



中华人民共和国国家标准

GB/T 21809—2008

化学品 蚯蚓急性毒性试验

Chemicals—Test method of earthworm acute toxicity test

2008-05-12 发布

2008-09-01 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

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 207(1984 年)《蚯蚓 急性毒性试验》。

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:中国检验检疫科学研究院。

本标准参加起草单位:辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:于文莲、陈会明、王军兵、周新、郝楠、刘海波、周川、刘卫东、孙鑫、王峥。

化学品 蚯蚓急性毒性试验

1 范围

本标准规定了化学品蚯蚓急性毒性试验的受试物信息、方法概述、仪器设备、试验方法、数据与报告。

本标准适用于评价化学品的蚯蚓急性毒性。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

半数致死浓度 LC₅₀

在测试期间使 50% 供试生物死亡的受试物浓度。

在试纸接触试验中,受试物以 mg/cm² 来表示;在人工土壤试验中以 mg/kg (干重) 表示。

3 受试物信息

- a) 水中溶解度;
- b) 蒸气压;
- c) 结构式;
- d) 纯度;
- e) 在水、土壤和光中的稳定性;
- f) 正辛醇/水的分配系数(P_{ow});
- g) 快速生物降解试验结果。

4 方法概述

4.1 简介

本方法适用于溶于水和不溶于水的物质,但是测试方法不同。

测试化学品对蚯蚓的毒性有许多方法,包括点施,强制饲喂和全浸试验。本方法包括二个试验方法:滤纸接触毒性试验和人工土壤试验。

简单的滤纸接触毒性试验作为预试验,可得出土壤中受试物对蚯蚓的可能毒性,决定是否需要进一步的人工土壤试验。

接触试验简单,易于操作,使用推荐生物的试验结果具有可重复性。人工土壤试验得出的毒性数据能代表蚯蚓在化学品自然暴露下的情况。

对照组的死亡率在试验结束时不能超过 10%,试验是有效的。

4.2 参比物

为测定 LC₅₀ 应选定一个参考物质,以确保试验室测试条件是足够的且没有显著改变。氯乙酰胺 (Chloracetamide) 是合适的参照物。

4.3 试验原理

预试验 (滤纸接触毒性试验) 将蚯蚓与湿润纸上的受试物接触,识别出对土壤中蚯蚓的潜在毒性化

学品。

人工土壤试验系将蚯蚓置于含不同浓度受试物的人工配制土壤中,7 d 和 14 d 后,评价其死亡率。其中应包括使生物无死亡发生和全部死亡的两个浓度组。

4.4 试验有效性

对照组的死亡率在试验结束时不能超过 10%,试验是有效的。

5 仪器设备

5.1 试验室常规仪器设备和特殊设备:

——蚯蚓养殖(见附录 A);

——滤纸:80 g/m²~85 g/m²,厚度 0.2 mm 左右,中级;

——人工土壤试验基质。

泥炭藓灰 10%(pH 值尽可能接近 5.5~6.0,无明显植物残体,磨细,风干,测定含水量);

高岭黏土 20%(高岭石质量分数大于 30%);

石英砂 70%(50 μm~200 μm 粒径的细砂质量分数在 50%以上);

加入碳酸钙调 pH 值为 6.0±0.5(见参考文献[6]);

以正确比例混合人工土壤的各个干燥组分。为了混合均匀,可采用大型试验室搅拌器或小型水泥电动搅拌机。然后取少量上述样品置于 105℃ 条件下烘干称重,测定其含水量。加入去离子水使其含水量达到干重的 35%左右,混合均匀。混合物不能过湿,当挤压人造土壤时不能有水分出现。

——玻璃容器:结晶皿,或加有盖玻璃或具孔塑料板的 1 L 烧杯。

——培养装置:光照度 400 lx~800 lx,温度控制±2℃的培养箱。

5.2 试验生物

推荐的蚯蚓品种是赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* (Michaelsen),虽然这种蚯蚓不是典型的土壤品种,但它存在于富含有机质的土壤中,对化学物质的敏感性与真正栖息在土壤中的蚯蚓类似,其生命周期短,在 20℃ 的条件下,孵化需要 3~4 周,7~8 周即可发育成熟。它繁殖能力强,一条蚯蚓可以在一周内产 2~5 个蚓茧,每个蚓茧可孵出几条蚯蚓。它易于在含各种有机废物的土壤中饲养,蚓茧容易购得或从一个来源分发,这有利于确保采用同一品系(见附录 A)。

赤子爱胜蚓存在两个分支,有些分类学家将其分开(见参考文献[1]),其形态很相象,但 *E. foetida foetida* 的环节上有一典型的横纹或环带,而 *E. foetida andrei* 则没有,但带有斑驳的红色。如果可能宜采用 *E. foetida foetida*。当必须使用某种方法时,也可以使用其他品种。

选择二月龄以上,体重 300 mg~600 mg 的健康蚯蚓供试验用。

6 试验方法

6.1 滤纸试验

采用长 8 cm,直径 3 cm 的平底玻璃管。内壁衬铺滤纸,滤纸的大小以不重叠为宜。

受试物溶于水(溶解度大于 1 000 mg/L)或适宜的有机溶剂(如丙酮、正己烷、氯仿),在已知浓度范围内配成浓度系列溶液。用移液管向每个玻璃管移入 1 mL 受试物溶液,用过滤的压缩空气吹干,气体流速不要太快。在干燥过程中,水平旋转玻璃管(对不易溶解于水或有机溶剂中的物质必须重复几次上述过程),以获得试验所需的受试物在滤纸上的沉积量。对照组用 1 mL 的去离子水或有机溶剂处理。干燥后在每一玻璃管内加 1 mL 去离子水以湿润滤纸,用留一小孔的塞子或塑料薄膜封住玻璃管口。

在正式试验之前,应预先进行选择浓度范围的试验,浓度设计见表 1:

表 1 滤纸接触法预试验浓度设计

受试物在滤纸的沉积量/ (mg/cm ²)	受试物浓度/ (g/mL)
1.0	7×10^{-2}
0.1	7×10^{-3}
0.01	7×10^{-4}
0.001	7×10^{-5}
0.000 1	7×10^{-6}

正式试验应设置 5 个以上按几何级数增加的试验浓度组。

每试验浓度应至少设 10 个以上重复,每个玻璃瓶只能放置 1 条蚯蚓,因为同一管内蚯蚓的死亡可能对其他蚯蚓造成有害影响。精密度试验应进行 20 个重复。每一个试验浓度水平范围应使用 10 个控制管。

为了使蚯蚓排出肠内的内含物,在试验开始前,先将蚯蚓置于湿润的滤纸上 3 h,然后冲洗,用滤纸吸干,供试验用。

将玻璃管并排置于盘内,温度控制在 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,试验在黑暗条件下进行 48 h,亦可延长至 72 h,观测记录蚯蚓死亡情况。

判别蚯蚓死亡的标准是当蚯蚓前尾部对轻微机械刺激没有反应即以死亡计,同时观察报告蚯蚓的病理症状和行为。

6.2 人工土壤试验

在正式试验之前,一般需预先进行选择浓度范围的试验,按几何级数设置 5 种不同浓度组,如 0.01 mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kg、10 mg/kg、100 mg/kg 和 1 000 mg/kg (人工土壤、干重)。

6.2.1 试验介质处理

在试验开始前,将受试物溶于去离子水,然后与人工土壤相混合或者用精细的层析喷头或类似的喷头喷到土壤中。

倘若受试物不溶于水,可使用尽可能少量的有机溶剂(如正己烷、丙酮、氯仿等),溶剂必须是可挥发性的。若受试物既不可溶,也不可分散或乳化,可将一定量的受试物与石英砂混合,其总量为 10 g,然后在试验容器内与 740 g 湿的人工土壤混合,总量为 750 g。当只能采用易挥发性有机溶剂溶解、分散和乳化受试物时,在试验开始之前,应将溶剂全部挥发,应补充蒸发的水量。对照组须接受任何同样同量的处理。

6.2.2 试验步骤

对于每一试验,在玻璃容器中加入 750 g 湿重的试验介质和 10 条蚯蚓。这些蚯蚓在试验前已在人工土壤环境中饲养 24 h,在使用之前将蚯蚓冲洗干净,放在试验介质表面。用具孔的塑料板盖好容器以防试验介质变干。

每一处理组和对照组应有 4 个平行样。每一试验应用各有 10 条蚯蚓的 4 个结晶皿,进行相同的溶剂对照试验。

整个试验期为 14 d,在 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度 80% 的条件下培养,并提供连续光照(以保证试验期间蚯蚓始终生活在试验介质中)。

试验在第 7 天和第 14 天评估蚯蚓死亡率,应记录观察到的异常行为或病理症状。第 7 天将培养瓶内的试验介质轻倒入一玻璃皿或平板,取出蚯蚓,检验蚯蚓前尾部对机械刺激的反应,检查结束后,将试验介质和蚯蚓重新置于培养瓶中继续培养。14 d 时再进行相同的检查。

试验结束时,应分析和报告试验介质的含水率。

7 数据与报告

7.1 数据处理

将死亡率和受试物浓度数据应在对数-概率纸上作图,计算 LC_{50} 和置信限(见参考文献[3]),也可使用其他概率计算的方法。

当两个连续浓度的死亡率为 0 和 100%,并呈几何级数(比率最大为 2.0),这两个水平可充分指出 LC_{50} 范围。

7.2 试验报告

试验报告应包括:

7.2.1 受试物:化学特性、施用方法。

7.2.2 供试生物:年龄、饲养和繁殖条件、来源。

7.2.3 试验条件:详尽描述所有试验材料和试验条件以及任何改变。

7.2.4 试验介质的准备情况。

7.2.5 结果:

——每一处理在试验开始和结束时,存活蚯蚓的平均体重和数量;

——在试验过程中蚯蚓的详细生理和病理症状或异常行为记录;

——测定 LC_{50} 的方法,数据和结果;

——浓度-效应曲线图;

——对照组的死亡率;

——参照物和受试物的死亡率;

—— LC_{50} 及所有用于计算的数据;

——人工土壤在试验开始和结束时的湿度,以及开始时的 pH 值;

——死亡率为 0 的最高浓度;

——死亡为 100% 的最低浓度。

附 录 A
(资料性附录)
试验动物的饲养

Eisenia foetida 可在许多动物废弃物中繁殖。推荐的繁殖介质为马粪或牛粪与泥炭以 50 : 50 混合,其他动物废弃物也适用;介质的 pH 值为 7 左右、低离子电导率(低于 6.0 mS)和不能受到氨或动物尿的过度污染。

木制饲养箱规格为 50 cm×50 cm×15 cm,上面用合适的盖子盖紧。在 6 周的时间内可繁殖 1 000 条蚯蚓。为生产足够的蚯蚓,介质能在 20 kg 的废物中养殖高达 1 kg 的蚯蚓,以及每一个蚯蚓将重达 1 g。为获得蚯蚓标准的年龄和体重,最好是在 20℃开始培养蚓茧,3 周~4 周孵化,7 周~8 周成为成熟的蚯蚓。

参 考 文 献

- [1] M. B. Bouché, *Lombriciens de France, Ecologie et Systématique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique(1972).
 - [2] C. A. Edwards and J. R. Lofty, *Biology of Earthworms*, 2nd Edition, Chapman and Hall, London(1977).
 - [3] J. T. Litchfield and F. Wilcoxon, *Journal of Pharmacol. Exper. Ther.* 96. 99~113(1949).
 - [4] C. E. Stephan, in *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F. L. Mayer and J. L. Hamelink) pp. 66-84, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials(1977).
 - [5] C. A. Edwards, *Development of a Standardized Laboratory Method for Assessing the Toxicity of Chemical Substances to Earthworms*, Report EUR 8714EN, Commission of the European Communities(1983).
 - [6] *The Analysis of Agricultural Materials*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book 427, HMSO, London(1981).
-