

化学农药 摇蚊急性活动抑制试验准则

Chemical pesticide—Guideline for chironomid acute immobilisation test

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言.....	3
1 范围.....	4
2 规范性引用文件.....	4
3 术语和定义.....	4
4 原理.....	4
5 试验条件.....	4
6 试剂和材料.....	4
7 仪器设备.....	5
8 被试物和参比物.....	5
9 试验步骤.....	6
10 试验数据处理.....	8
11 质量控制.....	8
12 试验报告.....	8
附录A(规范性) 试验条件.....	10
附录B(规范性) 试验用水水质要求.....	11
参考文献.....	12

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本文件由全国农药标准化技术委员会（SAC/TC 133）归口。

本文件负责起草单位：农业农村部农药检定所。

本文件主要起草人：。

化学农药 摇蚊急性活动抑制试验准则

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了化学农药对摇蚊急性活动抑制试验的试验方法。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 31270.13 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

NY/T 3273 难处理农药水生生物毒性试验指南

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

用被试物配制成一系列不同浓度的试验药液，将1龄摇蚊幼虫转移至试验药液中，连续48 h观察中毒症状和活动受抑制情况，求出48 h的半数抑制浓度（ EC_{50} ）及95%置信限。

5 试验条件

温度、光照、溶解氧浓度及试验体系承载量等试验条件应符合附录A的要求。

6 试剂和材料

6.1 试剂

6.1.1 氢氧化钠（NaOH，CAS号：1310-73-2），分析纯及以上。

6.1.2 盐酸（HCl，CAS号：7647-01-0），分析纯及以上。

6.2 材料

试验容器为50 mL培养皿（高3 cm，直径4.7 cm）或100 mL烧杯（高7 cm，直径4.5 cm），与

试验溶液接触的试验容器及其他仪器设备应采用玻璃或其他化学惰性材料制成。试验容器不应密闭，但应配备玻璃盖、表面皿。

6.3 供试生物

宜选用以下物种：花翅摇蚊（*Chironomus kiiensis*）、岸溪摇蚊（*Chironomus riparius*）、伸展摇蚊（*Chironomus dilutus*）或古松摇蚊（*Chironomus yoshimatsui*）的1龄幼虫。若使用其他物种，需提供充分的生物学特性及驯养验证数据。首次引入供试生物时应进行物种鉴定。

6.4 试验用水

6.4.1 试验用水应水质稳定，确保在培养及试验期间（对照组）供试生物的存活不受影响，且无其他异常外观或行为表现。宜选用重组水（如E1endt M4或M7培养基），配制方法可参考GB/T 31270.13。可使用清洁天然水（包括地表水或地下水）或经24 h以上脱氯处理的自来水。试验用水应满足附录B表B.1的规定，必要时可配备活性炭过滤装置。如使用标准稀释水，应确保其不含有可能与被试物形成络合物的成分，且配制用试剂应为分析纯及以上，去离子水或蒸馏水的电导率不应大于10 μ S/cm。

6.4.2 试验开始时，试验用水的pH应在6.0~9.0之间，总硬度不大于400 mg/L（以CaCO₃计）。如被试物与硬度离子可能存在相互作用时，则应选用低硬度水，不应使用E1endt M4培养基。整个试验过程中应使用同一种水。

6.4.3 如使用天然水或脱氯自来水，应定期检测水质，每半年至少1次，水质可能发生重大变化时应增加检测。

7 仪器设备

7.1 天平，感量0.0001 g及以上。

7.2 pH计，精度为 ± 0.01 pH单位。

7.3 体视显微镜。

7.4 溶解氧测定仪。

7.5 硬度测定设备。

7.6 温度控制设备。

7.7 温度监测设备，精度 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ，可连续记录温度。

7.8 TOC浓度测定设备或COD测定设备。

7.9 气相色谱仪、高效液相色谱仪、质谱仪、气相色谱-质谱联用仪、高效液相色谱-质谱联用仪等定性定量设备。

8 被试物和参比物

8.1 被试物

农药原（母）药或制剂、纯品等。试验开始前，宜了解被试物剂型、有效成分结构式、相对分子质量、纯度/含量、在水中和有机溶剂中的溶解度、在水中的稳定性和光解稳定性、光吸收特性、饱和蒸气压、正辛醇—水分配系数（*Pow*）、解离常数、生物降解性数据（如有）、作用机理、用于定性定量检测试验药液中被试物浓度的分析方法等信息。

8.2 参比物

参比物可选 3,5-二氯苯酚（ $C_6H_4Cl_2O$ ，CAS 号：591-35-5）、氯化钾（ KCl ，CAS 号：7447-40-7）、林丹（ $C_{12}H_8Cl_6$ ，CAS 号：58-89-9）、五氯苯酚（ C_6HCl_5O ，CAS 号：87-86-5）、氯化镉（ $CdCl_2$ ，CAS 号：10108-64-2）等，分析纯及以上。

9 试验步骤

9.1 试验准备

9.1.1 试验开始前 4 d~5 d，获取产卵时间 24 h 内的新鲜卵块。为确保试验所用幼虫龄期准确，在收集卵块前 24 h，将附着在培养容器边缘的旧卵块清理掉。

9.1.2 试验开始时，取至少 3 个卵块（以 6 个为宜），加入适量食物后孵化。可使用原培养体系的陈化培养基或新配制的培养基。产卵后，花翅摇蚊 25℃ 下 2 d~4 d 孵化，岸溪摇蚊 20℃ 下 2 d~3 d 孵化，伸展摇蚊 23℃ 下 1 d~4 d 孵化，古松摇蚊 25℃ 下 1 d~4 d 孵化，孵化后即 1 龄幼虫。

9.1.3 孵化后应立即喂食鱼食过滤液或绿藻，每只幼虫的喂食量为 0.05 mg~0.5 mg。还可使用异株荨麻（*Urtica dioica*）、桑（*Morus alba*）、白车轴草（*Trifolium repens*）、菠菜（*Spinacia oleracea*）的叶片细磨成粉末，或使用干燥、细磨后的小麦草、 α -纤维素等。

注：鱼食过滤液的制备方法为，将少量经细磨的片状鱼食悬浮液煮沸，然后过滤。

9.1.4 宜选用孵化后 2 d~3 d 的 1 龄幼虫作为供试生物。可使用体视显微镜测量幼虫头壳宽度鉴定摇蚊龄期。

9.2 预试验

可先进行预试验来确定正式试验的浓度范围。预试验中，将幼虫暴露于一系列浓度间隔较大的被试物中。每个试验浓度至少暴露 10 只幼虫，分为两个重复，暴露周期为 48 h。

9.3 正式试验

至少应设 5 个处理组，几何级差不宜超过 2.2 倍，并设置空白对照组，如使用助溶剂的，还应设置溶剂对照组。溶剂对照组中溶剂的浓度应与各试验浓度组相同。浓度设计应能够得出 EC_{50} ，最高浓度宜使 100% 的幼虫活动受抑制，最低浓度宜无可见毒性效应。

9.4 试验溶液配制

9.4.1 宜通过稀释储备液制备试验溶液。储备液宜通过将试物直接溶解在稀释水中配制，并避免使用助溶剂或分散剂。对于原药或其他单一化学品（非混合物），试验溶液中被试物的浓度不得超过其在稀释水中的实际溶解度上限。若使用助溶剂，所有试验浓度组和对照组中助溶剂的浓度应保持一致，且最大浓度不得超过 100 $\mu\text{L/L}$ 或 100 mg/L 。

9.4.2 试验不宜调节 pH。若 pH 无法维持在 6.0~9.0，应开展额外试验。可先使用 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 NaOH，将储备液的 pH 调节至与稀释水相同。调节过程中需确保储备液浓度未发生显著变化，且不会引发被试物沉淀等化学反应。

9.5 暴露

使用钝头移液管将摇蚊 1 龄幼虫随机分配到各试验容器中。每个处理组和对照组至少使用 20 只幼虫，可设为 4 个重复，每个重复 5 只幼虫。每只幼虫至少 2 mL 试验溶液。试验容器应随机放置。暴露周期为 48 h，试验期间无需喂食。

9.6 观察

9.6.1 暴露开始后 24 h 和 48 h，应检查每个试验容器中幼虫的活动受抑制情况。可使用体视显微镜或灯箱辅助观察。

9.6.2 经机械刺激（例如，用巴氏吸管吸水后轻柔吹动幼虫，或轻晃试验容器）后，若幼虫在 15 s 内无法爬行或游泳，则判定为活动受抑制。

9.6.3 记录异常行为或外观变化。在 24 h 观察到的活动受抑制幼虫无需从试验容器中移除，以便在试验结束时确认其活动受抑制状态。失踪的幼虫均计为活动受抑制。

9.6.4 至少需在试验开始和结束时，测定对照组和最高浓度处理组的溶解氧和 pH。在整个试验过程中，pH 的变化幅度不应超过 1.5 个单位。

9.6.5 在对照组容器中测定温度，宜持续记录整个试验期间的温度。

9.7 浓度检测

应至少在试验开始和结束时，测定对照组、最高和最低浓度处理组中被试物的浓度；宜测定所有处理组的浓度。宜采用实测浓度的几何平均值表示试验结果。但若有证据表明，在整个试验期间被试物的浓度能稳定维持在设计浓度或初始实测浓度的 $\pm 20\%$ 范围内，则试验结果也可采用设计浓度或初始实测浓度表示。

9.8 限度试验

9.8.1 限度试验浓度为 100 mg/L 被试物，或不超过其在试验培养基中的实际溶解度上限（取低值）。

9.8.2 限度试验处理组和对照组使用 20 只幼虫（宜分为 4 组，每组 5 只）。若试验结束时，幼虫的活动抑制率 $>15\%$ ，则应进行正式试验。

10 试验数据处理

10.1 数据整理

以列表形式呈现试验数据，列出每个处理组的每个重复暴露幼虫的数量，以及各观察时间点的活动抑制数量。

10.2 结果计算

将 24 h 和 48 h 的活动抑制率与试验浓度进行绘图。采用适当的模型（如概率单位分析）对数据进行分析，以确定浓度—效应曲线、曲线斜率以及具有 95%置信区间的 EC_{50} 。若采用标准方法无法计算 EC_{50} ，则以无活动抑制效应的最高浓度和产生 100%活动抑制效应的最低浓度的几何平均值作为 EC_{50} 的近似值。

10.3 结果检验

采用假设检验方法确定无可观察效应浓度（NOEC）及最低可观察效应浓度（LOEC），检验的显著性水平设定为 $\alpha = 0.05$ 。也可采用适当的统计检验（如费希尔精确检验，Fisher's exact test）。

11 质量控制

质量控制条件包括：

- a) 试验过程中，对照组幼虫的存活率不应低于 85%；
- b) 每个处理组和对照组的溶解氧浓度大于等于 3 mg/L，水温变化不超过 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 。

12 试验报告

试验报告至少应包括下列内容。

- a) 被试物包含以下内容。
 - 1) 名称（有效成分及其含量、剂型）、外观、来源、保存条件；
 - 2) 有效成分结构式、相对分子质量、化学文摘登记号（CAS 号），以及基本理化性质如水溶解度、稳定性、生物降解性等信息；
- b) 供试生物包含以下内容。
 - 1) 物种；
 - 2) 来源（实验室培养/外购）/批次；
 - 3) 卵块处理与孵化条件，幼虫接入时的龄期、数量；
 - 4) 驯养期间喂食情况、环境条件。
- c) 试验条件包含以下内容。
 - 1) 仪器设备；

- 2) 试验容器：材质、规格；
 - 3) 试验用水，水源、水质参数（例如 pH、TOC 等，必要时附检测报告）；
 - 4) 试验日程：预试验、幼虫接入、暴露终止的时间节点；
 - 5) 环境条件，如光照周期和光照强度、水温、溶解氧含量、pH 等。
- d) 试验方法包含以下内容。
- 1) 浓度设置：预试验结果、正式试验浓度设置、重复数量；
 - 2) 喂食：食物类型、喂食量与频率；
 - 3) 观测指标与频率：受抑制或其他不良效应（包括异常行为）的幼虫数量和比例、受抑制的状态描述、水质监测；
 - 4) 浓度检测：采样时间与方法，分析仪器与步骤，检测方法的重现性及灵敏度，回收率、LOQ、LOD 等；
 - 5) 用于计算 EC_{50} 的统计/数学方法。
- e) 试验结果包含以下内容。
- 1) 水质参数：pH、溶解氧、温度、硬度、氨氮数据等；
 - 2) 生物效应数据：受抑制或中毒症状描述；
 - 3) 统计结果： EC_{50} （48 h，含 95%置信区间）及其统计方法；
 - 4) 浓度—效应曲线图；
 - 5) 质量控制条件，包括参比物试验日期、结果等；
 - 6) 偏离情况：试验过程中发生的可能影响结果的事件，偏离试验准则的情况、原因及对结果的影响；
 - 7) 分析方法验证和浓度检测典型谱图等。

附录 A
(规范性)
试验条件

A.1 温度

试验期间，测试温度应满足以下条件：

- a) 花翅摇蚊， (23 ± 2) °C；
- b) 岸溪摇蚊， (20 ± 2) °C；
- c) 伸展摇蚊， (23 ± 2) °C；
- d) 古松摇蚊， (25 ± 2) °C；
- e) 整个试验期间水温波动幅度不应超过 ± 1.0 °C。

A.2 光照

光照周期为16 h光照：8 h黑暗，光照强度 $7.1 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} \sim 20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，约相当于500 lx~1000 lx。

A.3 溶解氧浓度

每个处理组和对照组的溶解氧浓度大于等于3 mg/L。

A.4 试验体系承载量

试验体系承载量应满足以下要求：

- a) 每个试验容器接入 20 只 1 龄幼虫；
- b) 试验溶液表面需满足每只幼虫 $2 \text{ cm}^2 \sim 3 \text{ cm}^2$ 的空间需求。

附录 B

(规范性)

试验用水水质要求

试验用水理化参数指标与要求见表B.1

表 B.1 合格试验用水的部分化学特性

参数	限值
颗粒物	<20 mg/L
总有机碳 (TOC)	<2 mg/L
非离子氨 (NH ₃)	<1 μg/L
硬度 (以CaCO ₃ 计)	<400 mg/L ^a
余氯	<10 μg/L
总有机磷农药	<50 ng/L
总有机氯农药与多氯联苯	<50 ng/L
总有机氯	<25 ng/L

^a: 当钙、镁离子和被试物有相互作用时, 应使用低硬度水, 不应使用 Elendt M4 培养基。

参 考 文 献

- [1] OECD. Testing Guideline 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2011.
-