

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

## 农药室外模拟水生态系统（中宇宙） 试验准则

Pesticide—Guideline for outdoor simulated aquatic ecosystem (mesocosm) 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 NO.53（2006年）《模拟静态淡水田间试验（室外微宇宙和中宇宙）》（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。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位：农业部农药检定所，沈阳化工研究院安全评价中心

本标准主要起草人：

# 农药室外模拟水生态系统（中宇宙）试验准则

## 1 范围

本标准规定了农药室外模拟水生态系统（中宇宙）试验材料与条件、试验设计与操作、质量控制、数据处理、试验报告等环节的基本要求。

本标准适用于室外静态中宇宙系统，或小型自然生态系统中的近岸围隔，不适用于室内、实验室或“台式”微宇宙，以及流动系统。

## 2 规范性引用文件

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

NY/T 2882.2 农药登记 环境风险评估指南 第2部分：水生生态系统

De Jong, F.M.W., Brock, T.C.M., Foekema, E.M., Leeuwangh, P. Guidance for summarizing and evaluating aquatic micro- and mesocosm studies. RIVM Report.

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**水生中宇宙** aquatic mesocosm

人工模拟的多物种试验系统，用来评估农药对水生生物的生态毒性影响。该水生态系统可包括植物、动物和微生物。

### 3.2

**无可见效应浓度（种群）** no-observed effect concentration (population)

在一定暴露期内，对于所关注的生物种群，与对照组相比无明显影响的最高供试物浓度，用 NOEC 表示。

注：单位为毫克有效成分每升（mg a. i. /L）。

### 3.3

**无可见效应浓度（群落）** no-observed effect concentration (community)

在一定暴露期内，对于所关注的生物群落，与对照组相比无明显影响的最高供试物浓度，用 NOEC<sub>群落</sub>表示。

注：单位为毫克有效成分每升（mg a. i. /L）。

### 3.4

**无可见生态不良效应浓度** no observed ecologically adverse effect concentration

等于或低于该浓度不会在中宇宙研究中观测到持久不良效应，用NOEAEC表示。供试物在该浓度水平下对中宇宙水生态系统中的生物产生了短期显著效应，但总影响时间< 8周。

注：单位为毫克有效成分每升（mg a. i. /L）。

### 3.5

**x%效应浓度** effect concentration for x% effect, EC<sub>x</sub>

在一定暴露期内，与对照组相比引起所关注的生物种群/群落x%某种生物效应的供试物浓度。

注：单位为毫克有效成分每升（mg a. i. /L）。

## 4 试验概述

通过收集生物并放置到人工水槽/池塘或既有水生态系统的围隔中，建立中宇宙以模拟自然水生态系统。试验系统通常为一个“自然”长成的水生群落，包含本土沉积物和适宜的生物，如浮游动植物、中上层及底栖大型无脊椎动物、大型植物等。也可适当添加外源生物，例如鱼。

将供试物添加至中宇宙系统中开始试验。基于前期风险评估中已识别的具有潜在风险的生物类型，选择合适的结构性测试端点和功能性测试端点。在试验前一段时间（如-14 d, -7 d, 0 d）以及试验期间，定期采样，对试验系统中的各类测试端点进行调查。结构性端点主要指种群丰度、生物量及其空间分布，生物学分类和营养层级。功能性端点主要指受结构影响的所有非生物指标，如营养水平、氧含量、呼吸率、矿物质浓度、pH值、电导率和有机质含量等。在非除草剂类农药的中宇宙试验中，功能性指标也可作为测试条件而非测试端点。当试验以考察生物恢复情况获得NOEAEC为目的时，试验周期通常至少需持续到最后一次施用供试物8周后。

基于各生物种群测试指标、生物群落结构指标、功能性指标/水质条件等测试端点随着时间变化对供试物的响应情况，确定每个采样日的NOEC<sub>种群</sub>、NOEC<sub>群落</sub>等，如可能，依据生物种群恢复情况，确定NOEAEC。或者，通过回归模型估算各测试端点的EC<sub>x</sub>（如EC<sub>50</sub>）。

## 5 试验方法

### 5.1 试验条件与材料

#### 5.1.1 中宇宙系统的建立

室外中宇宙试验研究可采用人工水槽或池塘进行，也可通过在既有生态系统中设置围隔进行。建议构建一个或多个“供体池塘”，作为中宇宙试验系统中底泥、水和生物的共同来源。建设中宇宙既可使用自然基质，也可使用惰性材料，例如混凝土（适当封闭）、纤维类、树脂玻璃或不锈钢。中宇宙系统还可内衬惰性塑料，以防止系统与周围环境之间发生水交换。应避免增塑剂进入试验水体，必要时可使用环氧油漆。试验体系上空应覆盖防虫网，避免大型禽类如鹭或鸭的干扰。也可将小型试验系统部分埋于地下或浸入池塘以缓冲日温波动。

关于中宇宙系统的规模参见附录A。关于试验体系中各组成要素（底泥、水和生物）的详细描述，见本标准5.1.3.1 ~ 5.1.3.3部分。

#### 5.1.2 中宇宙系统的再利用

中宇宙系统如何再次利用取决于前一试验中供试物的化学特性（尤其是持久性）和系统中的生物状况。对于非持久性物质，如已证明水体和底泥中无前一供试物残留、且试验体系各水槽/池中的生物易于恢复到彼此非常接近的状态，此时中宇宙系统可重新利用。否则，应将系统中的水排干，空置一段时间；或清除原系统并重新植入新的底泥。

#### 5.1.3 中宇宙系统的培养

##### 5.1.3.1 底泥

底泥可从“供体池塘”中采集，也可从自然系统中采集（底泥或土壤）。采自清洁地区的底泥通常已包含丰富的植物群和动物群，这些固有生物可用于建立池塘生物群落。若使用土壤，可将土壤充分老化（通常需浸泡3个月以上），使其具有与水体中底泥相类似的性质，同时接种少量水体底泥以适当发展微生物群。应避免引入可能干扰试验的生物，例如鱼类、高侵害性或外来大型植物等。

应对底泥进行化学残留分析（包括重金属分析）、粒径分布与有机质含量分析，如可能，进一步分析氮/磷（N/P）含量、阳离子交换量、pH等。

向中宇宙系统中先加入底泥，再加入水。加入底泥前应充分混和，使底泥中的各类物质及底栖生物分布均匀。底泥厚度应大于 5 cm。

##### 5.1.3.2 水

试验用水可部分或全部采自底泥与生物采集地。试验用水应进行化学残留、营养水平、pH、硬度、溶解氧含量及浊度分析。向试验系统中加水时应尽量平缓，以使沉积物尽快稳定。

当中宇宙系统规模较大，或者各中宇宙水槽/池中的生物群落差异较大时，可进行水循环。试验开始前一段时间（至少在试验前1周）应停止水循环，以保证试验体系相对稳定。施药后不再进行水交换。

试验期间，中宇宙系统中水位变化范围应保持在初始水位的20%以内。对于从系统中挥发的水分，应及时补充。在多雨季节，可采取遮盖措施防止水从系统中溢出。紧急情况下，可将水舀出。如果在施药后将水舀出，应估算移走的药量（依据舀出的水体积推算，或者进行化学分析）。

#### 5.1.3.3 生物

中宇宙试验系统通常是一个自然生长的水生物群落，包括浮游动物、浮游植物、着生生物、细菌、大型植物、浮游/底栖大型无脊椎动物等。为了满足研究目标，可适当加入外源生物。中宇宙试验通常重点关注经初级风险评估甄别的具有潜在风险的生物。关于生物类型及其在试验系统中的详细要求，参见附录B。

#### 5.1.3.4 老化培养

施药前中宇宙系统应老化培养一段时间，使生物群落中的各类生物种群在年龄及性别结构上可代表田间实际。老化时间与中宇宙系统规模及其水、底泥有关。试验开始前（如-14 d、-7 d、0d）应采集样品以评价试验系统是否适于开展试验。试验前，中宇宙系统应具有足够程度的生物多样性以满足研究目标要求，且各重复间保持一定的均一性。

#### 5.1.4 供试物

农药原药或制剂，取决于前期试验与评估结果，以及试验研究目的。必要时，还应考虑可能的供试物的主要代谢物的相关信息。

#### 5.1.5 施药时间

施药时间选择取决于实际暴露场景，一般应以春天和仲夏为宜。春天和仲夏时节试验系统最为敏感，适于模拟现实最坏情况，同时，可观察种群恢复情况的时间也较长。

#### 5.1.6 试验周期

试验周期取决于试验目的、农药的环境归趋特征、敏感种群恢复时间等。试验周期应足够长以观察受影响的生物种群的恢复情况。当试验以考察生物恢复情况获得NOEAEC为目的时，从最后一次施用供试物开始，试验持续时间通常应不少于8周。

## 5.2 试验设计

### 5.2.1 处理组与重复

中宇宙试验中，除对照组外，一般应至少包括三个处理组（五个更佳），每个处理组至少两个重复。在此原则下，浓度数和重复数可根据试验目的做适当调整。当研究目的为获得某些重点关注物种的EC<sub>x</sub>时，可视需要增加浓度数，减少重复数。此类情况下，可进行浓度密集的预试验以确定关键测试端点产生10%-90%效应的浓度水平。当研究目的为获得NOEC时，可减少浓度数而增加重复数，以更好地应用统计学方法获取可靠的测试端点，例如，设置3个处理组，每个处理组3个重复；当研究目的为考察生物种群恢复、获得NOEAEC时，可设置5个处理组，每个处理组2个重复（对照组重复数应至少3-4个）。对某个变量的试验设计不一定适合于其它变量，应重点关注关键的测试端点。

试验前应确定统计分析方法。至于试验浓度是完全随机分配还是限制性随机分配（例如以重复为区组）至各中宇宙试验单元，取决于试验目的。同时，试验中应尽量避免化学物质交叉污染。

### 5.2.2 浓度水平

根据前期试验及评估结果选择合适的试验浓度，通常需包括可能产生影响的浓度，如可能，还应包括最大预测环境浓度(PEC)。浓度设定至少应包含一个不会产生明显生态效应的浓度和一个会产生显著效应的浓度。

### 5.2.3 暴露方案

根据供试物的化学性质、施用方式、暴露途径、以及试验目的等选择合适的暴露方案，包括载荷（添加的供试物量）、施药频率等。施药次数的选择参见附录C。

### 5.2.4 采样方案

采样方案取决于试验目的、农药性质及其在中宇宙系统中的预测分布情况等。基于初级阶段试验所获得的核心物种生态毒性数据，以及其它高级阶段的研究结果（如扩展的单一物种测试、种群水平的研究、室内多物种测试等），确定采样的目标生物，样本量大小和采样方法（例如，水生生物物种敏感度分析有助于确定需进行相对详细调查的种群和群落）。

典型中宇宙试验中测试端点的采样方法与频率参见附录D。根据供试物的类型，某些参数的采样频率可进行适当调整。所有样品包括化学分析样品、浮游植物/浮游动物/底栖无脊椎动物样品的采样时间应尽可能彼此接近，以加强对这些变量的关联预测分析。

### 5.2.5 种群恢复

评估敏感生物的种群恢复速度与程度时，应综合考虑和了解该生物的生活史、扩散机制及其与暴露方式、试验系统之间的相互作用，例如，当在某些羽化生物(如某些蜉蝣物种) 的主要繁殖期或繁殖期后进行施药时，或者正常的季节性变化导致受影响的生物（如浮游植物）从对照组和处理组消失时。可通过功能参数（如生产力）、种群/群落在胁迫下可能产生的适应性与耐受力增加等辅助了解“恢复”情况。有时还需进一步开展特定试验以确定其是否具有恢复潜力（例如，将试验系统中的水和底泥带回实验室进行生物测试；将生物装进笼子放入中宇宙系统中，以测试生态系统何时适于该生物生存、生长和繁殖等）。

### 5.2.6 化学分析

根据农药理化性质和环境归趋特征（例如，溶解度、蒸气压、正辛醇/水分配系数、吸附系数、水解和光解速率、生物降解性等），结合生态效应信息，确定化学分析样品的采集时间。必要时，还可利用化学物质输入与归趋模型或田间试验结果，预测供试物加载浓度及其在不同介质/分层中的暴露浓度。上述信息有助于识别中宇宙系统中风险最大的生态因素。试验前，应建立分析方法并进行方法验证。

## 5.3 试验操作

### 5.3.1 供试物施用

待中宇宙系统稳定后即可施用供试物。施用方法与毒理学试验方法相类似，直接将供试物添加到水中，通过混合使供试物达到均匀分布。暴露浓度以供试物在水中的浓度来表示。

### 5.3.2 难溶性物质的施用

当供试物难溶于水需使用助溶剂时，各处理组和对照组中溶剂的使用量应一致。

### 5.3.3 样品采集与测定

#### 5.3.3.1 采样位点

当试验中需同时测定多个测试端点，应分类安置特定的采样/测定所需的采样位点，以避免交叉影响或相互干扰。水样采集应确保不会明显改变中宇宙系统的体积，生物样品采集应不会导致其生物量明显降低一个水平，或者改变中宇宙系统中的食物链营养关系。当系统中存在自由活动的鱼时，可每天或者每周进行观察，直到试验结束时才收集样品，或将鱼进行标记（例如，采取电子标签或者笼装方式），反复采集样品并测定生长指标。

#### 5.3.3.2 浮游植物和浮游动物



浮游生物样品采集可使用柱状采样器。小型系统中，也可使用泵或者浮游生物过滤网。用泵采集浮游动物样品时，应确保浮游动物（尤其是较大型浮游动物）不会避开泵进水口。当系统中存在大型植物时，应采用特定技术采集浮游动物。采集时需整合不同深度的水样，或确保各重复之间的采样时间、采样深度保持一致。

采集的子样品可用于色素组成测定，或者物种分类与细胞计数。种群密度单位为个(或生物量)/单位体积。如可能，成年浮游动物可分类鉴定到种，其丰度单位为个/L。

#### 5.3.3.3 着生生物

着生生物测定一般采用色素法（主要是叶绿素a）替代生物量/生产力测定方法。植物色素样品的采集采用基质包括：“自然基质”（如大型植物表面）、无釉瓷砖、或者置于架子上的玻璃载玻片（提前2-4周置入系统中）。施用供试物后，将基质上刮下来的物质用于物种组成与丰度分析、色素生物量或不含灰的干重测定。

基质可视需要分批或一次性置入中宇宙系统中。可在施用供试物前置入大量基质（如载玻片），然后，定期取出并监测着生生物量、物种组成与净产量。基质类型会影响收集到的着生生物性质。

#### 5.3.3.4 初级生产力与异养组分

当预计某供试物（例如除草剂）会对藻类产生毒性时，应测定初级生产力。方法可选用氧气日波动情况测定方法（如，黑白瓶法估测生产量与呼吸量）、藻类/细菌分类方法。

#### 5.3.3.5 大型植物

当大型植物作为测试端点之一时（例如除草剂研究中），应建立子样品监测与生物量估测方法，并注意减少对系统的扰动。可将所关注的水生植物品种植入小盆钵，放置在底泥中或底泥表面，或者悬挂在水柱当中。取样时，可将整盆植物取出进行株高、生物量或者光合作用测定。也可试验期间通过视觉判断进行生物量测定，例如，绘图或摄影。对大型植物生长情况（如茎伸长）和生物量的监测应在夏末衰老期之前进行。

#### 5.3.3.6 大型无脊椎动物

大型无脊椎动物采集的方法包括：人工基质、网、直接采集底泥或者使用羽化捕获装置。采集底栖生物可使用专门设计的阱式工具。采集移动迅速的大型无脊椎动物可使用网具直接从水柱中捞取。小于10 m<sup>3</sup>的系统中不宜直接采集沉积物，建议中宇宙系统开始培养时即将沉积物装入盘子中，暴露一段时间后取出。

大型无脊椎动物数量以每个样品计。昆虫羽化速率则以单位时间内单位面积的昆虫数计。

#### 5.3.3.7 鱼

当试验中包含鱼类（对鱼类的要求参见附录B），试验开始时观察频率要高，以便及时发现死鱼和异常行为。

试验用鱼进入试验体系前应在中宇宙系统相同水质中至少驯养1周。驯养时，至少每天观察，并及时将死鱼移走。引入到中宇宙系统中的第1周，应替换掉因处理不当或疾病死亡的鱼。试验结束时，收集所有的鱼，计数、测量并称重。根据供试物性质和试验目的，试验期间也可采集几次鱼样品，进行生长指标测定，记录异常生长状态、外表损伤或异常等。当初级阶段风险评估表明供试物具有潜在富集性风险时，还可采集鱼的组织样品进行供试物残留分析。

关于中宇宙试验中鱼类生长和繁殖效应的测定，目前尚未形成标准技术方法。当试验目的为研究鱼类早期生活阶段发育毒性时，可从鱼受精卵或者幼鱼阶段开始试验。试验周期要综合考虑鱼的生物量承载力以及特定试验目的，例如考察供试物施用引起的鱼类对浮游动物的摄食反应、捕食转换，竞争行为引发的改变等。当试验目的为观察繁殖效应时，可加入低承载量的成鱼，使其产卵并收集后代。

#### 5.3.3.8 原位测试

原位测试指在水生中宇宙试验现场，在不破坏、不扰动或少扰动试验体系原有状态的情况下，通过试验手段测定特定的参数。原位生物测试既可反映供试物暴露带来的直接效应，也可反映间接效应（例如装在笼中的鱼），还可用于比较相同物种在实验室测试和中宇宙测试中对农药的响应情况。进行原位测试的生物不应在中宇宙系统中占优势地位。

### 5.3.4 分析测试

#### 5.3.4.1 水质分析

试验期间，应进行水质分析（包括溶解氧、pH、浊度等）和营养盐测定，以测定中宇宙系统中的生态系统功能。

#### 5.3.4.2 化学分析

##### 5.3.4.2.1 样品采集方法

试验期间应根据供试物不同的环境归趋研究目的，采集适当水体样品进行供试物浓度分析。当供试物在水-沉积物系统中的分配系数较高、沉积物中降解较慢、或者可能对底栖生物产生毒性时，应对沉积物中的供试物浓度进行分析。试验期间测定供试物随时间变化的暴露情况，可模拟供试物的降解和/或消散。当供试物具有生物富集性时，需采集大型无脊椎动物、羽化昆虫或者鱼类样品进行供试物残留分析。

通常在施药几小时后即应进行供试物浓度分析。应采集足够的垂直高度水体样品，混合后进行浓度分析，计算水体平均浓度。应在不同位置采集足够底泥样品并混合后进行浓度分析，以消除供试物在底泥中的空间分布差异性。

#### 5.3.4.2.2 样品采集频率

应在供试物的1-2个半衰期内至少采集3至4次样品，且在供试物消散达到90%之前应至少测定5次样品，以保证至少有5个点的数据进行供试物消解曲线的描述。之后浓度监测频率可降低。

#### 5.3.4.2.3 样品前处理

当实验室试验结果表明供试物在自然水体中会快速转化时，应立即加入合适的溶剂对采集的水样进行提取处理，或者将水样冷藏并尽快提取。沉积物样品应立即冷冻。同时，采用未污染的水和沉积物样品进行供试物加标回收率试验，且采取与样品相同的储存和分析方法，以验证供试物的储存稳定性。

### 5.4 质量控制

由于中宇宙试验体系的复杂性，本标准不对试验的质量控制设置绝对标准。

试验有效性评估主要从以下几方面进行：

- 测试端点应包括初级或其它高级阶段试验中已甄别的具有潜在风险的生物；
- 研究剂量效应关系时，对于敏感生物，浓度设定应至少包括一个产生明显生态效应的浓度和一个未产生明显生态效应的浓度（基于对生态系统功能的影响和恢复情况）；
- 各重复间变异性应尽可能小，若变异性很高，则试验结论会相对欠精确。确定关键生物种群恢复情况的过程中，当判断某一处理组与对照组之间无统计学显著差异时，该测试端点各重复间的变异系数应<50%。当连续两个采样日达到此标准时，可判断此处理组中该生物种群已恢复至对照组水平。
- 应对供试物施用量以及暴露开始时（ $t=0$ ）水体中的供试物浓度进行分析测定，或根据试验目的，检测供试物在其它介质中的浓度；
- 试验周期应与所关注生物的生命周期相互对应，当考察目标包括生物恢复时，还应满足种群恢复周期的时间要求。

### 5.5 数据处理与统计分析

#### 5.5.1 单个测试端点数据分析

当以获得NOEC/NOEAEC为试验目的时，对于每个采样日的每个测试端点（单个物种/生物种类测试指标以及各类功能参数、水质指标等）的测试结果，应采用单变量分析方法进行统计分析，如单因素方差分析ANOVA、William's 检验等。通过比较各处理组与对照组间之间的差异（应给出显著性水平  $\alpha$

值），获得每个采样日的NOEC，进而估计NOEAEC值。当以获得EC<sub>x</sub>为试验目的时，可通过回归分析获得EC<sub>x</sub>及其相应的置信区间。

## 5.5.2 生物群落数据分析

### 5.5.2.1 概述

生物群落效应分析应采用多元分析方法、多样性/相似性指数计算法等，分别给出对生物群落产生影响的浓度和未产生影响的浓度。无论采用哪种方法，均应指出假设检验中的显著性水平 $\alpha$  值。

推荐同时采用单变量和多变量分析方法分析中宇宙测试数据，对生物种群水平和生物群落水平的效应做出评价。当某一或几个物种的NOEC<sub>种群</sub>低于生物群落的NOEC<sub>群落</sub>时，应综合考虑这个（些）物种的生态作用和具体特点，以及其他相关物种，确定总体的NOEC值。

### 5.5.2.2 多元分析方法

多元分析方法可用于描述群落水平的效应、指示特别敏感的生物种类并为明确单变量分析范围提供依据。其中常用的一种方法是主响应曲线法(Principal Response Curves)(van den Brink & ter Braak, 1998, 1999)。通过绘制生物随时间变化的典范系数(canonical coefficients)获得处理效应评价图，并结合蒙特卡罗置换检验进行差异显著性统计分析，获得NOEC<sub>群落</sub>值。

### 5.5.2.3 多样性/相似性指数计算法

多样性/相似性指数，例如将时间效应和处理效应分开的布雷-柯蒂斯(Bray-Curtis)相似性指数(Bray & Curtis, 1957)，可等同于5.5.2.2 所述图形评估和蒙特卡罗置换检验。

## 5.6 毒性分级

根据单个物种/生物种类测试指标以及各类功能参数数据统计分析结果，确定每个采样日的NOEC<sub>种群</sub>、NOEC<sub>群落</sub>，明确NOEAEC<sub>种群</sub>、NOEAEC<sub>群落</sub>，并按NY/T 2882.2 《农药登记 环境风险评估指南 第2部分：水生生态系统》进行毒性终点分级，试验结果的解释与评价见欧盟相关准则文件(De Jong, 2008)。

## 6 试验报告

最终报告应全面、完整地描述试验，包括试验目的、试验设计、试验结果、以及相应的化学分析与统计方法。包括：

### a) 供试物及其相关代谢产物信息：

——标识，包括化学名称和化学文摘号；

——批号/亚批号；

- 化学鉴定与杂质含量；
- 试验条件下的化学稳定性；
- 挥发性；
- 比放射性与标记位置（适用时）；
- 供试物及其代谢产物分析方法，包括检测限、定量限；
- 分析检测/定量；
- 供试理化性质、分配系数、水解速率、光解速率等。

b) 试验体系：

- 描述试验体系、位置、历史、外形尺寸、构建材料、集水区特征；
- 水位与循环流通情况；
- 水质：试验用水的化学/物理参数；
- 生物引入情况及生物群介绍；
- 沉积物特征（简要描述采集地点）；
- 描述各重复之间的差异。

c) 试验设计与数据测定：

- 施用方案：剂量水平、持续时间、频率、加载率、供试物溶液制备方法、供试物施用方法等；
- 采样与分析，残留监测结果，分析方法；
- 气象记录；
- 水质理化性质测定（温度、氧气饱和度、pH 值等）；
- 采样方法与物种鉴别分类方法；
- 浮游植物：叶绿素 a；总细胞密度；单个优势种群的多度；生物种类（最好是物种）丰富度；生物量；
- 着生生物：叶绿素 a；总细胞密度；优势种群密度；物种丰度；生物量；
- 浮游动物：单位体积总密度；主导生物种类的总密度（枝角目，轮虫纲和桡足类）；物种多度；物种丰富度；生物量；
- 大型植物：生物量、物种组成和各种植物表面覆盖百分率；
- 羽化昆虫：单位时间内羽化总数；各优势种类的多度；物种丰富度；生物量；密度；生活阶段；

——底栖大型无脊椎动物：单位面积总密度；物种丰富度；各优势种类的多度；生活阶段；

——鱼：试验结束时总生物量；每条成鱼或者标记幼鱼的重量与长度；状态指数；一般行为；  
大体病理学；必要时，总繁殖力；

——可能产生影响的功能参数（如生产、增长、活动或捕食）；

——如可能，与生物群落/物种/个体的适应性和耐受力发展相关的数据。

d) 数据评估：

——测试端点；

——描述与讨论毒性估计值（如 NOEC、EC<sub>x</sub>）所采用的统计学方法及其检验能力；

——单变量分析结果；

——多变量分析结果；

——相似性和多样性指数分析结果；

——表征试验结果的图表；

——描述观察到的具有生态学意义的效应，并进行科学性分析；

——描述种群恢复情况（观察或推断而来的结果），并讨论其与自然恢复过程的相关性；

——通过数据统计分析获得的 NOEC 或 EC<sub>x</sub>。如给出了其它被认为具有生态学相关性的 NOEC 或 EC<sub>x</sub>，应提供科学依据。

## 附录 A

### (资料性附录)

#### 典型室外模拟静态淡水生态系统(中宇宙/微宇宙)试验系统

室外中宇宙规模大小的选择取决于研究目标,以及所要模拟的生态系统类型,一般以1至20 m<sup>3</sup>为宜。当研究对象为浮游生物时,可采用约100~1000 L的微宇宙,也可使用相对较复杂的中宇宙。一般来说,1-5 m<sup>3</sup>左右的小型系统适合于小型生物(如浮游物种)3~6个月的短期研究;大型系统则适合于周期更长的研究(如6个月或更长)。

从空间尺度(大小或体积)上较难以区分中宇宙和微宇宙。可在一定程度上对中宇宙和微宇宙做时间和空间上的区别:微宇宙为10<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>~10 m<sup>3</sup>,中宇宙为1 m<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> m<sup>3</sup>,更大型的中宇宙则相当于全部或自然生态系统(10<sup>3</sup> m<sup>3</sup>~10<sup>8</sup> m<sup>3</sup>)。关于典型室外模拟静态淡水生态系统试验的描述和比较参见表 A.1。

试验系统的平均深度取决于研究目标,但一般来说,以30 cm~1 m为宜。

表 A.1 典型室外模拟静态淡水生态系统(微宇宙和中宇宙)试验系统

特性/参数	微宇宙	中宇宙	大型中宇宙 (整个系统)
规模/体积	$10^{-3} \sim 10 \text{ m}^3$	$1 \sim 10^4 \text{ m}^3$	$10^3 \sim 10^8 \text{ m}^3$
试验周期	几十小时至几周/几个月	几十天至几个月	几十周至几年
容器	用玻璃、塑料、不锈钢、环氧树脂、土等围成的盆、桶、槽、池子等	小型池塘, 大型池塘/湖泊中的围隔系统(例如, 橡皮管/袋状容器/圆筒等), 沼泽等	大型土池子、小型湖泊、较大的围隔系统
与自然生态系统的相近程度	低至中等	中至高等	高等
生物类型	初级生产者(藻类、着生生物); 无脊椎食草动物及其捕食者; 通常不包括鱼	所有生物类型, 可包括大型植物和鱼类	所有生物类型, 包括大型植物和鱼类
测定参数 (种群水平、群落水平)	气象条件; 水质参数(pH, 碱度、硬度、溶解氧、温度等); 生物死亡率、生长、繁殖、多样性、相似性、可持续性、多度(个体数量、生物量)、个体和种群组成; 初级生产力(光合作用、呼吸作用); 化学归趋(如摄入); 营养循环; 以及生物种群恢复	相同。 更关注群落水平的参数, 以及种群恢复	相同。 具有更长期的群落水平参数, 例如种群的持续性、种群随季节的变化、群落捕食、竞争关系、种群恢复等
重复数	3个以上	几个(2个, 或者更多)	1-2个, 受规模及复杂性限制, 可能无法建立真正意义上的重复
处理组数量	5个以上	几个(3个, 或者更多)	1-2个
水	井水、老化的自来水或者采自自然生态系统; 应清洁无污染	同微宇宙; 应清洁无污染	所有的元素都是系统中已有的; 应清洁无污染
底泥	来自自然界, 应清洁无污染	同微宇宙, 应清洁无污染	所有元素都是系统中已有的, 应清洁无污染
注: 参数的选择取决于试验目的。			



表 A.1 典型室外模拟静态淡水生态系统(微宇宙和中宇宙)试验系统（续）

特性/ 参数	微宇宙	中宇宙	大型中宇宙（整个系统）
其它 优势	在半田间条件下研究供试物的生态效应与环境归趋	同微宇宙。 此外： <ul style="list-style-type: none"> <li>- 试验系统更接近田间实际静态生态系统</li> <li>- 试验成本居中</li> <li>- 试验周期中等偏短</li> </ul>	同微宇宙 此外： <ul style="list-style-type: none"> <li>- 试验系统与田间实际静态生态系统最相似</li> <li>- 易于建立多样化的具有代表性的生态系统</li> <li>- 受短期环境参数变化影响较小</li> <li>- 与实际环境差异较小，可为供试物对自然生态系统的效应提供良好预警</li> </ul>
其它 限制性	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 受短期环境参数变化影响较多，受长期影响较少</li> <li>- 试验系统与田间实际静态生态系统相似程度较低</li> <li>- 缺少混合，容器间效应差异性可能较大</li> <li>- 易于偏离自然条件</li> <li>- 难以建立多样化的具有代表性的生物群落</li> <li>- 重复间变异性较大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 受短期/长期环境参数变化影响程度适中</li> <li>- 较难建立真正意义上的重复</li> <li>- 有产生边缘效应和偏离实际环境的可能，但不多见</li> <li>- 重复间有可能出现较大的变异性</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 受长期环境参数变化影响较大</li> <li>- 不可能建立真正意义上的重复</li> <li>- 采样更为复杂与困难</li> <li>- 无容器边缘效应</li> <li>- 试验周期中等偏长</li> <li>- 费用较高</li> <li>- 对系统的可控程度最低</li> </ul>

## 附录 B

### （资料性附录）

#### 关于中宇宙系统中大型植物、无脊椎动物和鱼类的要求

##### B.1 大型植物

###### B.1.1 测试要求

大型植物是水生态系统结构和功能的重要组成部分，可为生物提供栖息地、参与营养循环、影响理化条件，其存在可促进系统稳定性、藻类和无脊椎动物的多样性。因此，大部分情况下，即便试验目的是研究浮游植物和浮游动物，系统中也应包括大型植物。

对于激素类除草剂类中宇宙试验，系统中需包含相关的大型植物品种，尤其具根系品种。当大型无脊椎动物为中宇宙试验主要关注目标之一时，系统中也需包含大型植物。此外，当供试物对大型植物的效应可能会引发间接效应时，也应包含大型植物。

###### B.1.2 生物来源

天然底泥中通常含有种子。试验中可采用自然长出的大型植物，也可采用人工种植的大型植物。植入成熟植物（例如，从供体池塘中获得）可增加新的微型栖息地，提高系统的“成熟”速率，增加试验系统的复杂性。但应控制大型植物的生长使其满足试验要求。例如，一些浮水植物（例如绿萍 *Azolla* 或者浮萍 *Lemna*）或者沉水植物（例如伊乐藻 *Elodea*）过于占优势时，会显著降低水生动物的多样性。当主要关注浮游生物时，应保持一定面积的开阔水面，将大型植物的生长限制在不超过底面积 50% 范围内（通常为 25-30%）。当关注大型无脊椎动物时，则应适当促进沉水植物的生长，以提高大型无脊椎动物的丰度和密度（两者密切相关）。当关注水生昆虫时，也需沉水植物作为其羽化、产卵之地。

##### B.2 无脊椎动物

无脊椎动物包括底栖类和浮游类，通常由沉积物和水带入中宇宙系统中。

典型的无脊椎动物包括：

- a) 浮游动物，如轮虫、节肢动物门鳃足类枝角动物、挠足动物等；
- b) 底栖动物：如环节动物寡毛纲和蛭纲动物等；
- c) 软体动物：腹足纲、双壳纲动物等；
- d) 节肢动物：昆虫类，例如鞘翅目、双翅目、蜉蝣目、半翅目、蜻蜓目、毛翅目；甲壳类，例如等足目、端足目、介形类、十足类等；

e) 扁形动物等。

此外，还可研究底表无脊椎动物以及长在大型植物上的无脊椎动物，例如苔藓虫。

试验开始前可将从野外采集的或者在实验室驯养的试验所需的生物物种加入到试验体系中，并通过适当的样品混合与分配保障施药前各中宇宙系统间生物分布均匀性。

### **B.3 鱼**

小型试验系统中，尤其是当供试物对浮游动物和大型无脊椎动物的影响为关键测试端点时，通常不推荐引入自由活动的鱼。如需关注供试物对鱼类生产的间接效应，可在中宇宙试验中加入鱼类。例如，当预计供试物对一个或者多个无脊椎动物产生重大影响会导致鱼类种群的食物供应减少时。当试验目的之一为观察鱼类的种群效应时，建议使用较大型的中宇宙系统。

试验用鱼品系的选择取决于试验目的，以及中宇宙系统的大小。通常，应选择环境中典型的鱼类品种，或是所调查生态系统中的典型鱼类。此外，为避免污染当地鱼类的生活环境，一般应选择当地品种。

试验用鱼生活阶段、数量与生物量的选择取决于试验目的。例如，评价某杀虫剂品种时，可加入幼鱼并监测其食物（无脊椎动物）供应受影响时的生长情况。系统中宜保持较低的成鱼密度，成鱼产卵后可将成鱼和幼鱼移出。试验系统鱼类种群一般应保持在接近自然水平的结构，不宜超过试验系统的承载能力，生物量密度通常应小于  $2 \text{ g/m}^3$ 。

试验用鱼应在试验系统适当稳定后（一般 1~4 周）加入。当仅评价直接效应时，可将鱼装入笼中；若系统中包含自由活动的鱼，应提供一个鱼类无法进入的无脊椎动物避难处，以保证系统中存在一定数量的未被摄食的无脊椎动物。

## 附 录 C

### （资料性附录）

#### 选择合理的施药次数（EFSA，2013）

高级生态效应评价试验中，不必保持浓度恒定，但应考虑农业活动中农药的施用方法，模拟其在田边地表水中的暴露情况。例如，利用产品GAP、地表水暴露预测模型、多年施用经验等。

##### A.1 施药次数

基于以下几点，选择合理的施药次数（在满足毒理学相关要求的前提下，施药次数越少越好）：

###### 1) 初级风险评估中预测无效应浓度(PNEC)与PEC的比较结果

将低阶次试验获得的PNEC与PEC相比较（不同施药次数产生的脉冲浓度分别以 $PEC_1$ 、 $PEC_2$ 、 $PEC_3$ 、 $PEC_4$ 、…… $PEC_n$ 表示）。当 $n$ 个PEC均高于PNEC时，若无生态毒理学数据支持减少脉冲次数，则 $n$ 次脉冲都应考虑，以模拟现实最坏情况。

###### 2) 具有潜在风险的生物的背景信息

若敏感物种的生命周期长至涵盖了重复脉冲的暴露周期，则认为各次重复脉冲间具有毒理学相关性。例如，前2次脉冲与后3次脉冲间隔32天，若生物个体的平均生命周期小于32天，或者生物敏感阶段小于32天，则可认为后3次与前2次脉冲间不具有毒理学相关性；水生无脊椎动物具有风险时，如条件满足，施药暴露周期应短于实验室无脊椎动物的慢性毒性试验周期（通常为21-28天）：处于敏感生命阶段的生物在暴露周期内已达到毒性效应峰值。

###### 3) 敏感物种及其他生物在实验室试验中表现出的时间效应

上例中，即使生物个体的平均生命周期或生物敏感阶段大于32天，若满足以下两点，也可认为不具有毒理学相关性：第2次与第3次脉冲之间，生物体内的暴露浓度降低至关键阈值，或者第2次与第3次脉冲之间，生物可得以全面恢复。

为证明毒理学相关性/独立性，可采用脉冲暴露试验，也可建立相关生物与农药的TK/TD 模型。TK/TD models将在不久的将来发挥作用。

###### 4) 具有相似毒性机制的化合物的相关信息。

综上所述，田间暴露方式为单次高浓度脉冲，或者虽为多次脉冲，但是各脉冲间在毒理学和生态学上具有一定的独立性时，可选择单次施药。否则应采用合理的重复暴露方式。

##### A.2 效应浓度表征

中宇宙试验中不仅要报告理论浓度，还要报告 $DT_{50}$ ，施用时间等。此外，还需提供供试物在基质中的回收率（目前准则下仅包括水）、施用液的浓度、每次施用后的多次测定结果（水和/或沉积物中）。

农药在相关基质（水、沉积物）中的理论浓度、最大实测浓度、时间加权平均浓度（TWA）均可用于估计PNEC和/或PEC。与现实田间条件下的预期半衰期（源于田间试验或模型输出）相比，如果某供试物在中宇宙研究中的半衰期相当（或更长），理论浓度或最大实测浓度可用于风险评估（最大实测浓度与理论浓度间的偏差小于20%，才可使用理论浓度）；否则，使用实测浓度平均值（例如，TWA浓度）。

## 附 录 D

### （资料性附录）

#### 典型参数的测定方法与频率

表D. 2 中宇宙试验中典型的测试参数及其测试频率

示例：

测试项目	参数测定	建议频率
水质	水位高度、pH、DO、浊度、电导率、硬度、悬浮固体、营养物质（溶解性浓度）	至少每2周
	农药(如可能，包括供试物)、重金属	试验开始时
沉积物	农药(如可能，包括供试物)、重金属、粒径大小、离子交换能力、有机质含量、pH	试验开始时
浮游植物	叶绿素a/脱镁叶绿素/干重； 或者细胞计数、物种多样性测试（适用于长期试验/供试物对藻类具有潜在危害时）；	至少每2周
着生生物	叶绿素a+脱镁叶绿素+干重； 或细胞计数（供试物对藻类具有潜在危害时）	试验期间至少2次
大型植物	视觉（+图片）识别、生产力估计	生长高峰期，不进行频繁监测
大型无脊椎动物	底栖生物； 昆虫成虫； 人工基质+羽化昆虫；随机抓取； 鉴定到最低的可分类种类	底栖生物，每2周； 昆虫成虫，供试物施用、羽化高峰期，每周1次，其余时间采样频率可降低
浮游动物	如可能，鉴定到“种”； 密度与生物量； 记录生活阶段	每周
鱼	体长/体重	试验开始时
	体长/体重； 大体病理； 如相关，性别/繁殖力	试验结束时
残留 （供试物浓度）	供试物+降解产物	取决于供试物， 试验开始时监测频率高于结束
气象条件	空气温度、太阳辐射、降水、风速	适当间隔，现场监测

## 参 考 文 献

- [1] OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance Document on Simulated Freshwater Lentic Field Tests (Outdoor Microcosms and Mesocosms). OECD Series on Testing and Assessment Number 53 (2006).
  - [2] VAN DEN BRINK, P.J., & TER BRAAK, C.F.J., 1998. Multivariate analysis of stress in experimental ecosystems by Principle Response Curves and similarity analysis. *Aquatic Ecology* 32: 163-178.
  - [3] VAN DEN BRINK, P.J., & TER BRAAK, C.F.J., 1999. Principle Response Curves: analysis of time dependent multivariate responses of a biological community under stress. *Env. Tox. and Chem.* 18: 138-148.
  - [4] BRAY, J.R., CURTIS, J.T. (1957): "An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin." *Ecol. Monogr.* 46: 327-354.
  - [5] EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA Journal* 11 (7): 3290 (2013).
-