

ICS 65.100

CCS B 15

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202X

---

## 化学农药 水-沉积物系统中摇蚊毒性试验 准则 第2部分：加标于沉积物法

**Chemical Pesticide—Guidelines for Sediment-Water Chironomid Toxicity Test  
Part 2: Spiked Sediment Method**

(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 -
引 言.....	- 4 -
1 范围.....	5
2 规范性引用文件.....	5
3 术语和定义.....	5
4 原理.....	6
5 试验条件.....	6
6 试剂和材料.....	6
7 仪器设备.....	8
8 被试物和参比物.....	8
9 试验步骤.....	9
10 试验数据处理.....	12
11 质量控制.....	15
12 试验报告.....	15
附 录 A（规范性）试验条件.....	17
附 录 B（资料性）沉积物的配制.....	18
附 录 C（规范性）试验用水水质要求.....	19
附 录 D（规范性）间隙水分离与浓度检测方法.....	20
附 录 E（资料性）质量平衡的计算.....	21
参 考 文 献.....	23

## 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。

本文件是NY/T XXXX—202X《化学农药 水-沉积物系统中摇蚊毒性试验准则》的第2部分。NY/T XXXX—202X已经发布了以下部分：

- 第1部分：加标于水法；
- 第2部分：加标于沉积物法。

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专利的责任。

本文件由农业农村部种植业管理司提出。

本文件由全国农药标准化技术委员会（SAC/TC 133）归口。

本文件起草单位：农业农村部农药检定所。

本文件主要起草人：。

## 引 言

为减少农药使用对生态环境的影响、提供符合农药环境风险评估要求的数据，需开展环境安全评价试验明确农药对环境中非靶标生物的毒性。NY/T XXXX《化学农药 水-沉积物系统中摇蚊毒性试验准则》是指导我国农药环境安全评价试验的试验方法标准，旨在规范农药环境安全评价试验工作，提高农药环境安全评价试验的科学性和可比性，拟由2个部分构成。

——第1部分：加标于水法，目的在于明确农药通过水体暴露对摇蚊幼虫产生的影响，涵盖从幼体发育至成虫整个过程；

——第2部分：加标于沉积物法，目的在于明确农药通过沉积物暴露对摇蚊幼虫产生的影响，涵盖从幼体发育至成虫整个过程。

# 化学农药 水-沉积物系统中摇蚊毒性试验准则 第 2 部分：加标于沉积物法

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

本文件描述了通过加标于沉积物法，测试化学农药在水-沉积物系统中对摇蚊幼虫毒性的试验方法。

本文件适用于评估化学农药长期暴露对处在水-沉积物中的淡水双翅目摇蚊属 (*Chironomus* sp.) 幼虫的影响。

## 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—2025 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

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**加标于沉积物法** spiked sediment method

模拟农药在沉积物中累积并持续暴露的场景，将被试物加入沉积物中，制备成不同浓度的加标沉积物，构建水-沉积物系统开展毒性试验。

### 3.2

**上覆水** overlying water

试验容器中覆盖于沉积物之上的水层。

### 3.3

#### 间隙水 pore water

填充在沉积物颗粒间隙中的水。

### 3.4

#### 人工沉积物 formulated sediment

模拟天然沉积物理化特性，将泥炭、高岭土、石英砂等组分按特定比例混合而成的标准化基质。也可称为再生沉积物、配制沉积物或合成沉积物。

## 4 原理

向沉积物中添加被试物，制备一系列不同浓度的水-沉积物试验体系，待被试物在沉积物、间隙水和上覆水之间分配稳定后接入1龄摇蚊幼虫。试验期间观察并记录摇蚊的羽化数量、羽化时间（发育速率），可根据需要加测 10 d 幼虫的存活率和生长量等短期指标。根据试验目的，采用适宜的统计分析方法，获得x%效应浓度（ $EC_x$ ）或无可观察效应浓度（NOEC）及最低可观察效应浓度（LOEC），评估被试物对摇蚊的毒性效应。

## 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 碳酸钙（ $CaCO_3$ ，CAS 号：471-34-1），化学纯及以上。

6.1.2 有机溶剂：丙酮（ $C_3H_6O$ ，CAS 号：67-64-1）、正己烷（ $C_6H_{14}$ ，CAS 号：110-54-3）、氯仿（ $C_2H_6O$ ，CAS 号：64-17-5）等，分析纯及以上。

### 6.2 供试生物

#### 6.2.1 物种选择

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。

## 6.2.2 幼虫获取

6.2.2.1 试验前，从摇蚊培养体系中取出新产卵块置于盛有培养基的小型容器中，在与试验相同的环境下孵化、驯养。可使用原培养体系的陈化培养基或新配制的培养基。若使用后者，需向培养基中添加少量食物，例如绿藻或鱼食滤液。

注：将薄片状鱼食细磨、加水形成悬浊液、取其滤液，即为鱼食滤液。

6.2.2.2 产卵后，花翅摇蚊 23℃ 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。

6.2.2.3 孵化后驯养期间及时喂食鱼食滤液，每只低龄幼虫每天饲喂量为 0.25 mg~0.5 mg，并保持溶解氧浓度不低于空气饱和值(ASV)的 80%。

6.2.2.4 宜选用孵化后 2 d~3 d 的 1 龄幼虫作为供试生物。可依据幼虫的头壳宽度鉴定摇蚊龄期。

## 6.3 沉积物

6.3.1 宜选用人工沉积物，配制方法见附录 B。

6.3.2 确需使用天然沉积物时，除测定其 pH、有机碳含量外，还宜测定 C/N 比和粒径分布等参数。天然沉积物应未受污染，且不存在与摇蚊竞争或捕食摇蚊的其他生物。用于试验前，宜将天然沉积物在与试验相同的条件下陈化 7 d。

## 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 Elendt M4 或 M7 培养基），按照 GB/T 31270.13 附录 A 的方法配制。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 C 表 C.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  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

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  $\text{CaCO}_3$  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 Elendt 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。

## 6.5 饲料

根据试验设计选择适宜的饲料。

a) 薄片鱼食：细磨成干燥粉末或制备悬浊液，例如，将 1.0 g 薄片鱼食加入到 20 mL 稀释水中并搅拌均匀；

b) 植物性饲料：将异株荨麻 (*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、 $\alpha$ -纤维素等。

## 7 仪器设备

7.1 玻璃容器，烧杯或圆柱形容器，容积不小于 600 mL，并配备带有通气软管的盖子。

7.2 天平，感量 0.0001 g 及以上。

7.3 pH 计，精度为 $\pm 0.01$ pH 单位。

7.4 溶解氧测定仪，精度为 $\pm 0.1$  mg/L。

7.5 曝气设备，玻璃巴斯德吸管搭配小型气泵，或其他惰性材料曝气设备。

7.6 总有机碳 (TOC) 分析仪。

7.7 温度监控设施/设备，其中监测设备应连续记录温度，精度 $\pm 0.1$ °C。

7.8 照度计，测量范围 2000 lx 以内，精度 $\pm 5\%$ 。

7.9 流水式试验装置 (必要时)。

7.10 干燥箱，可控温至  $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

7.11 离心机 (离心力不小于 10000 g)、旋转蒸发仪等样品前处理设备。

7.12 显微镜，用于观察幼虫龄期、羽化状态。

7.13 筛网，孔径 250  $\mu\text{m}$ 。

7.14 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、制剂或纯品。试验开始前宜了解被试物在水和有机溶剂中的溶解度、在水与沉积物中的稳定性、光解稳定性、饱和蒸气压、正辛醇-水分配系数、水-沉积物系统分配情况、生物降解性，以及用于定性定量检测上覆水、间隙水和沉积物中被试物浓度的分析方法，明确分析方法的准确度、检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

## 8.2 参比物

参比物可选林丹 ( $C_6H_6Cl_6$ , CAS 号: 58-89-9)、五氯苯酚 ( $C_6HCl_5O$ , CAS 号: 87-86-5)、氟乐灵 ( $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ , CAS 号: 1582-09-8)、氯化镉 ( $CdCl_2$ , CAS 号: 10108-64-2) 或氯化钾 (KCl, CAS 号: 7447-40-7), 分析纯及以上。

## 9 试验步骤

### 9.1 预试验

按正式试验条件, 以较大间距设置不同浓度的处理组, 每个处理组1个试验容器, 接入20只1龄幼虫, 暴露 10 d~14 d, 观察幼虫存活、生长及羽化情况, 确定正式试验浓度范围。

### 9.2 正式试验

#### 9.2.1 试验设计

9.2.1.1 根据预试验结果或已知毒性数据, 按一定比例间距设置至少5个处理组, 浓度几何级差不超过2.2倍。同时设空白对照, 配制过程需使用有机溶剂时, 还应增设溶剂对照。当试验目的为获得 $EC_x$ 时, 所设浓度范围应覆盖目标效应浓度 (如 $EC_{10}$ 、 $EC_{50}$ )。

9.2.1.2 所有处理组和对照组重复数量一致。估算 $EC_x$ 的试验每处理组至少设3个重复, 估算NOEC/LOEC的试验至少4个重复。选择测定10 d短期指标时, 需额外设置重复, 增加试验容器。

9.2.1.3 宜采用静态法, 并通过轻度曝气、通风等保持上覆水水质。仅当水中溶解氧浓度过低、排泄物过多, 或者上覆水pH、硬度等水质参数受到较大影响, 导致无法维持适宜受试生物生长的水质时, 可选用半静态法或流水式法。曝气可通过置于沉积物上方2 cm~3 cm 处的玻璃巴斯德吸管进行 (每秒1个或数个气泡)。

9.2.1.4 对于强吸附性被试物 ( $\log Kow > 5$ ) 或与沉积物发生共价结合的被试物, 应在沉积物加标前将植物性饲料加入沉积物中 (添加量为沉积物干重的0.5%), 同时模拟介质暴露和摄食暴露过程。对于具有挥发性的被试物, 可不作曝气处理。对于其他被试物具有特殊特性的情形, 按照NY/T 3273采取相应措施。

#### 9.2.2 试验药液配制

根据试验浓度计算试验药液浓度, 确保沉积物加标浓度准确。试验药液配制方法如下。

a) 宜采用去离子水或蒸馏水配制试验药液;

b) 对于水溶性极差的被试物，可用毒性较低且易蒸发的有机溶剂（如丙酮、正己烷、氯仿）配制高浓度母液并与10 g细石英砂混合，待溶剂完全挥发后再进行沉积物加标。所使用的溶剂不应对被试物的毒性产生拮抗或协同作用。如采用石英砂染毒法，试验前制备沉积物时应相应减少砂的配比（即扣除10 g添加量）。

### 9.2.3 沉积物加标

9.2.3.1 通过滚筒研磨机、饲料混合机或人工搅拌等方式，将试验药液或染毒石英砂与沉积物搅拌均匀。取样分析沉积物中被试物浓度，验证均一性，相对标准偏差不超过15%。

9.2.3.2 将加标沉积物装入试验容器，并记录其重量。沉积物厚度应在 $(1.5 \pm 0.25)$  cm范围内，例如600 mL烧杯加入100 g沉积物（干重）。

9.2.3.3 缓慢加入试验用水至沉积物与上覆水体积比为1:4。加水时可将不锈钢或聚四氟乙烯等惰性材质的圆盘覆盖在沉积物表面，避免沉积物悬浮，注水完成后立即将其移除。

9.2.3.4 盖上盖子，将水-沉积物系统置于与试验相同的水温和曝气处理条件下平衡，平衡时间48 h。根据被试物特性（例如， $\log K_{ow} > 6$ ）需延长平衡时间的，应评估平衡时间对被试物稳定性的影响。

9.2.3.5 试验容器的摆放应符合完全随机或随机区组设计。

### 9.2.4 暴露

停止曝气，使用钝头移液管将20只1龄幼虫随机分配至试验容器中。幼虫接入后继续停止曝气4 h，待幼虫钻入沉积物后恢复曝气直至试验结束。

### 9.2.5 培养

#### 9.2.5.1 投喂

根据试验设计进行投喂。

##### a) 鱼食投喂

使用薄片鱼食粉末或悬浊液投喂，每周投食至少3次，宜每天1次。投喂量按幼虫生长阶段调整。

——10日龄内，每只幼虫每天投喂0.25 mg~0.50 mg（古松摇蚊0.35 mg~0.50 mg），之后每只每天0.5 mg~1.0 mg；

——摇蚊进入蛹期后停止进食，根据化蛹与羽化数量调整投喂量；

——若处理组或对照组中出现真菌生长或对照组出现死亡，应减少投喂量。如真菌增殖无法控制，则需重新进行试验。

##### b) 植物性饲料投喂

根据试验设计，试验过程中将植物性饲料和沉积物进行混合加标染毒的，试验期间不宜额外投喂。

#### c) 使用天然沉积物的情形

若使用天然沉积物且其营养成分足以满足整个试验周期摇蚊幼虫正常存活、无应激表现，可不再额外添加饲料。

### 9.2.5.2 补水

试验期间视需要进行补水，加蒸馏水或去离子水至初始液面高度。

### 9.2.6 试验周期

从将幼虫加入试验容器开始，花翅摇蚊、岸溪摇蚊、古松摇蚊最长暴露周期为28 d，伸展摇蚊最长暴露周期为65 d。若摇蚊提前羽化，试验可在对照组最后一只成虫羽化后至少5 d终止。

### 9.2.7 观测与测定

#### 9.2.7.1 羽化前

每周至少观察3次，记录受试摇蚊的异常行为，例如离开沉积物、游动异常等。

#### 9.2.7.2 羽化期

即将羽化及羽化期间，每日观察并记录每个试验容器中完全羽化的雄蚊数量（可通过其羽状触角识别）、雌蚊数量、总羽化数量及发育时间。识别并记录后立即将成蚊从容器中移出，记录未羽化的蛹数。如发现卵块，也应及时记录并移出。

#### 9.2.7.3 生长与存活

如按照试验设计需测定10 d短期指标，在暴露 10 d 后用250  $\mu\text{m}$  筛网筛分沉积物，收集幼虫，观察和测定以下指标。

- a) 存活数和死亡数，计算存活率；
- b) 每个存活个体的头壳宽度，确定其龄期；
- c) 干重。60℃烘干至恒重，测定存活幼虫的干重，计算每个试验容器中每只幼虫的平均干重。

注：静止不动或无机械刺激反应的幼虫判定为死亡；未收集到的幼虫计为死亡。

#### 9.2.7.4 水质参数

试验开始、第2周、第3周及试验结束时，测定每个容器的pH、溶解氧浓度、温度；试验开始和结束时，测定对照组与最高浓度组上覆水的硬度、氨氮浓度。

#### 9.2.7.5 浓度检测

9.2.7.5.1 试验开始（即将接入幼虫时）和结束时，应检测处理组和对照组上覆水、间隙水和沉积物中被试物的浓度。浓度检测应至少包括最高浓度组、一个低浓度组和对照组，宜对所有处理组和对照组进行检测。

9.2.7.5.2 当浓度检测所需样本量较大时，应增设平行容器，专门用于样品采集与浓度检测。平行容器的处理条件、供试生物数量均与正式试验一致，但不记录生物观测指标。

9.2.7.5.3 间隙水分离与浓度检测按附录D的规定进行。宜采用10000 g、4℃条件下离心30 min的方法分离间隙水。有证据表明被试物不会吸附于滤膜时，也可使用0.22 μm~0.45 μm滤膜。

### 9.3 限度试验

当预试验未观察到毒性效应或有其他证据表明被试物对摇蚊毒性较低时，可开展限度试验。限度试验设1个处理组和对照组，处理组浓度为1000 mg/kg干沉积物。每组各设至少6个重复。暴露周期与正式试验一致。

### 9.4 参比物试验

定期开展参比物试验。对于岸溪摇蚊，林丹、五氯苯酚的28 d EC<sub>50</sub>参考范围分别为：0.5 mg/kg~5 mg/kg干沉积物和1 mg/kg~10 mg/kg干沉积物。

## 10 试验数据处理

### 10.1 数据整理

以列表形式呈现试验数据。

a) 羽化数据：每日记录的、每个容器中完全羽化的雄蚊、雌蚊及总数，以及各组相应的平均值与标准差。

b) 发育速率：基于羽化时间计算得出的每个容器的平均发育速率（d<sup>-1</sup>），以及各组相应的平均值与标准差。

c) 10 d幼虫数据（适用时）：用于10 d观察的平行容器中，每个容器的存活幼虫数、死亡幼虫数，每组相应的平均存活率、平均死亡率，以及存活幼虫的平均个体干重。

d) 异常行为：整个试验期间观察到的异常现象，例如幼虫离开沉积物、异常游泳行为及其出现时间与数量，应与对照组进行对比描述。

### 10.2 结果计算

### 10.2.1 羽化率

按公式（1）计算羽化率（ER）。

$$ER = \frac{n_e}{n_a} \dots \dots \dots \text{公式（1）}$$

式中：

ER——羽化率，%；

$n_e$ ——每个容器羽化的摇蚊数，只；

$n_a$ ——每个容器接入的幼虫数，只。

### 10.2.2 发育速率

以从幼虫接入到羽化的平均天数（考虑幼虫接入时年龄）为平均发育时间，以发育时间的倒数（单位： $d^{-1}$ ）为发育速率，按公式（2）和公式（3）计算。

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e} \dots \dots \dots \text{公式（2）}$$

$$x_i = \frac{1}{d_i - l} \dots \dots \dots \text{公式（3）}$$

式中：

$\bar{x}$ ——每个容器的平均发育速率， $d^{-1}$ ；

$i$ ——观察间隔序数；

$m$ ——观察间隔总数；

$f_i$ ——在第  $i$  个观察间隔内摇蚊羽化数，只；

$x_i$ ——在该间隔内羽化的摇蚊的发育速率， $d^{-1}$ ；

$n_e$ ——总羽化数（ $= \sum f_i$ ），只；

$d_i$ ——观察日（自接入幼虫起的天数）；

$l$ ——观察间隔， $d$ （通常为 1 d）。

### 10.2.3 质量平衡

质量平衡计算方法见附录E。

## 10.3 数据统计

### 10.3.1 数据分析

关键观测指标包括摇蚊的羽化时间（发育速率）、羽化的雄蚊总数、羽化的雌蚊总数及羽化总数。采用  $\chi^2$  列联表检验（卡方独立性检验）判断敏感性是否存在性别差异，若无显著差异，可将雌雄数据合并分析。

### 10.3.2 $EC_x$ 估算

基于每个容器中的数据，以被试物浓度（或浓度的对数值）为横坐标，以羽化率（以百分比表示）或发育速率为纵坐标，采用回归模型拟合浓度-效应曲线，并估算  $EC_x$ （如  $EC_{10}$ 、 $EC_{50}$ ）及其95%置信区间。浓度-效应曲线图应包含每个容器的原始数据点。

### 10.3.3 NOEC/LOEC 估算

#### 10.3.3.1 基本要求

采用假设检验方法确定NOEC和LOEC，检验的显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

#### 10.3.3.2 连续数据（如发育速率、幼虫干重）

首先应检验数据是否符合单因素方差分析（ANOVA）的前提假设（正态性、方差齐性）。若符合，当浓度-效应关系呈现非单调性时采用Dunnett检验；当浓度-效应关系呈现单调性时采用Williams检验。若不符合正态性或方差齐性前提，可采用非参数检验（如基于秩次的检验）或t'检验（近似t检验）。

#### 10.3.3.3 计数数据（如羽化率）

当每个重复（容器）中羽化个体数与未羽化个体数均超过5时，可将羽化率视为连续数据，在对其进行反正弦平方根变换（对羽化率的平方根取反正弦）或Tukey-Freeman变换（弗里曼-图基变换），使其近似服从正态分布并满足方差齐性后，采用Williams检验或Dunnett检验进行比较分析。若上述方法不适用，则根据数据特征选用以下统计方法：

a) 当浓度-效应关系呈现单调性时，采用Cochran-Armitage趋势检验；若不满足单调性，则使用Mantel-Haenszel检验（简称M-H检验）或Fisher确切检验，后者需通过Bonferroni-Holm法校正P值。

b) 若同一浓度下各重复间的变异性大于二项分布预期（即存在“超二项变异”），宜采用能处理过度离散的Cochran-Armitage趋势检验或Fisher确切检验，也可采用CPFISH检验（基于闭合检验原理与Fisher-Freeman-Halton精确检验）。

### 10.3.4 限度试验

对于发育速率和体重，若满足正态性与方差齐性前提，可采用t检验；若不满足，则采用t'检验或非参数检验（如Wilcoxon-Mann-Whitney检验）。对于羽化率，采用Fisher确切检验。

## 10.4 结果表达

试验浓度表达方式如下。

a) 试验结果以沉积物浓度 (mg/kg 干沉积物) 表示, 必要时可补充以上覆水浓度 (mg/L)、间隙水浓度 (mg/L) 计的试验结果;

b) 若测试期间沉积物中实测浓度维持在设定浓度的 80%~120%, 可采用设定浓度表示试验结果; 否则采用实测浓度的几何平均值。若采样间隔不均等, 则采用时间加权算术平均值;

c) 可将沉积物浓度 (mg/kg 干沉积物) 换算为 mg/kg 有机碳 (OC) 获得归一化结果, 按公式 (4) 计算。

$$\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{OC} = \frac{\text{mg/kg 干沉积物}}{\text{kg OC/kg 干沉积物}} \dots\dots\dots \text{公式 (4)}$$

## 11 质量控制

质量控制条件包括:

a) 试验结束时, 空白对照组和溶剂对照组 (如有) 各重复羽化率不应低于 70%;

b) 自接入试验体系后对照组摇蚊的羽化时间: 花翅摇蚊、岸溪摇蚊和古松摇蚊 12 d~23 d, 伸展摇蚊 20 d~65 d;

c) 试验期间, 溶解氧浓度应维持在 60% ASV 以上, 上覆水中 pH 应在 6.0~9.0 之间, 水温变化不应超过  $\pm 1.0$  °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、沉积物与上覆水体积/质量；
  - 3) 沉积物：类型（人工配制/天然）：成分、有机碳含量、pH、含水量、平衡与驯化情况（天然沉积物需说明采样地点与污染历史）；
  - 4) 试验用水，水源、水质参数（例如 pH、TOC 等，必要时附检测报告）；
  - 5) 试验日程：预试验、加标、平衡时间、幼虫接入、暴露终止的时间节点；
  - 6) 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) 加标沉积物制备：储备液配制、加标方式、平衡时间；
  - 2) 浓度设置：预试验结果、正式试验浓度设置、重复数量；
  - 3) 喂食：食物类型、喂食量与频率；
  - 4) 观测指标与频率：羽化情况、发育速率、10 天指标（若测）、水质监测；
  - 5) 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。
- e) 试验结果包含以下内容。
- 1) 浓度检测结果，以列表形式给出各介质（上覆水、间隙水、沉积物）的实测浓度、相对标准偏差；质量平衡计算结果；
  - 2) 水质参数：pH、溶解氧、温度、硬度、氨氮数据等；
  - 3) 生物效应数据：每个容器的羽化数量、羽化率、发育速率，存活率和干重(如有)；中毒症状描述；
  - 4) 统计结果：根据试验目的， $EC_{10}$ 、 $EC_{50}$ （含 95% 置信区间）或 NOEC、LOEC 及其统计方法；
  - 5) 浓度—效应曲线图；
  - 6) 质量控制条件，包括参比物试验日期、结果等。
  - 7) 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。
  - 8) 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

A.1.1 测试温度的设定应确保对照组摇蚊的羽化时间满足本文件11 b)的要求，宜设为：

- a) 花翅摇蚊， $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ；
- b) 岸溪摇蚊， $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ；
- c) 伸展摇蚊， $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ；
- d) 古松摇蚊， $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ 。

A.1.2 试验期间，水温波动幅度不应超过 $\pm 1.0^\circ\text{C}$ 。

### A.2 光照

光照周期为16 h光照：8 h黑暗，光照强度500 lx~1000 lx。

注：在标准日光光谱（相关色温5500 K~6500 K）条件下，该照度范围对应的光合有效辐射（PAR）光量子通量密度约为  $9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \sim 18 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

### A.3 溶解氧浓度

上覆水溶解氧浓度不应低于60% ASV。

### 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) 沉积物表面积需满足每只幼虫  $2 \text{ cm}^2 \sim 3 \text{ cm}^2$  的空间需求；
- c) 沉积物层与上覆水体积比为1:4，沉积物层厚度 $1.5 \text{ cm} \pm 0.25 \text{ cm}$ 。

**附录 B**  
**(资料性)**  
**沉积物的配制**

### B.1 沉积物配方

沉积物配方见表 B.1。

**表 B.1 沉积物配方**

组分	规格	干重占比 (%)	其他要求
泥炭	泥炭藓, pH 5.5~6.0, 风干后精细研磨成粉末状 (粒径小于等于 1 mm)	4~5	
高岭土	过 150 $\mu\text{m}$ (相当于 100 目) 筛, 高岭石含量不低于 30%	20	/
石英砂	50 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ 粒径的颗粒占比大于 50%	75~76	/
碳酸钙	用于调节最终混合物的 pH	/	/
水	去离子水或蒸馏水 (电导率不高于 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	/	使沉积物含水量达到 30%~50%

### B.2 沉积物配制步骤

#### B.2.1 泥炭预处理与平衡

将风干泥炭粉末悬浮于去离子水中, 使用高功率均质设备 (如匀浆机) 使其充分分散, 用  $\text{CaCO}_3$  将 pH 调节至  $5.5 \pm 0.5$  后在  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  下温和搅拌至少 2 d, 再次测量 pH (应为  $6.0 \pm 0.5$ )。

#### B.2.2 混合干组分

将平衡好的泥炭悬浮液与石英砂、高岭土在容器中混合。加入去离子水或蒸馏水, 边加边搅拌均匀, 使沉积物含水量达到干重的 30%~50% 之间。

#### B.2.3 调节 pH

测定沉积物的 pH。必要时, 使用碳酸钙将 pH 调节至  $7.0 \pm 0.5$ 。取样测定其干重和有机碳含量, 有机碳含量应为 2.0% ( $\pm 0.5\%$ )。

#### B.2.5 陈化处理

将配制好的湿沉积物在与试验相同的环境条件下陈化 7 d 后用于试验。

#### B.2.6 储存

干组分应贮存于干燥阴凉的地方, 室温贮存。配制好的湿沉积物陈化 7 d 后立即使用。

附 录 C  
(规范性)  
试验用水水质要求

试验用水水质指标与要求见表C.1。

表 C.1 试验用水水质指标与要求

参数	限值
颗粒物	$\leq 20$ mg/L
总有机碳 (TOC)	$\leq 2$ mg/L
氨氮 (NH <sub>3</sub> )	$\leq 1$ $\mu$ g/L
硬度 (以 CaCO <sub>3</sub> 计)	$\leq 400$ mg/L <sup>a</sup>
余氯	$\leq 10$ $\mu$ g/L
总有机磷农药	$\leq 50$ ng/L <sup>b</sup>
总有机氯农药与多氯联苯	$\leq 50$ ng/L <sup>b</sup>
总有机氯	$\leq 25$ ng/L <sup>b</sup>
<p><sup>a</sup>: 当被试物与硬度相关离子 (钙离子和镁离子) 发生相互作用时, 应使用低硬度水, 不应使用Elendt M4培养基。</p> <p><sup>b</sup>: 仅当使用天然水或自来水时需测定。</p>	

**附 录 D**  
**(规范性)**  
**间隙水分离与浓度检测方法**

### D.1 间隙水分离与样品制备

#### D.1.1 采样

从试验容器中取足量湿沉积物（例如 50 g~100 g），转移至预先称重的离心管中。

#### D.1.2 离心

将装有沉积物的离心管置于离心机中，在 4℃ 条件下，以 10000 g 的离心力离心 30 min。若离心后获得的上清液仍显浑浊，可选用化学惰性材质的滤膜（孔径 0.45 μm）进行过滤，以获得澄清的间隙水样品。

#### D.1.3 收集与保存

使用移液器小心吸取澄清的间隙水上清液，转移至惰性材质的样品瓶（如棕色玻璃瓶）中，立即密封。若不能立即检测分析，样品应置于-20℃或更低的温度下冷冻避光保存。应对被试物在间隙水中的储存稳定性进行验证，以确保分析结果的可靠性。

### D.2 浓度检测

#### D.2.1 样品前处理

应根据被试物的理化性质和所选分析仪器的要求，对间隙水、上覆水及沉积物样品进行适当的前处理，可采用固相萃取、液液萃取等方法进行净化和富集。重金属类的被试物水样可直接分析或适当酸化，沉积物样品可进行酸消解处理。具体前处理方法应在分析方法中详细规定并进行验证。

#### D.2.2 仪器分析

采用经确认的可靠分析方法进行定量分析。分析方法的选择应确保其灵敏度满足测试要求。化学农药宜采用气相色谱—质谱联用仪或液相色谱—质谱联用仪等高选择性仪器。重金属类的被试物宜采用电感耦合等离子体质谱仪、原子吸收光谱仪等。

#### D.2.3 分析质量控制

每批次样品分析均应执行严格的质量控制程序，至少包括：

——方法空白：监控整个分析过程的背景污染；

——平行样：评估分析的精密度；

——基质加标：评估方法在特定样品基质中的准确度与回收率。实验室应建立并验证针对各基质的可接受回收率范围，并据此判断每批次数据的有效性。

## 附录 E

### (资料性)

### 质量平衡的计算

#### E.1 总体要求

基于不同时间点测得的各介质（沉积物、上覆水、间隙水）中被试物的实测浓度计算质量平衡。

#### E.2 计算方法

##### E.2.1 各介质中被试物总量的计算

通过将沉积物中的实测浓度 (mg/kg) 乘以沉积物干重 (kg) 及单位换算因子 1000 得到沉积物中被试物的总量 ( $\mu\text{g}$ )；将上覆水实测浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) 乘以上覆水体积 (L) 得到上覆水中被试物的总量 ( $\mu\text{g}$ )，将间隙水实测浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) 乘以间隙水体积 (L) 得到间隙水中被试物的总量 ( $\mu\text{g}$ )。其中，间隙水体积可通过沉积物含水量和密度估算，通常为沉积物湿重的 10%~30%。

##### E.2.2 各介质中被试物的占比

某介质中被试物的占比以该介质中的被试物总量与系统中被试物的初始实测总量的百分比 (%) 表示。

##### E.2.3 质量平衡回收率

以某一时间点各介质中被试物总质量之和与系统中被试物的初始实测总质量的百分比 (%) 表示该时间点的质量平衡回收率。

#### E.3 示例

表 E.1 和表 E.2 给出了某个物质的质量平衡计算示例。该示例中，浓度检测涵盖 3 个时间点 (1 h、7 d 和 28 d)。测试系统包含 0.1 kg 沉积物 (干重) 和 400 mL 上覆水；假定间隙水体积为 10 mL。此处仅以最低和最高浓度数据为例。

表 E.1 实测浓度

设定浓度 (mg a. i. /kg)	0 d			7 d			28 d		
	上覆水	间隙水	沉积物	上覆水	间隙水	沉积物	上覆水	间隙水	沉积物
	( $\mu\text{g}$ a. i. /L)	( $\mu\text{g}$ a. i. /L)	(mg a. i. /kg)	( $\mu\text{g}$ a. i. /L)	( $\mu\text{g}$ a. i. /L)	(mg a. i. /kg)	( $\mu\text{g}$ a. i. /L)	( $\mu\text{g}$ a. i. /L)	(mg a. i. /kg)
对照组	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
0.125	0.00406	0.798	0.12	0.00784	0.615	0.11	<LOQ	0.230	0.094
2.00	0.0660	25.5	1.96	0.0339	8.63	1.76	<LOQ	5.74	1.50

注：a. i. 表示被试物所含农药有效成分；LOQ 表示定量限。

表 E.2 基于实测浓度计算被试物的量

设定 ( $\mu\text{g}$ )	0 d			7 d			28 d		
	上覆水 ( $\mu\text{g}$ )	间隙水( $\mu\text{g}$ )	沉积物 ( $\mu\text{g}$ )	上覆水( $\mu\text{g}$ )	间隙水( $\mu\text{g}$ )	沉积物( $\mu\text{g}$ )	上覆水( $\mu\text{g}$ )	间隙水( $\mu\text{g}$ )	沉积物 ( $\mu\text{g}$ )
对照组	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
12.5	0.0016	0.008	12.0	0.0031	0.006	11.0	<LOQ	0.002	9.40
200	0.0264	0.255	196	0.0136	0.086	176	<LOQ	0.057	150

注：假定沉积物干重为 100g，上覆水体积为 400mL，间隙水体积为 10mL。

表 E.3 质量平衡计算

标称 ( $\mu\text{g}$ )	0 d			7 d			28 d		
	上覆水 (%)	间隙水 (%)	沉积物 (%)	上覆水 (%)	间隙水 (%)	沉积物 (%)	上覆水 (%)	间隙水 (%)	沉积物 (%)
对照组	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
12.5	0.013	0.067	99.920	0.026	0.050	91.593	/	0.019	78.271
200	0.013	0.130	99.857	0.007	0.044	89.667	/	0.029	76.421

参 考 文 献

- [1] OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 218 Sediment–Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment (2023)
-