



中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.14—2014

化学农药环境安全评价试验准则 第 14 部分：藻类生长抑制试验

Test guidelines on environmental safety assessment for chemical pesticides—
Part 14: Alga growth inhibition 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 14 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：曲薏薏、杨亚哲、瞿唯钢、周军英、李学锋、查金苗、严海娟。

化学农药环境安全评价试验准则

第 14 部分：藻类生长抑制试验

1 范围

GB/T 31270 的本部分规定了藻类生长抑制试验的材料、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藻类生长抑制试验,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

半效应浓度 median effective concentration

在生长抑制试验中,使供试生物生物量增长或者生长率比对照下降 50% 时的供试物浓度,用 EC_{50} 表示。在本部分中,通过藻类生物量增长的抑制百分率计算而得到的半效应浓度用 E, C_{50} 表示,通过藻类生长率的抑制百分率计算而得的半效应浓度用 E, C_{50} 表示。

注:单位为 mg a.i./L。

2.2

平均生长率 average growth rate

一定暴露时间内藻类单位生物量增长的对数值,在本部分中用 μ 表示。

2.3

生物量增长 yield

一段暴露时间内藻类单位生物量的增加量,即暴露结束时的单位生物量减去暴露开始时的单位生物量,在本部分中用 Y 表示。

2.4

供试物 test substance

试验中需要测试的物质。

2.5

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]

2.6

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]

2.7

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 3.1]

2.8

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]

2.9

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

本试验用供试物配制一系列不同浓度的试验药液,然后将试验药液与藻液混合后,连续 72 h 观察试验用藻的生长抑制情况,并求出半效应浓度 EC_{50} (72 h)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

试验用藻推荐采用普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、斜生栅列藻(*Desmodesmus subspicatus*)或羊角月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)等。

4.1.2 供试物

农药制剂、原药或纯品。对难溶于水的农药,可用少量对藻毒性小的有机溶剂、乳化剂或分散剂助溶,用量不得超过 0.1 mL(g)/L。

4.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备如下:

- 酸度计;
- 血球计数板;
- 分光光度计;
- 显微镜;
- 人工气候箱;
- 高压蒸汽灭菌锅;
- 玻璃器皿等。

4.1.4 培养基

推荐选择水生 4 号培养基培养斜生栅列藻,选择 BG11 培养基培养羊角月芽藻,选择 BG11 培养基或 SE 培养基培养普通小球藻,上述培养基配方参见附录 A。若使用其他培养基应同时提供培养基名称和配方等信息;若使用其他藻种,应选择适宜的培养基,并同时提供培养基名称和配方等信息。

4.1.5 试验条件

试验环境温度 21℃~24℃(单次试验温度控制在±2℃);连续均匀光照,光照强度差异应保持在±15%范围内,光强 4 440 lx~8 880 lx。

4.2 试验操作

4.2.1 试验用藻的预培养

按无菌操作法将试验用藻接种到装有培养基的锥形瓶内,在 4.1.5 的条件下培养。每隔 96 h 接种一次,反复接种 2 次~3 次,使藻基本达到同步生长阶段,以此作为试验用藻。每次接种时在显微镜下观察,检查藻种的生长情况。

4.2.2 预试验

按正式试验的条件,以较大的间距设置若干组浓度,求出供试物使试验用藻生长受抑制的最低浓度和不受抑制的最高浓度,在此范围内设置正式试验的浓度。

4.2.3 正式试验

在预试验确定的浓度范围内以一定比例间距(几何级差应控制在 3.2 倍以内)设置 5 个~7 个浓度组,并设一个空白对照组,使用助溶剂的还应增设溶剂对照组,每个浓度组设 3 个重复。试验观察期为 72 h,每隔 24 h 取样,在显微镜下用血球计数板准确计数藻细胞数,或用分光光度计直接测定藻的吸光率。用血球计数板计数时,同一样品至少计数两次,如计数结果相差大于 15%,应予重复计数。依据试验物质性质选择合适的技术方法。

4.2.4 限度试验

设置上限浓度为 100 mg a.i./L,即在供试物达 100 mg a.i./L 时,未对藻产生影响。若供试物溶解度小于 100 mg a.i./L,则采用其溶解度上限作为试验浓度。对照组和处理组至少设置 6 个重复,并且对浓度组和对照组进行差异显著性分析(比如 *t* 检验)。

4.2.5 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。使用参比物质(每年至少两次)对绿藻进行检测,推荐使用 3,5-二氯苯酚和重铬酸钾。

4.3 数据处理

4.3.1 生物量增长的抑制百分率

处理组藻类生物量增长的抑制百分率按式(1)计算:

$$I_y = \frac{Y_c - Y_t}{Y_c} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

I_y ——处理组生物量增长的抑制百分率,%;

Y_c ——空白对照组测定的藻类单位生物量,用细胞数表示时单位为个每毫升(个/mL);

Y_t ——处理组测定的藻类单位生物量,用细胞数表示时单位为个每毫升(个/mL)。

4.3.2 生长率的抑制百分率

处理组藻类生长率的抑制百分率按式(2)计算:

$$I_r = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

I_r ——处理组藻类生长率的抑制百分率, %;

μ_c ——空白对照组生长率的平均值;

μ_t ——处理组生长率平均值。

其中 μ 按式(3)计算:

$$\mu_{j-i} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

μ_{j-i} ——在时间点 i 到时间点 j 之间的平均生长率;

X_i ——在时间点 i 时的藻类单位生物量, 用细胞数表示时单位为个每毫升(个/mL);

X_j ——在时间点 j 时的藻类单位生物量, 用细胞数表示时单位为个每毫升(个/mL)。

4.3.3 半效应浓度

4.3.3.1 统计分析方法的选择

按藻类生物量增长的抑制百分率和藻类生长率的抑制百分率分别计算半效应浓度 $E_y C_{50}$ 和 $E_r C_{50}$ 。采用合适的统计学软件分析藻类数据, 计算得到每一观察时间(24 h、48 h、72 h)的半效应浓度和 95% 置信限。

4.3.3.2 寇氏法

用寇氏法可求出藻类在 24 h、48 h 和 72 h 的 EC_{50} 值及 95% 置信限。

EC_{50} 的计算见式(4):

$$\log EC_{50} = X_m - i(\sum P - 0.5) \quad \dots\dots\dots(4)$$

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(5):

$$95\% \text{ 置信限} = \log EC_{50} \pm 1.96 S \log EC_{50} \quad \dots\dots\dots(5)$$

标准误的计算见式(6):

$$S \log EC_{50} = i \sqrt{\sum \frac{pq}{n}} \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中:

p ——1 个组的抑制率;

q —— $1-p$;

n ——各浓度组的生长率或生物量增长。

4.3.3.3 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。

4.3.3.4 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:

- 供试生物应是处于对数生长期的纯种藻;
- 对照组和各浓度组的试验温度、光照等环境条件应按要求完全一致;
- 试验起始斜生栅列藻浓度应控制在 2.0×10^3 个/mL ~ 5.0×10^3 个/mL 左右,羊角月芽藻应控制在 5.0×10^3 个/mL ~ 5.0×10^4 个/mL 左右,普通小球藻应控制在 1.0×10^4 个/mL ~ 2.0×10^4 个/mL 左右;
- 试验开始后 72 h 内,对照组藻细胞浓度应至少增加 16 倍。

5 试验报告

试验报告应包括下列内容:

- 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;
- 供试生物名称、来源、培养基及培养方法;
- 试验条件,包括试验持续时间、温度、光照(光强和光周期)、试验容器(容量、型号、密闭方法)、静置、振荡或通气方式、测试液体积、pH、溶剂及其浓度、藻类生长的测定方法等;
- 供试物的浓度与抑制曲线图,得出的 $E_x C_{50}$ 、 $E_y C_{50}$ 值,并注明计算方法;
- 观察到的效应:细胞颜色、形态和大小变化;粘连或聚结情况;死亡、抑藻或杀藻效应情况等;
- 试验质量控制条件描述;
- 对藻的毒性等级划分见附录 B。

附 录 A
(资料性附录)
培养基配方

水生 4 号、BG11、SE 培养基的配方分别参见表 A.1~表 A.3。

表 A.1 水生 4 号培养基配方

序号	组分	用量
1	硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.00 g
2	过磷酸钙饱和液 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot (\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$	10.0 mL
3	硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.80 g
4	碳酸氢钠 NaHCO_3	1.00 g
5	氯化钾 KCl	0.25 g
6	三氯化铁 1% 溶液 FeCl_3	1.50 mL
7	土壤提取液 ^a	5.00 mL

以上成分用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL,经高压灭菌(121 ℃,15 min),密封并贴好标签,4 ℃ 冰箱保存,有效期 2 个月。该培养基用经高压灭菌(121 ℃,15 min)的蒸馏水稀释 10 倍后即可使用。

^a 取未施过肥的花园土 200 g 置于烧杯或锥形瓶中,加入蒸馏水 1 000 mL,瓶口用透气塞封口,在水浴中沸水加热 3 h,冷却,沉淀 24 h,此过程连续进行 3 次,然后过滤,取上清液,于高压灭菌锅中灭菌后于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

表 A.2 BG11 培养基配方

序号	组分	母液浓度	母液用量
1	硝酸钠 NaNO_3	15 g/100 mL 蒸馏水	10 mL
2	磷酸氢二钾 K_2HPO_4	2 g/500 mL 蒸馏水	10 mL
3	七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.75 g/500 mL 蒸馏水	10 mL
4	二水氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.8 g/500 mL 蒸馏水	10 mL
5	柠檬酸 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0.3 g/500 mL 蒸馏水	10 mL
6	柠檬酸铁铵 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{NH}_4\text{OH}$	0.3 g/500 mL 蒸馏水	10 mL
7	EDTA 钠盐 EDTANa_2	0.05 g/500 mL 蒸馏水	10 mL
8	碳酸钠 Na_2CO_3	1.0 g/500 mL 蒸馏水	10 mL
9	A5(Trace mental solution) 1 mL/L	硼酸 H_3BO_3	2.86 g/L 蒸馏水
		四水氯化锰 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.86 g/L 蒸馏水
		七水硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g/L 蒸馏水
		二水钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39 g/L 蒸馏水
		五水硫酸铜 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08 g/L 蒸馏水
		六水硝酸钴 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/L 蒸馏水

将以上各成分配制成相应母液浓度,并按照标明顺序依次将相应母液用量转移至 1 000 mL 容量瓶中,定容,经高压灭菌(121 ℃,15 min),密封并贴好标签,4 ℃ 冰箱保存,有效期 2 个月。该培养基用经高压灭菌(121 ℃,15 min)的蒸馏水稀释 10 倍后即可使用。

表 A.3 SE 培养基配方

序号	组分	母液浓度	母液用量	
1	硝酸钠 NaNO_3	25 g/100 mL 蒸馏水	1 mL	
2	磷酸氢二钾 K_2HPO_4	7.5 g/100 mL 蒸馏水	1 mL	
3	七水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.5 g/100 mL 蒸馏水	1 mL	
4	二水氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5 g/100 mL 蒸馏水	1 mL	
5	磷酸二氢钾 KH_2PO_4	17.5 g/100 mL 蒸馏水	1 mL	
6	氯化钠 NaCl	2.5 g/100 mL 蒸馏水	1 mL	
7	六水氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/100 mL 蒸馏水	1 mL	
8	EDTA 铁盐 EDTA-Fe^a	—	1 mL	
9	A5(Trace mental solution)	硼酸 H_3BO_3	2.86 g/L 蒸馏水	1 mL
		四水氯化锰 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.86 g/L 蒸馏水	
		七水硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g/L 蒸馏水	
		二水钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39 g/L 蒸馏水	
		五水硫酸铜 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08 g/L 蒸馏水	
		六水硝酸钴 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/L 蒸馏水	
10	土壤提取液 ^b	—	40 mL	

将以上各成分配制成相应母液浓度,并按照标明顺序依次将相应母液用量转移至 1 000 mL 容量瓶中,定容,经高压灭菌(121 ℃,15 min),密封并贴好标签,4 ℃ 冰箱保存,有效期 2 个月。该培养基用经高压灭菌(121 ℃,15 min)的蒸馏水稀释 10 倍后即可使用。

^a 1 mol/L HCl:取 4.1 mL 浓盐酸用蒸馏水稀释至 50 mL。称取 0.1 mol/L EDTA- Na_2 0.930 6 g 溶解至 50 mL 蒸馏水中。称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.901 g 溶于 10 mL 以上步骤已经配制完成的 1 mol/L HCl 中,然后与 10 mL 已经配制完成的 0.1 mol/L EDTA- Na_2 混合,加入蒸馏水稀释至 1 000 mL。

^b 取未施过肥的花园土 200 g 置于烧杯或锥形瓶中,加入蒸馏水 1 000 mL,瓶口用透气塞封口,在水浴中沸水加热 3 h,冷却,沉淀 24 h,此过程连续进行 3 次,然后过滤,取上清液,于高压灭菌锅中灭菌后于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

附录 B
(规范性附录)
农药对藻类毒性等级划分

按藻类生长抑制半效应浓度 EC_{50} (72 h) 值, 将农药对藻类毒性等级划分为三级, 见表 B.1。

表 B.1 农药对藻类的毒性等级划分

毒性等级	EC_{50} (72 h)/(mg a.i./L)
高毒	$EC_{50} \leq 0.3$
中毒	$0.3 < EC_{50} \leq 3.0$
低毒	$EC_{50} > 3.0$

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(2011).Guideline 201;Freshwater Alga and Cyanobacteria,Growth Inhibition Test.OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
 - [5] US EPA.(1985).Part II ,Toxic substances control act test Guidelines,Final Rules,Federal register.
 - [6] 蔡道基.农药环境毒理学研究.北京:中国环境科学出版社,1999.
-