

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

## 化学农药 鱼类早期生活阶段试验准则

Chemical pesticide—Guideline on fish early-life stage toxicity 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

# 前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准的技术性内容等效采用了经济合作与发展组织（OECD）测试指导文件 TG. 210（2013 年）《鱼类早期生活阶段毒性试验》（英文版）。

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。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位：农业农村部农药检定所

本标准主要起草人：

# 化学农药 鱼类早期生活阶段试验准则

## 1 范围

本标准规定了化学农药对鱼类早期生活阶段毒性试验的材料、条件、仪器设备、试验步骤、数据处理、质量控制、试验报告等的基本要求。

本标准适用于为化学农药登记而进行的鱼类早期生活阶段毒性试验，其他类型的农药可参照使用。

本标准不适用于易挥发的化学农药。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是标注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 31270.12 化学农药环境安全评价试验准则 第12部分：鱼类急性毒性试验；

GB/T 21807 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验；

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

**最低可观察效应浓度** (Lowest Observed Effect Concentration, *LOEC*)

在一定暴露期内，与对照相比，对受试鱼产生显著影响的最低试验浓度，用*LOEC*表示。

### 3.2

**无可观察效应浓度** (No Observed Effect Concentration, *NOEC*)

在一定暴露期内，与对照组相比，对受试鱼无显著影响的最高试验浓度，用*NOEC*表示，即仅低于*LOEC*的被试物浓度。

### 3.3

**x%效应浓度** (x% effective concentration, *EC<sub>x</sub>*)

指引起x%受试鱼产生某一毒性效应时的被试物浓度，用*EC<sub>x</sub>*表示。例如，半数效应浓度以*EC<sub>50</sub>*表示，10%效应浓度以*EC<sub>10</sub>*表示。

### 3.4

**标准长度** (Standard length, *SL*)

指从鼻梢到脊椎后端的鱼的长度，即不包括尾鳍长度。

### 3.5

全长 (Total length, *TL*)

指从鼻梢到尾鳍叶端的直线长度。

#### 4 试验概述

采用流水式或半静态试验法，将胚胎暴露于一定浓度范围的试验溶液中进行鱼类早期生活阶段的毒性测试。将受精卵加入试验容器中开始试验，至受试鱼生长至某一特定生活阶段时（如对照组中所有的鱼均能自由摄食 2 周后）结束试验。通过评价试验过程中受试鱼的致死和亚致死效应并与对照组进行比较，获得被试物对鱼类早期生活阶段的最低可观察效应浓度(*LOEC*)和无可观察效应浓度(*NOEC*)。如可能，计算 *EC*<sub>10</sub>/*EC*<sub>50</sub> 及其置信区间。

#### 5 试验方法

##### 5.1 材料和条件

###### 5.1.1 被试物

农药原药或制剂。试验前应收集被试物的基本信息，包括但不限于以下数据：

——溶解性；

——蒸气压；

——鱼类急性毒性试验结果（方法参考 GB/T 31270.12）；

——鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验结果（方法参考 GB/T 21807）等。

###### 5.1.2 试验用水

试验用水应满足鱼类长期生存与正常生长的需要，并保持水质恒定。定期进行水质检测。试验用水的水质指标要求见附录 A。

###### 5.1.3 试验条件

根据受试鱼的种类选择适宜的试验条件（如温度、光照等），具体要求见附录 B。

###### 5.1.4 试验容器

试验容器应采用玻璃、不锈钢或其他化学惰性材质，尽量减少硅酮管、硅胶密封圈等与试验用水接触。容器尺寸应满足承载量要求，并适于在试验区域内随机摆放。

###### 5.1.5 鱼种选择

推荐鱼种见表 1，包括 5 种淡水鱼类和 2 种海水鱼类。如果选用其他鱼种作为受试鱼，应根据其生理习性选择适宜的饲育和试验条件，并在试验报告中对试验鱼种及其试验方法的选择理由予以说明。

表 1 推荐使用的鱼种

淡水鱼类	海水鱼类
<i>Oncorhynchus mykiss</i> , 虹鳟	<i>Cyprinodon variegatus</i> , 杂色鲷
<i>Pimephales promelas</i> , 胖头鲶	<i>Menidia sp.</i> , 月银汉鱼属
<i>Danio rerio</i> , 斑马鱼	
<i>Oryzias latipes</i> , 青鳉	

### 5.1.6 试验鱼种的驯养

供试亲鱼的驯养条件见附录 B。

## 6 仪器设备

- 天平（感量 0.0001g 以上）；
- 溶解氧仪；
- pH 计；
- 温度监控设备；
- 分析仪器；
- 烘箱；
- 显微镜；
- 硬度计等。

## 7 试验步骤

### 7.1 试验方法的选择

7.1.1 根据被试物的特性选择半静态法或流水式方法进行试验。半静态试验中，试验药液的浓度应保持在设计浓度 $\pm 20\%$ 变化率内。对于难处理农药（难溶或略溶于水、易挥发、易降解、易被吸附、疏水性、离子型和多组分等），参考 NY/T 3273 选择试验方法。

7.1.2 采用半静态法试验方法时，可将存活的受精卵或仔鱼轻轻地移入盛有试验液（新液）的清洁容器中，也可将受试鱼留在试验容器内，至少更新试验溶液的 2/3。

7.1.3 采用流水式试验法时，应定期检查储备液与稀释用水的流量，以确保试验液的变化范围控制在 10% 以内。每 24h 流量应超过试验容器容积的 5 倍。

7.1.4 溶液制备过程应优先采用简单方法，如搅拌或超声。不推荐使用有机溶剂或分散剂（助溶剂），如须使用，其用量应小于 0.1 ml/L，且各试验容器中的用量应尽可能保持一致。

### 7.2 试验浓度

7.2.1 根据供试农药的已有毒性数据、预试验结果等确定正式试验的浓度范围。

7.2.2 按一定比例间距设置 5 个以上处理组（几何级差应控制在 3.2 倍以内），以及空白对照组。若使用有机溶剂，应同时设置溶剂对照组。每个处理组和对照组至少 4 个重复。试验容器的摆放应符合完全随机区组设计。

7.2.3 限度试验的浓度为 96h LC<sub>50</sub> 或 10 mg/L（二者取较低值）。

### 7.3 试验周期

卵受精后开始试验。在胚盘开始分裂前或分裂后不久，将胚胎移入试验液中。试验周期见附录 B。

### 7.4 承载量

7.4.1 试验开始时，将受精卵随机分配至各处理组中，每个处理组至少 80 粒卵，并平均分配到至少 4 个重复中。

7.4.2 承载量不宜过高，以保证试验液中溶解氧浓度保持在空气饱和值(ASV)的 60% 以上。流水式试验中，24h 流量的承载量不应超过 0.5g/L，且容器内溶液的承载量不应超过 5g/L。

### 7.5 胚胎和仔鱼的处理

7.5.1 视试验鱼种要求，选择是否在暴露前期采用小容量试验容器，再在适宜阶段（如孵化后）将受试鱼转移至较大容器中（参见附录 C）。转移前，可将盛装受试鱼的小号玻璃/不锈钢容器套置于较大试验容器中（小容器的侧壁或底部应带有网格，并悬挂在可上下移动的悬臂上以保证试验液有序流经）；也可采用其他适宜的试验容器（如 24 孔板）直接进行前期暴露。

7.5.2 转移仔鱼时，将盛放受试鱼的小容器、格栅或网移开，或将仔鱼从小容器（如 24 孔板）中转移至试验容器中。转移过程中应避免直接空气暴露（如避免使用网具）。

### 7.6 饲喂

根据受试鱼的不同生长阶段，适时、适量地投喂相应的饵料，以满足鱼类正常生长需要。投饵量在确保使鱼吃饱的同时应尽量减少残饵量。试验过程中，应及时清除残饵和粪便。喂食方案参见附录 C。

### 7.7 水质测定与化学分析

7.7.1 试验开始前，应建立试验液中被试物的分析方法，并进行方法验证。如为流水式试验，还应对试验系统的药液输送与稀释能力进行确认。

7.7.2 试验期间，至少每周测定一次所有试验容器水中的溶解氧、pH 值和温度。在试验开始和结束时，测定盐度和硬度。同时，对试验温度进行连续监测（至少监测其中一个试验容器）。

7.7.3 试验期间，至少应定期进行 5 批次以上分析检测。试验周期超过 1 个月的，至少每周测定 1 次。每次至少测定 1 个重复中的试验液浓度，各重复轮流采样。

7.7.4 分析用样品采集后，应进行过滤（例如 0.45μm 滤膜）或离心处理。若测定浓度超出设定浓度的

80%-120%范围，流水式试验中以测定浓度的算术平均值表示有效浓度，半静态试验中以测定浓度的几何平均值表示有效浓度。

## 7.8 观察与测定

7.8.1 试验开始时，应记录胚胎发育所处的时期，并保存部分清洁的受精卵作为观察样本。

7.8.2 试验期间，应每天观察并记录受试鱼的孵化数与存活数，并将死亡个体移走。胚胎发育早期（试验开始一两天内）出现真菌感染的卵也应移除并记录。移走死亡个体时应避免磕碰周围的卵/仔鱼。

7.8.3 判断受试鱼死亡的标准是：

——卵：半透明状消失，变白。

——胚胎、仔鱼和幼鱼：出现静止不动、无呼吸运动、无心脏跳动、对机械刺激无反应等一种或多种症状。

7.8.4 试验期间，应每天记录受试鱼出现畸形或异常的数量。当畸形或异常个体表现出极大痛苦且无恢复的可能时，可将其从试验容器中移走并进行安乐死处理。后续数据分析中该类个体视为死亡个体。

7.8.5 试验期间，应每天记录受试鱼的异常行为，如呼吸急促、游动失调、反常的静止或异常摄食等。

7.8.6 试验结束时，按照一个重复（试验容器）为一组，记录受试鱼的存活数，称重，并计算平均体重。推荐测定湿重（吸干水分后称量），也可测干重。

7.8.7 试验结束时，逐一测量受试鱼的鱼体长度。宜测定全长，出现尾鳍腐烂或蚀损等情况时例外，可选择测定标准长。测量工具可选用卡尺、数码相机、校准过的目镜测微尺等。典型的体长数据见附录 B。

## 8 数据处理

8.1 根据方差齐性、正态分布性检验结果，选用合适的统计方法，对处理组与空白对照组之间的差异进行比较，参见附录 D。所有的统计分析过程均以单个试验容器中（即不同处理组的各个重复）的试验数据作为基础数据。

8.2 当毒性效应数据呈现为单调性浓度-效应关系，且服从二项式分布时，可采用 Rao-Scott 改良的 Cochran-Armitage 检验、William's 检验、Dunnett's 检验(对数据进行正弦平方根转换后)、Jonckheere-Terpstra 检验等方法进行比较；否则，采用 step-down Jonckheere-Terpstra 检验、Williams 检验方法（对于连续变量），或者 step-down Cochran-Armitage 检验法（对于二分变量）。

8.3 当毒性效应数据呈现为非单调性浓度-效应关系时，对于连续变量，采用 Dunnett's 或 Dunn's 或 Mann-Whitney 检验方法，对于二分变量，采用 Fisher's Exact 检验方法进行比较。

## 9 质量控制

质量控制应同时满足以下条件：

——试验期间，溶解氧浓度应始终大于 60% 的空气饱和度；

——试验期间，水温应保持在受试鱼适宜的温度范围内（见附录 B），且水温变化范围不应超过  $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ；

——对试验液中的受试物浓度进行了分析测定；

——对照组和溶剂对照组（如有）中，受精卵的总存活率以及孵化后的存活率应大于或等于附录 B 中规定的限值。

## 10 试验报告

试验报告应至少包括以下内容：

### a) 被试物

——名称、标称值、剂型、样品批号、外观、重量、生产日期、有效日期、来样日期、生产企业、生产企业地址、储存条件等；

——有效成分的基本信息，包括中英文通用名称、美国化学文摘号（CAS 号）、化学名称、分子式、结构式、相对分子量、外观、溶解度、稳定性等内容，并注明出处。

### b) 对照物

——通用名称、化学名称、外观、纯度、来源、批号、生产日期、有效日期、接收日期、储存条件等。

### c) 受试鱼：

——名称、品系、大小、来源，受精卵的收集及其后续处理方法。

### d) 试验条件

——试验程序，如半静态法或流水式法，承载量等；

——光照周期；

——试验设计（例如处理组的数量，每个处理组的重复数，每个重复中的胚胎数，试验容器的材质和尺寸、每个容器中水的体积等）；

——贮备液制备方法，试验液更新频率（如使用了助溶剂，还须给出其名称及浓度）；

——被试物暴露方法（泵、稀释系统等）；

——分析方法的定量限、检出限、添加回收样品的标称浓度及其回收率、实测浓度平均值及其标准差等；

——试验浓度、平均实测值及其标准偏差

——试验用水特性如 pH 值、硬度、温度、溶解氧浓度、残氯量、总有机碳、悬浮颗粒物、盐度以及其他测量指标；

——试验期间水质情况如 pH、硬度、温度和溶解氧浓度等；

——饲喂信息（饲料种类、来源、饲喂量和饲喂频率）。

e) 试验结果

——空白对照组满足试验有效性标准的证据；

——不同阶段（胚胎、仔鱼、幼鱼）的死亡率及累积死亡率；

——孵化开始时间、结束时间，孵化期间每天的孵化数；

——试验结束时健康幼鱼数量；

——存活幼鱼的体长、体重数据；

——有关受试鱼形态异常的描述，发生率、症状等；

——有关受试鱼行为异常的描述，发生率、症状等；

——统计分析与数据处理方法；

——每种效应的无可见效应浓度（*NOEC*）；

——每种效应的最低可见效应浓度（*LOEC*）（ $p=0.05$ ）；如可能，计算每种效应的  $EC_x$  和置信区间（如 90% 或 95%），并报告所用的统计模型、浓度效应曲线斜率，回归模型公式，模型参数估计值及其标准误差；

——试验偏离；

——结果讨论。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**试验用水的水质指标**

关于试验用水的水质指标见表 A.1。

**表 A.1 试验用水的水质指标**

指标	限量浓度
颗粒物	5 mg/L
总有机碳	2 mg/L
非离子氨	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	50 ng/L
总有机氯	25 ng/L
铝	1 µg/L
砷	1 µg/L
铬	1 µg/L
钴	1 µg/L
铜	1 µg/L
铁	1 µg/L
铅	1 µg/L
镍	1 µg/L
锌	1 µg/L
镉	100 ng/L
汞	100 ng/L
银	100 ng/L

## 附录 B

### (规范性附录)

#### 推荐试验鱼种的试验条件、试验周期和存活率标准

关于推荐试验鱼种的试验条件、试验周期和存活率标准见表 B.1。

**表 B.1 推荐试验鱼种的试验条件、试验周期和存活率标准**

受试鱼种		试验条件			推荐试验周期	试验结束时对照组鱼的最短全长标准 <sup>a</sup> (mm)	对照组存活率 (最低要求)	
		温度 (°C)	盐度 (‰)	光周期 (h)			孵化存活率 (%)	孵化后存活率 (%)
淡水鱼	虹鳟	10±1.5 <sup>b</sup>	-	12-16 <sup>c</sup>	对照组鱼自由取食后 2 周 (或孵化后 60 d)	40	75	75
	胖头鲮	25±1.5	-	16	试验开始后 32 d (或孵化后 28 d)	18	70	75
	斑马鱼	26±1.5	-	12-16 <sup>d</sup>	孵化后 30 d	11	70	75
	青鳉	25±2	-	12-16 <sup>d</sup>	孵化后 30 d	17	80	80
海水鱼	杂色鲷	25±1.5	15-35 <sup>e</sup>	12-16 <sup>d</sup>	试验开始后 32 d (或孵化后 28 d)	17	75	80
	月银汉鱼	22-25	15-35 <sup>e</sup>	13	28 d	20	80	60

<sup>a</sup> 鱼的最短体长不是有效性标准，但低于此数据，应评估受试鱼的敏感性；

<sup>b</sup> 虹鳟在其他温度范围下进行试验时，应保证亲鱼和鱼卵的温度相同。如购买鱼卵进行试验，则鱼卵应在到达实验室后至少在试验温度下适应 1-2 小时；

<sup>c</sup> 虹鳟幼鱼应在黑暗下培养至孵化后一周（观察时间除外），然后保持 12-16 小时光照周期至试验结束；

<sup>d</sup> 试验过程中光照周期应保持一致；

<sup>e</sup> 试验过程中盐度变化范围应保持在±2‰。

**附录 C**  
**(资料性附录)**

**试验鱼种的亲鱼、仔鱼和幼鱼的喂食方案以及仔鱼转移时间**

关于试验鱼种的亲鱼、仔鱼和幼鱼的喂食方案以及仔鱼转移时间参见表 C.1。

**表 C.1 试验鱼种的亲鱼、仔鱼和幼鱼的喂食方案以及仔鱼转移时间**

鱼种		饲料类型 <sup>a</sup>				孵化后转移时间	初次饲喂时间
		亲鱼	初孵仔鱼	幼鱼	饲喂频率		
淡水鱼	虹鳟	专用饲料	不饲喂	开口饲料, BSN <sup>c</sup>	2次 - 4次/d	孵化后 14d -16 d 或 开始游泳时 (可选项)	孵化后 19 d 或开始游泳时
	胖头鲮	BSN, 片状食物, FBS <sup>b</sup>	BSN	BSN48 <sup>d</sup> , 片状食物	2次 -3次/d	孵化率达到 90%	孵化后 2d
	斑马鱼	BSN, 片状食物	商业仔鱼饲料, 原生动 物, 发酵蛋白颗粒	BSN48, 片状食物	BSN, 一天一次, 片状饲料, 一天两次	孵化率达到 90%	孵化后 2d
	青鳉	片状食物	BSN, 片状饲料 (或原生动物/ 轮虫)	BSN48, 片状食物 (或轮虫)	BSN 一天一次, 片状饲料一天两次, 或片状饲料和轮虫一天一次	不适用	产卵后 6d -7d
海水鱼	杂色鲷	BSN, 片状食物, FBS	BSN	BSN48	2次 - 3次/d	不适用	孵化后 1d 或开始游泳时
	月银汉鱼	BSN48, 片状食物	BSN	BSN48	2次- 3次/d	不适用	孵化后 1d 或开始游泳时

<sup>a</sup> 视情况饲喂, 饲喂后多余的饲料残渣和排泄物应及时移除, 避免废物堆积;  
<sup>b</sup> FBS: 冷冻丰年虾;  
<sup>c</sup> BSN: 新孵化丰年虾;  
<sup>d</sup> BSN48: 孵化 48h 的丰年虾。

**附录 D**  
**(资料性附录)**  
**统计分析方法**

**D.1 概述**

所有的统计分析过程均以不同处理组的各个重复（单个容器）为基础数据单元。对于连续变量（例如体长、体重），计算各重复的平均值或中值后再用于分析。重复内或重复间试验数据的变异系数（CV）应满足表 D.1 要求。

**表 D.1 不同鱼种的变异系数要求**

鱼种	测试指标	重复内变异系数 (CV)	重复间变异系数 (CV)
		(%)	(%)
虹鳟	体长	17.4	9.8
	体重	10.1	28
胖头鲮	体长	16.9	13.5
	体重	11.7	38.7
斑马鱼	体长	43.7	11.7
	体重	11.9	32.8

**D.2 溶剂对照组数据**

设置了溶剂对照组时，首先应采用 T 检验或 Mann-Whitney 检验对溶剂对照组和空白对照组的各个统计指标（体长、体重、卵孵化率或幼虫死亡率或异常幼鱼发生率，孵化/游泳的第一天或最后一天等）进行差异显著性比较（ $p=0.05$ ）。当差异不显著时，将两组数据进行合并处理；差异显著时，则仅使用溶剂对照组数据进行统计分析。

**D.3 NOEC 统计（体长、体重数据）**

D.3.1 该类数据主要是各个重复的体长、体重等，NOEC 统计方法见图 D.1。统计分析前，先对试验数据是否属于单调浓度-效应关系进行直观判断。然后，根据试验数据是否服从正态分布、方差是否齐性选择适宜的统计检验方法，以比较处理组与空白对照组之间的差异。正态分布与方差齐性检验可通过方差分析（ANOVA）或列联表方法进行，例如使用残差直方图/茎叶图、散点图进行直观判定，或采用 Shapiro-wilk 方法/ Anderson-Darling 方法、Levene's 方法等。

D.3.2 当数据（或经转换后的数据）服从正态分布且方差齐性时，选择参数检验方法，例如 step-down Jonckheere-Terpstra 检验、Williams 检验、Dunnnett 检验等方法；否则，推荐采用 Dunn's 检验、Mann-Whitney 检验、Tamhane-Dunnnett 检验等方法。

D.3.3 应关注数据异常值并分析其对统计结果的影响。异常值的判断可采用 Tukey 离群值测试法或通过上述残差直方图/茎叶图、散点图进行直观判断。剔除离群值时应谨慎。

#### **D.4 NOEC 统计（孵化、存活数据）**

D.4.1 该类数据主要是各个重复中的卵孵化率、幼鱼存活率等，NOEC 统计方法见图 D.2。统计分析前，先对试验数据是否属于单调浓度-效应关系进行直观判断。然后，根据试验数据是否服从二项式分布 (Tarone's C( $\alpha$ )) 检验或卡方检验 (Chi-square test) 选择统计检验方法，比较处理组与空白对照组之间的差异。

D.4.2 当毒性效应呈现为单调浓度-效应关系且不具备明显的二项式分布特征时，采用 step-down Cochran-Armitage 检验法，符合二项式分布特征时，则采用 Rao-Scott 改良的 Cochran-Armitage 检验。此外，还可采用 step-down Jonckheere-Terpstra 检验或 Williams 检验（数据进行平方根反正弦转换后）。

D.4.3 当（进行平方根反正弦转换后）试验数据呈现为非单调浓度-效应关系且服从正态分布、方差齐性时，采用 Dunnett 检验方法，否则，采用 Dunn's 检验或 Mann-Whitney 检验方法。

#### **D.5 NOEC 统计（孵化开始时间、结束时间）**

通常采用 step-down Jonckheere-Terpstra 检验。但当数据呈现为非常明显的非单调浓度-效应关系时，也可采用 Dunn's 检验。

#### **D.6 NOEC 统计（异常个体）**

通常采用 step-down Jonckheere-Terpstra 检验。但当数据呈现为非常明显的非单调浓度-效应关系时，也可采用 Dunn's 检验。

#### **D.7 EC<sub>x</sub> 统计**

如可能，采用合适的回归分析方法计算  $EC_{10}$  /  $EC_{20}$  /  $EC_{50}$  及其置信区间。

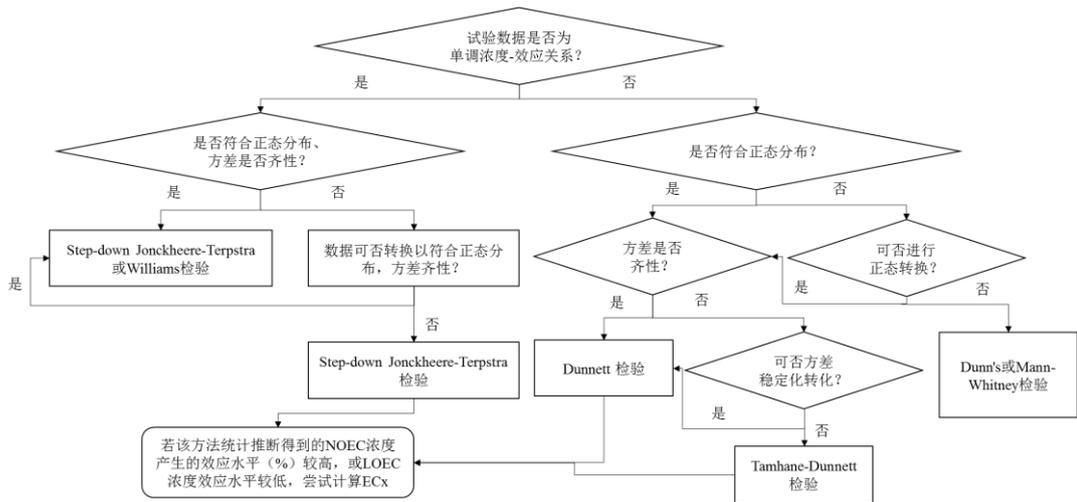


图 D.1 NOEC 统计流程图 (体长、体重指标)

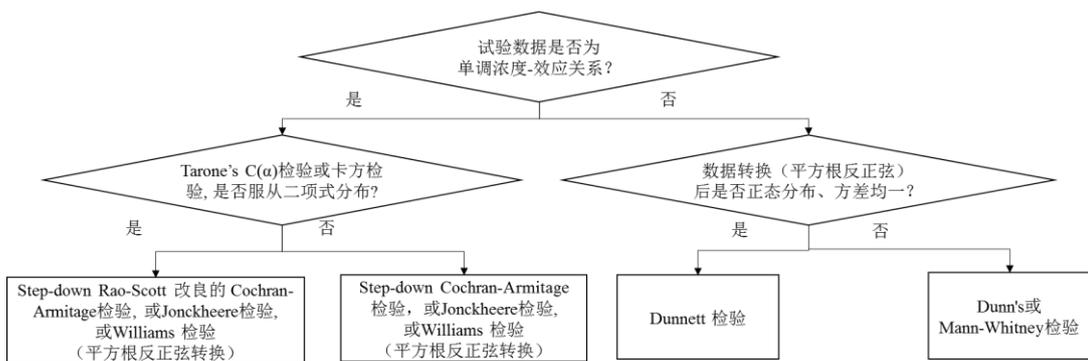


图 D.2 NOEC 统计流程图 (孵化、存活数据指标)

## 参 考 文 献

- [1] Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals: Fish, Early-life Stage Toxicity Test (2013).
-