



中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.21—2014

化学农药环境安全评价试验准则 第 21 部分：大型甲壳类生物毒性试验

Guidelines on environmental safety assessment for chemical pesticides—
Part 21: Macro-crustacean toxicity 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 21 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。

本部分起草单位：农业部农药检定所、环境保护部南京环境科学研究所。

本部分主要起草人：姜锦林、张燕、续卫利、田丰、刘勇、查金苗、刘茜。

化学农药环境安全评价试验准则

第 21 部分:大型甲壳类生物毒性试验

1 范围

GB/T 31270 的本部分规定了化学农药对大型甲壳类生物(虾、蟹)毒性试验的材料、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大型甲壳类生物毒性试验,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

半致死浓度 median lethal concentration

在急性毒性试验中,引起 50% 供试生物死亡时的供试物浓度,用 LC_{50} 表示。

注:单位为 mg a. i. /L。

2.2

最大可接受毒物浓度 maximum acceptable toxicant concentration; MATC

全生命周期或部分生命周期的慢性毒性实验得出的对受试生物不造成有害效应的毒物最大浓度或最大允许毒物浓度,这一数值介于最大无影响浓度(NOEC)和最低有影响浓度(LOEC)之间。

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

半静态试验法 semi-static test

试验期间每隔一定时间(如 24 h)更换一次药液,以保持试验药液的浓度不低于初始浓度的 80%。

2.9

静态试验法 static test

试验期间不更换试验药液。

2.10

流水式试验法 flow-through test

试验期间药液连续更新。

3 试验概述

大型甲壳类生物毒性试验包括急性毒性试验和亚慢性毒性试验方法,根据农药登记管理法规及其他规定选择相关方法进行试验。大型甲壳类生物急性毒性测定方法有静态法、半静态法与流水式试验法三种。应根据供试物的性质采用适宜的方法。分别配制不同浓度的供试物药液,急性毒性试验在 96 h 的试验期间,于试验开始后的 24 h、48 h、72 h 和 96 h 观察并记录试验用虾或蟹的中毒症状和死亡数,并分别求出 48 h 和 96 h 的 LC_{50} 值及 95% 置信限;亚慢性毒性试验推荐试验期限不低于 28 d,于 7 d、14 d、21 d 和 28 d 观察并记录虾或蟹的中毒症状、死亡率、蜕壳率和蜕壳间期、体重体长,并计算供试物对供试生物的 MATC 范围。

4 试验方法

4.1 材料和条件

4.1.1 供试生物

试验用大型甲壳类生物推荐使用日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、中华锯齿米虾(*Neocaridina denticulata*)或中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)。试验用沼虾的虾龄期为产出后 1 个月左右,大小一致,平均体长(连尾)约 2.5 cm;试验用米虾推荐使用体长(额角尖端至尾柄末端的长度)为 0.5 cm~0.8 cm 的米虾幼苗;试验用蟹的蟹龄约为 5 个月(扣蟹),大小一致,重量约 5 g。试验前,供试生物应在实验室条件下预养 7 d,试验前及试验过程中正常喂食。

4.1.2 供试物

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

4.1.3 主要仪器设备

玻璃缸、容量瓶、溶解氧测定仪、pH 计、温度计、充气泵、温度控制设备等;如用流水式试验方法,可采用流水式试验装置,但应有供试物储备液连续分配和稀释系统,且该装置应有控温、充气和流量控制等装置。

4.1.4 试验用水

试验用稀释水为经活性炭处理、存放并曝气处理 24 h 以上的自来水或能注明配方的稀释水。水质硬度在 10 mg/L~250 mg/L 之间(以 CaCO₃ 计),pH 在 6.0~8.5 之间,溶解氧不应低于空气饱和值(ASV)的 60%。

4.1.5 承载量

静态和半静态试验系统最大承载量为 1.0 g(受试生物)/L,流水式试验系统承载量可高一些。

4.1.6 试验条件

试验温度(23±1)℃,每日光照与黑暗时间比为 14 h : 10 h。

4.1.7 试验期限

急性毒性试验期限一般为 96 h(根据供试物特性可适当延长观察期),亚慢性毒性试验期限不低于 28 d。

4.2 试验操作

4.2.1 急性毒性试验方法

4.2.1.1 方法的选择

应根据农药的特性选择静态试验法、半静态试验法或流水式试验法。如使用静态或半静态试验法,应确保试验期间试验药液中供试物浓度不低于初始浓度的 80%。如果在试验期间试验药液中供试物浓度发生超过 20% 的偏离,则应检测试验药液中供试物的实际浓度并以此计算结果,或使用流动试验法进行试验,以稳定试验药液中供试物浓度。

4.2.1.2 预试验

一般选择静态试验法,按正式试验的条件,以较大的间距设若干组浓度(如 1、10、100 mg a. i. /L),每处理组放入虾 10 尾或蟹 10 只,不设重复,观察并记录受试虾或蟹 48 h 和 96 h 的死亡情况和中毒症状。通过预试验求出受试虾或蟹最高全存活浓度及最低全致死浓度,为正式试验确定浓度范围。

4.2.1.3 正式试验

在预试验确定的浓度范围内以一定几何级差间距(1.5~2.0)设置 5 个~7 个浓度组,并设一个稀释水对照组,使用有机溶剂助溶的增设溶剂对照组,每个浓度组设 3 个重复。每缸放入虾 10 尾或蟹 10 只,试验开始后 6 h 内随时观察并记录受试虾或蟹的中毒症状及死亡率,其后于 24 h、48 h、72 h 和 96 h 观察并记录受试虾、蟹的中毒症状及死亡数,及时清除死虾或蟹。每天测定并记录试液温度、pH 及溶解氧。

4.2.1.4 限度试验

以供试物的最大水溶解度为限度试验浓度(当供试物的最大水溶解度大于 100 mg a. i. /L 时,以 100 mg a. i. /L 为试验浓度进行试验),如供试生物死亡率未超过空白对照组,可判定供试物对供试生物低毒,则无需继续进行试验。试验结果以 LC₅₀(96 h)大于该物质的最大水溶解度或大于 100 mg a. i. /L 表示。

4.2.2 亚慢性毒性试验方法

4.2.2.1 方法的选择

应根据农药的特性选择半静态试验法或流水式试验法。如使用半静态试验法,应确保试验期间试验药液中供试物浓度不低于初始浓度的80%。如果在试验期间试验药液中供试物浓度发生超过20%的偏离,则应检测试验药液中供试物的实际浓度并以此计算结果,或使用流动试验法进行试验,以稳定试验药液中供试物浓度。

4.2.2.2 正式试验

根据急性毒性试验结果 LC_{50} (96 h)确定试验浓度范围,一般选择半静态试验法,以一定几何极差间距(1.5~2.0)设置5个~7个浓度组,并设一个稀释水对照组,使用有机溶剂助溶的增设溶剂对照组,每个浓度组重复三次。每缸至少放入虾20尾或蟹20只,试验开始后7 d、14 d、21 d和28 d观察并记录虾、蟹的中毒症状和死亡率;每日记录蜕壳次数并及时清除蜕壳,计算蜕壳频率和蜕壳间期;试验开始前和结束时分别记录虾或蟹的体重体长,计算体重相对增重率和体长相对增长率;MATC可以从上述评价终点中的最敏感指标来确定。试验期间及时清除死虾、蟹。每天测定并记录试液温度、pH及溶解氧。

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的大型甲壳类生物的半致死浓度 LC_{50} 和95%置信限,也可采用数据统计软件进行分析和计算;最大可接受毒物浓度(MATC)范围可选择死亡率、蜕壳频率、蜕壳间期、体重相对增重率和体长相对增长率等指标中的最敏感指标来确定,计算方法参见附录A中A.1。死亡率、蜕壳频率、蜕壳间期、体重相对增重率和体长相对增长率等指标计算方法参见附录A中A.2。

4.3.2 寇氏法

用寇氏法可求出大型甲壳类生物24 h和48 h的 LD_{50} 值及95%置信限。

LD_{50} 的计算见式(1):

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

式中:

X_m ——最高浓度的对数;

i ——相邻浓度比值的对数;

$\sum P$ ——各组死亡率的总和(以小数表示)。

95%置信限的计算见式(2):

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

标准误的计算见式(3):

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

式中:

p ——1个组的死亡率;

q —— $1-p$;

n ——各浓度组生物的数量。

4.3.3 直线内插法

采用线性刻度坐标,绘制试验物质浓度对死亡百分率的曲线,求出 50%死亡时的 LD_{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、死亡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,从直线中读出致死 50%的浓度对数,估算出 LD_{50} 值。

4.4 质量控制

质量控制条件包括:

- 预养期间,供试生物的死亡率不得超过 20%;
- 急性毒性试验期间,对照组死亡率不超过 10%,且无异常行为出现;
- 亚慢性毒性试验期间,对照组死亡率不超过 20%,且无异常行为出现;
- 试验期间,试验溶液的溶解氧含量不应低于空气饱和值(ASV)的 60%。

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;
- 供试生物名称、来源、大小及驯养情况;
- 试验条件,包括试验温度、光照等,定期记录所采用稀释水的温度、溶解氧浓度及 pH 等;
- 试验液的浓度及急性毒性试验中 LC_{50} (48 h)、 LC_{50} (96 h)值和 95%置信限,亚慢性毒性试验中 7 d、14 d、21 d、28 d 的 LC_{50} 、蜕壳频率、蜕壳间期、体重相对增重率和体长相对增长率,最敏感指标的 MATC 范围,并给出所采用的计算方法;
- 对照组虾、蟹是否出现死亡及异常反应;
- 对大型甲壳类生物的急性毒性等级划分参见附录 B。

附 录 A
(资料性附录)
毒性计算方法

A.1 MATC 范围计算方法

大型甲壳类生物慢性毒性试验的 MATC 范围计算可选择死亡率、蜕壳频率、体重和体长等指标中的最敏感指标来确定,通过选择合适的统计检验方法比较低供试物浓度和最高供试物浓度下评价终点的平均值间的显著性差异($p < 0.05$)来确定 MATC 范围。参数选择标准可考虑最短暴露期内,和空白对照组相比出现显著性差异的最低供试物浓度值。MATC 数值介于最大无影响浓度(NOEC)和最低有影响浓度(LOEC)之间。

A.2 亚慢性毒性试验其他参数计算方法

试验进行 28 d 后对所有虾或蟹称重,试验参数的计算公式见式(A.1)~式(A.5)。

$$\text{死亡率} = 100\% \times (N_0 - N_t) / N_0 \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

N_0 ——试验开始前受试生物的数量;

N_t ——试验结束时受试生物的数量。

$$MT = 100\% \times (N_m / N_s) \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

MT ——蜕壳频率, %;

N_m ——每日每个水族箱的蜕壳总次数;

N_s ——每日每个水族箱的初始受试生物数量。

$$IP = \sum T / N_m \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中:

IP ——蜕壳间期,单位为天(d);

T ——试验持续时间,单位为天(d);

N_m ——每日每个水族箱的蜕壳总次数。

$$\text{体重相对增重率} = 100\% \times (W_t - W_0) / W_0 \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

W_t ——试验开始前受试生物的体重;

W_0 ——试验结束时受试生物的体重。

$$\text{体长相对增长率} = 100\% \times (L_t - L_0) / L_0 \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

L_t ——试验开始前受试生物的体长;

L_0 ——试验结束时受试生物的体长。

附录 B
(资料性附录)

农药对大型甲壳类生物急性毒性划分

按大型甲壳类生物半致死浓度 LC_{50} (96 h) 值, 将农药对甲壳类生物急性毒性划分为四个等级, 见表 B.1。

表 B.1 农药对大型甲壳类急性毒性的毒性等级划分标准

毒性等级	LC_{50} (96 h)/(mg a. i. /L)
剧毒	$LC_{50} \leq 0.1$
高毒	$0.1 < LC_{50} \leq 1.0$
中毒	$1.0 < LC_{50} \leq 10$
低毒	$LC_{50} > 10$

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] US EPA (1996). Mysid acute toxicity test (OCSP 850.1035). Ecological Effects Test. Guidelines. US EPA (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012, Washington DC, United States of America.
 - [4] OECD (1992) Guideline 203: Fish, acute toxicity test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
 - [5] OECD (2004) Guideline 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
 - [6] OECD (2012) Guideline 211: *Daphnia magna* reproduction, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
 - [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.
-