки: измеряют pH высушеных абиотических контролей
Сутки 3, 6, 9, 12 (приблизительно)	В каждую повторность вносят достаточное количество кормового объекта. Взвешивают каждую повторность и добавляют воду для компенсации испарившейся воды
Сутки 14	Завершают испытание, проводят выделение во всех повторностях плюс контроль для определения эффективности выделения. Высушивают контроли, предназначенные для определения влажности, в течение ночи. На следующие сутки: взвешивают контроли, предназначенные для определения влажности. На следующие сутки: измеряют pH высушеных абиотических контролей
День 16	Конечное выделение
День 16+	Регистрируют число взрослых клещей и неполовозрелых особей, находящихся в выделенном материале. Регистрируют результаты в таблицах. Документируют проведение испытания в протоколе испытания

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа OECD, Test No. 226:2008	
Раздел	Подраздел	Пункты	Раздел	Пункты
1	1.1	—	1	—
	1.2	—	2	—
2	2.1	—	1	—
	2.2	—	Приложение 1	—
	2.3	—	Приложение 1	—
	2.4	—	Приложение 1	—
3	—	—	3	—
4	4.1	—	4	—
	4.2	—	5	—
5	—	—	6	—
6	—	—	7	—
7	7.1	—	—	—
	7.1.1	—	8	—
	7.1.2	—	9	—
	7.2	—	—	—
	7.2.1	—	10	—
	7.2.2	—	11	—
	7.2.3	—	12	—
	7.2.4	—	13	—
	7.3	—	14	—
	7.4	—	—	—
	7.4.1	—	15	—
	7.4.2	—	16	—
	7.4.3	—	17	—
	7.4.4	—	18	—
8	8.1	—	—	—
	8.1.1	—	19	—
	8.1.2	—	20	—
	8.1.3	—	21	—
	8.2	—	—	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа OECD, Test No. 226:2008	
Раздел	Подраздел	Пункты	Раздел	Пункты
8	8.2.1	—	22	—
	8.2.2	—	23	—
	8.2.3	—	24	—
	8.3	—	—	—
	8.3.1	—	25	—
	8.3.2	—	26	—
	8.4	—	27	—
	8.5	—	—	—
	8.5.1	—	—	—
	8.5.1.1	—	28	—
	8.5.1.2	—	29	—
	8.5.2	—	30	—
	8.6	—	—	—
	8.6.1	—	31	—
	8.6.2	—	32	—
9	9.1	—	—	—
	9.1.1	—	33	—
	9.1.2	—	34	—
	9.1.3	—	35	—
	9.1.4	—	36	—
	9.1.5	—	—	—
	9.1.5.1	—	37	—
	9.1.5.2	—	38	—
	9.1.6	—	—	—
	9.1.6.1	—	39	—
	9.1.6.2	—	40	—
	9.2	—	41	—
Приложение A			Приложение 2	
Приложение B			Приложение 3	
Приложение C			Приложение 4	
Приложение D			Приложение 5	
Приложение E			Приложение 6	
Приложение F			Приложение 7	
Приложение G			Приложение 8	
Библиография			Литература	

Библиография

[1] Casanueva M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21—46

[2] Tenorio J.M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259—274

[3] Bakker F.M., Feije R., Grove A.J., Hoogendorn G., Jacobs G., Loose E.D. and van Stratum P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73—77

[4] Karg W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

[5] Ruf A. (1991). Do females eat males? : Laboratory studies on the popualation development of Hypoaspis aculeifer (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487—492

[6] Ruf A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p. 241—249

[7] Ruf. A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p. 621—628

[8] Krogh P.H. and Axelsen J.A. (1998). Test on the predatory mite Hypoaspis aculeifer preying on the collembolan Folsomia fimetaria. In: Lokke H. and van Gestel C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p. 239—251

[9] Lokke H., Janssen C.R., Lanno R.P., Römbke J., Rundgren S. and Van Straalen N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother A., Glazebrook P.W., Van Straalen N.M. and Tarazona J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

[10] Schlosser H.-J. and Riepert F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395—433

[11] Schlosser H.-J. and Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413—433

[12] Heckmann L.-H., Maraldo K. and Krogh P.H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154—7157

[13] Petersen H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95—122

[14] ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve

[15] OECD (1984). Guideline for testing of chemicals. No 207. Earthworm acute toxicity tests. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris

[16] EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195—209

[17] ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve

[18] Fairbrother A., Glazebrock P.W., Van Straalen N.M. and Tarazona J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA

[19] Chi H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges. allg. angew. Ent. 3:122—125

[20] Schlosser H.J., und Riepert F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool. Beitr. N.F. 34(3):395—433

[21] Heckmann L.-H., Ruf A., Nienstedt K.M. and Krogh P.H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130—135

[22] OECD (2004). Guidelines for the testing of chemicals. No. 220. Enchytraeid reproduction test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris

[23] ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve

[24] Southwood T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

[25] Dunger W. and Fiedler H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

[26] Lesna I. and Sabelis M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with “good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581—583

[27] Ruf A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103—107

[28] Ruf A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen

[29] Ignatowicz S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11—59

[30] Kevan D.K. McE. and Sharma G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina : Mesostigmata : Laelaptidae). Acarologia 6, 647—658

УДК 658.382.3:006.354 МКС 13.020.01 MOD

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, хищные клещи, репродуктивная активность, почва

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Л.В. Софейчук*

Сдано в набор 31.05.2019. Подписано в печать 29.07.2019. Формат $60 \times 84^{1}/_{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,54.

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