



中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.13—2014

化学农药环境安全评价试验准则 第 13 部分：溞类急性活动抑制试验

Test guidelines on environmental safety assessment for chemical pesticides—
Part 13: *Daphnia* sp. acute immobilisation test

2014-10-10 发布

2015-03-11 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

GB/T 31270《化学农药环境安全评价试验准则》分为 21 个部分：

- 第 1 部分：土壤降解试验；
- 第 2 部分：水解试验；
- 第 3 部分：光解试验；
- 第 4 部分：土壤吸附/解吸试验；
- 第 5 部分：土壤淋溶试验；
- 第 6 部分：挥发性试验；
- 第 7 部分：生物富集试验；
- 第 8 部分：水-沉积物系统降解试验；
- 第 9 部分：鸟类急性毒性试验；
- 第 10 部分：蜜蜂急性毒性试验；
- 第 11 部分：家蚕急性毒性试验；
- 第 12 部分：鱼类急性毒性试验；
- 第 13 部分：溞类急性活动抑制试验；
- 第 14 部分：藻类生长抑制试验；
- 第 15 部分：蚯蚓急性毒性试验；
- 第 16 部分：土壤微生物毒性试验；
- 第 17 部分：天敌赤眼蜂急性毒性试验；
- 第 18 部分：天敌两栖类急性毒性试验；
- 第 19 部分：非靶标植物影响试验；
- 第 20 部分：家畜短期饲喂毒性试验；
- 第 21 部分：大型甲壳类生物毒性试验。

本部分是 GB/T 31270 的第 13 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由中华人民共和国农业部提出并归口。

本部分负责起草单位：农业部农药检定所、环保部南京环境科学研究所。

本部分主要起草人：蔡磊明、王晓军、陈丽萍、卜元卿、姜辉、王成菊、查金苗、安雪花。

化学农药环境安全评价试验准则

第 13 部分: 溞类急性活动抑制试验

1 范围

GB/T 31270 的本部分规定了溞类急性活动抑制试验的材料、条件、操作、质量控制、数据处理、试验报告等的基本要求。

本部分适用于为化学农药登记而进行的溞类急性活动抑制试验,其他类型的农药可参照使用。

本部分不适用于易挥发和难溶解的化学农药。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

半数抑制浓度 median effective concentration

在急性活动抑制试验中,引起 50% 供试生物活动受抑制时的供试物浓度,用 EC_{50} 表示。

注: 单位为 mg a.i./L。

2.2

活动抑制 immobilisation

轻晃试验容器,溞在 15 s 内不能游动视为活动抑制,但允许附肢微弱活动。

2.3

供试物 test substance

试验中需要测试的物质。

2.4

化学农药 chemical pesticide

利用化学物质人工合成的农药。其中有些以天然产品中的活性物质为母体,进行仿制、结构改造,创新而成,为仿生合成农药。

同义词: 有机合成农药 synthetic organic pesticide。

[NY/T 1667.1—2008, 定义 2.3.1]

2.5

原药 technical material

在制造过程中得到的有效成分及杂质组成的最终产品,不能含有可见的外来物质和任何添加物,必要时可加入少量的稳定剂。

[NY/T 1667.2—2008, 定义 2.5.1]

2.6

制剂 formulation product

由农药原药(或母药)和助剂制成使用状态稳定的产品。

[NY/T 1667.2—2008, 定义 2.4]

2.7

有效成分 active ingredient; a.i.

农药产品中具有生物活性的特定化学结构成分。

[NY/T 1667.2—2008, 定义 3.1]

2.8

参比物质 reference substances

在测试中为证实或否定供试物的某种特性或判断测试系统有效性而使用的化学物质或混合物。

3 试验概述

用供试物配制一系列不同浓度的试验药液,然后将试验用蚤转移至试验药液中,连续 48 h 观察试验用蚤的中毒症状与活动受抑制情况,并求出 48 h 的 EC_{50} 值以及 95% 置信限。

4 试验方法

4.1 材料和条件

4.1.1 供试生物

推荐使用大型蚤(*Daphnia magna* Straus),保持良好的培养条件,使大型蚤的繁殖处于孤雌生殖状态。选用实验室条件下培养 3 代以上、出生 24 h 内的非头胎蚤。试验用蚤应是来源于同一母系的健康蚤,即未表现任何受胁迫现象(如:死亡率高、出现雄蚤和冬卵、头胎延迟、体色异常等)。

4.1.2 供试物

供试物应使用农药制剂、原药或纯品。对难溶于水的农药,可用少量对蚤类低毒的有机溶剂助溶,有机溶剂用量一般不得超过 0.1 mL(g)/L。

4.1.3 参比物质

参比物质为重铬酸钾(分析纯以上)。

4.1.4 主要仪器设备

主要仪器设备如下:

- 溶解氧测定仪;
- pH 计;
- 水质硬度测定仪;
- 电子天平;
- 移液器;
- 玻璃或其他化学惰性材料制成的容器等。

4.1.5 试验用水

蚤类的培养、驯化及试验推荐使用重组水,若选择其他水应符合附录 A 的规定。重组水推荐使用 ISO 标准稀释水、Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液,配制方法参见附录 B。Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液不能用于含有金属受试物的测试。试验期间水质应保持稳定,满足 pH 为 6.0~9.0,溶解氧 ≥ 3.0 mg/L。对于大型蚤,水质硬度(以 $CaCO_3$ 计)为 140 mg/L~250 mg/L,对于其他蚤类,可

适当降低水质硬度。

4.1.6 试验条件

试验水温 18 ℃~22 ℃,同一试验中,温度变化应控制在±1 ℃之内;光照周期(光暗比)为 16 h:8 h,或全黑暗条件(尤其对光不稳定的供试物)。试验期间试验容器中不应充气和调节 pH,不得喂食受试蚤。

4.2 试验操作

4.2.1 预试验

按正式试验的条件,先将蚤类暴露于较大范围浓度系列的试验药液中 48 h,每一浓度放 5 只幼蚤,可不设重复,以确定正式试验的浓度范围。

4.2.2 正式试验

在预试验确定的浓度范围内按一定比例间距(几何级差应控制在 2.2 倍以内)设置至少 5 个浓度组,并设空白对照组,如使用溶剂助溶应设溶剂对照组。每个浓度和对照均设 4 个重复,每个重复至少 5 只试验用蚤,承载量为每只蚤不小于 2 mL。如果试验浓度少于 5 个,应在报告中给予合理解释。试验开始后 24 h、48 h 定时观察、记录每个容器中试验用蚤活动受抑制数和任何异常症状或表现。

4.2.3 限度试验

设置上限浓度 100 mg a.i./L,即在供试物达 100 mg a.i./L 时受试蚤抑制率不超过 10%,则无需继续试验;否则需进行正式试验。如供试物溶解度小于 100 mg a.i./L,则采用最大溶解度作为上限浓度。

4.2.4 参比物质试验

为检验实验室的设备、条件、方法及供试生物的质量是否合乎要求,设置参比物质作方法学上的可靠性检验。应定期(至少每季度一次)进行参比物质试验。参比物质为重铬酸钾。

4.2.5 操作要求

试验操作及试验过程中蚤不能离开水,转移时要用玻璃滴管。

4.3 数据处理

4.3.1 统计分析方法的选择

可采用寇氏法、直线内插法或概率单位图解法计算每一观察时间(24 h、48 h)的蚤类半抑制浓度 EC_{50} ,也可采用相关统计学软件进行数据分析和计算。

4.3.2 寇氏法

用寇氏法可求出蚤类在 24 h 和 48 h 的 EC_{50} 值及 95% 置信限。

EC_{50} 的计算见式(1):

$$\log EC_{50} = X_m - i(\sum P - 0.5) \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_m ——最高浓度的对数;

i ——相邻浓度比值的对数;

$\sum P$ ——各组抑制率的总和(以小数表示)。

95%置信限的计算见式(2):

$$95\% \text{ 置信限} = \log EC_{50} \pm 1.96 S \log EC_{50} \dots\dots\dots (2)$$

标准误的计算见式(3):

$$S \log EC_{50} = i \sqrt{\sum \frac{pq}{n}} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- p —— 1 个组的抑制率;
- q —— $1 - p$;
- n —— 各浓度组蚤的数量。

4.3.3 直线内插法

采用线性刻度坐标,绘制抑制百分率对试验物质浓度的曲线,求出 50%活动抑制时的 EC_{50} 值。

4.3.4 概率单位图解法

用半对数纸,以浓度对数为横坐标、抑制百分率对应的概率单位为纵坐标绘图。将各实测值在图上用目测法画一条相关直线,从直线中读出活动抑制 50%的浓度对数,估算出 EC_{50} 值。

4.4 质量控制

质量控制条件包括:

- 对照组试验受抑制蚤数不超过 10%;
- 试验过程中供试物浓度不低于初始浓度的 80%;
- 在 20 °C 条件下,参比物质重铬酸钾对大型蚤的 EC_{50} (24 h) 应处于 0.6 mg/L ~ 2.1 mg/L 之间;
- 试验结束时对照组和试验组的溶解氧浓度不小于 3.0 mg/L。

5 试验报告

试验报告至少应包括下列内容:

- 供试物的信息,包括供试农药的通用名、化学名称、结构式、CAS 号、纯度、基本理化性质、来源等;
- 供试生物的名称、来源、大小及饲养情况;
- 试验条件,包括水温、光照、溶解氧、pH 及水质硬度等;
- 试验药液的浓度,试验开始后 24 h、48 h 的 EC_{50} 值及 95%置信限及中毒症状,并给出所采用的计算方法;
- 试验质量控制条件描述;
- 对蚤的毒性等级划分参见附录 C。

附 录 A
(资料性附录)
合格试验用水的部分化学特性

合格试验用水的化学特性参见表 A.1。

表 A.1 合格试验用水的部分化学特性

物 质	浓 度
颗粒物	<20 mg/L
总有机碳(TOC)	<2 mg/L
游离氨	<1 μg/L
残留氯	<10 μg/L
总有机磷农药	<50 ng/L
总有机氯农药与多氯联苯(PCB)	<50 ng/L
总有机氯	<25 ng/L

附录 B
(资料性附录)
重组水的配制

表 B.1 给出了 ISO 标准稀释水的配制方法。

表 B.1 ISO 标准稀释水

贮备液(单一物质)		每升 ISO 标准稀释水中贮备液的加入量/ mL
物质	浓度/(mg/L)	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	11 760	25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 930	25
NaHCO ₃	2 590	25
KCl	230	25

注：配制用水为纯水，如去离子水、蒸馏水或反向渗透水，其电导率 < 10 μS/cm。

表 B.2 和表 B.3 给出了 Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液的配制方法。用去离子水、蒸馏水或反向渗透水(以下均简称水)分别配制贮备液 I、贮备液 II、常量营养贮备液和混合维生素贮备液。制备 Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液时,用贮备液 I 制备贮备液 II,在使用前最后加入常量营养贮备液和混合维生素贮备液。

表 B.2 Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液的贮备液 I、贮备液 II 的配制

贮备液 I (单一物质)	浓度/(mg/L)	与 Elendt M4 培养液 的浓度关系	为制备贮备液 II 将贮备液 I 加入到水中的量/(mL/L)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 倍	1.0	0.25
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7 210	20 000 倍	1.0	0.25
LiCl · H ₂ O	6 120	20 000 倍	1.0	0.25
RbCl	1 420	20 000 倍	1.0	0.25
SrCl ₂ · 6H ₂ O	3 040	20 000 倍	1.0	0.25
NaBr	320	20 000 倍	1.0	0.25
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1 260	20 000 倍	1.0	0.25
CuCl ₂ · 2H ₂ O	335	20 000 倍	1.0	0.25
ZnCl ₂	260	20 000 倍	1.0	1.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	200	20 000 倍	1.0	1.0
KI	65	20 000 倍	1.0	1.0

表 B.2 (续)

贮备液 I (单一物质)	浓度/(mg/L)	与 Elendt M4 培养液 的浓度关系	为制备贮备液 II 将贮备液 I 加入到水中的量/(mL/L)	
			M4	M7
Na_2SeO_3	43.8	20 000 倍	1.0	1.0
NH_4VO_3	11.5	20 000 倍	1.0	1.0
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 000	2 000 倍	—	—
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 991	2 000 倍	—	—
2L Fe-EDTA 溶液	—	1 000 倍	20.0	5.0

注: Na_2EDTA 和 FeSO_4 两者单独制备,混在一起后立即灭菌。

表 B.3 Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液的配制

组分	浓度/(mg/L)	与 Elendt M4 培养液 的浓度关系	为制备 Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液,水中 加入各组分的量/(mL/L)		
			M4	M7	
贮备液 II	—	20 倍	50	50	
常量营养 贮备液 (单一物质)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000 倍	1.0	1.0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000 倍	0.5	0.5
	KCl	58 000	10 000 倍	0.1	0.1
	NaHCO_3	64 800	1 000 倍	1.0	1.0
	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000 倍	0.2	0.2
	NaNO_3	2 740	10 000 倍	0.1	0.1
	KH_2PO_4	1 430	10 000 倍	0.1	0.1
	K_2HPO_4	1 840	10 000 倍	0.1	0.1
混合维生素贮备液*	—	10 000 倍	0.1	0.1	

注: 为了避免盐沉淀,应将适量的贮备液加入到 500 mL~800 mL 水中,然后定容至 1 L。

* 混合维生素贮备液是由盐酸硫胺(维生素 B₁)、氰钴胺(维生素 B₁₂)和钙长石(维生素 H)配制而成,浓度分别为 750 mg/L、10 mg/L 和 7.5 mg/L。混合维生素贮备液应以较小分装冷藏保存。

附 录 C
(资料性附录)
农药对溞类毒性等级划分

按对溞类活动的半数抑制浓度 EC_{50} (48 h), 将农药对溞类的急性毒性分为四个等级, 见表 C.1。

表 C.1 农药对溞类的毒性等级划分

毒性等级	EC_{50} (48 h)/(mg a.i./L)
剧毒	$EC_{50} \leq 0.1$
高毒	$0.1 < EC_{50} \leq 1.0$
中毒	$1.0 < EC_{50} \leq 10$
低毒	$EC_{50} > 10$

参 考 文 献

- [1] NY/T 1667.1—2008 农药登记管理术语 第1部分:基本术语
- [2] NY/T 1667.2—2008 农药登记管理术语 第2部分:产品化学
- [3] FAO (1989).Guidelines on environmental criteria for the registration of pesticides.Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [4] OECD (2004).Guideline 202:*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- [5] Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
- [6] US EPA(1996).Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids (OCSPP 850.1010).Ecological Effects Test Guidelines.
- [7] 蔡道基.农药环境毒理学研究.北京:中国环境科学出版社,1999.
-