

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—2015

---

## 化学农药 浮萍生长抑制试验准则

Chemical pesticide—Guideline for *Lemna* sp. growth inhibition tesse

(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。

2015-XX-XX发布

2015-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。

本标准与经济合作与发展组织（OECD）化学品测试导则No.221《浮萍生长抑制试验》（英文版）技术内容相同。

本标准做了下列结构和编辑性修改：

-----为与现有标准一致，将标准名称改为《化学农药 浮萍生长抑制试验准则》；

-----在附录1中增加了紫背浮萍（*Spirodela polyrrhiza*）；

-----将术语定义由附录1转到正文；

-----在术语和定义中增加化学农药的定义及描述；

-----计量单位改为我国法定计量单位。

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。

本标准起草单位：农业部农药检定所

本标准主要起草人：

# 化学农药 浮萍生长抑制试验准则

## 1 范围

本标准规定了浮萍生长抑制试验的术语和定义、试验原理、供试物信息、试验准备、试验质量控制、试验报告的基本要求。

本部分适用于为化学农药而进行的浮萍生长抑制试验，其他类型的农药可参照使用。

本部分不适用于易挥发和难溶解的化学农药。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

**生物量 biomass**

指一个种群中存在的活体材料的干重，本试验中指叶片数量或叶面积等生物量的代替品，试验结束时测量数量及面积。

### 2.2

**供试物 test substance**

试验中需要测试的物质。

### 2.3

**供试生物 test species**

根据试验目的，选择的一种或多个物种。

### 2.4

**无性繁殖体 clone**

指通过无性繁殖产生的生物体或细胞，来自同一个无性繁殖体的个体有遗传同一性。

### 2.5

**无性繁殖群 colony**

指互相连着的母体和后代叶片（通常2-4片）的集合体，有时也指整个植株。

### 2.6

**半效应浓度 median effective concentration**

在生长抑制试验中，使供试生物生物量增长或者生长率比对照下降50%时供试物浓度，用 $EC_{50}$ 表示。在本部分中，指在一定暴露期内，通过浮萍生物量增长的抑制百分率计算而得到的半效应浓度用 $E_yC_{50}$ 表示，通过浮萍生长率的抑制百分率计算而得的半效应浓度用 $E_rC_{50}$

表示。

注：单位为mg a. i. /L。

## 2.7

**叶状体 frond**

浮萍植株的单个“叶状结构”，是最少单位，即个体，有繁殖能力。

## 2.8

**生长 growth**

整个试验期间测量变量如叶片数量、干重、湿重或叶面积的增加。

## 2.9

**生长率 growth rate**

（平均特定生长率average specific growth rate,  $\mu$ ）指试验期间生物量的对数增长。

## 2.10

**无作用效应浓度 no observed effect concentration**

在试验中，没有引起浮萍产生可观察症状的最高浓度，用NOEC表示。

## 2.11

**最低作用效应浓度 lowest observed effect concentration**

指在一定试验期间内，与对照相比，观察到的生长减少效应有统计学显著意义( $P \leq 0.05$ )的最低试验浓度，用LOEC表示。

## 2.12

**静态试验法 static test**

试验期间不更换试验药液。

## 2.13

**半静态试验法 semi-static test**

试验期间每隔一定时间（如2d）更换一次药液，以保持试验药液的浓度不低于初始浓度的80%。

## 2.14

**流水式试验法 flow-through test**

试验期间药液连续更新。

## 2.15

**产量 yield**

是一个测量变量值，表示为试验结束时的生物量减去开始时的测量变量。

## 2.16

### 化学农药 chemical pesticide

利用化学物质人工合成的农药。其中有些以天然产品中的活性物质为母体，进行仿制、结构改造，创新而成，为仿生合成农药。

同义词：有机合成农药synthetic organic pesticide

[NY/T 1667.1-2008，定义2.3.1]

## 3 供试物信息

供试物信息包括：

- a) 化学结构式；
- b) 纯度；
- c) 水溶性；
- d) 水中和光中的稳定性；
- e)  $pK_a$ 值；
- f)  $K_{ow}$ ；
- g) 蒸汽压；
- h) 生物降解性；
- i) 定量分析方法；

## 4 试验概述

浮萍生长抑制试验用于评价受试物对浮萍可能产生的影响，将供试物配制一系列不同浓度的试验药液，然后将浮萍放于试验药液中，连续培养7d后，测定试验用浮萍叶片数、总叶面积、干重或鲜重，并求出半效应浓度 $EC_{50}$ （7d）值以及95%置信限。

## 5 试验方法

### 5.1 材料和条件

#### 5.1.1 供试生物

本试验的供试生物使用圆瘤浮萍（*lemna gibba*）、小浮萍（*lemna minor*）以及在我国分布最广、数量最大、最具优势的紫背浮萍(*Spirodela polyrrhiza* Schleiden)，具体描述见附录A。

试验用浮萍可以从实验室获得或从田间采集，如果从田间采集，采集地点必须免受各种明显污染，开始试验前植株应在试验用的培养基中培养至少8周。如果从其他实验室获得，

应同样条件下培养至少3周。试验用植物、种和无性繁殖体的来源应报告。

#### 5.1.2 供试物

农药制剂或原药。对难溶于水的农药，可用少量对浮萍毒性小的有机溶剂、乳化剂或分散剂助溶，用量不得超过0.1mL (g) /L。

#### 5.1.3 参比物质

为检验实验室的设备、条件、方法及供试生物的质量是否合乎要求，设置参比物质做方法学上的可靠性检验。使用参比物质（每年最少两次）对浮萍进行检测，推荐使用国际验证试验中使用的3,5-二氯苯酚（3,5-dichlorophenol）。

#### 5.1.4 主要仪器设备

玻璃皿无菌培养容器封口膜；

人工气候箱；

不锈钢叉；

蓝盖瓶；

容量瓶；

烧杯；

高压灭菌锅；

洁净工作台；

酸度计；

温湿度记录仪；

照度计；

所有接触试验培养基的设备应由玻璃或其他化学惰性材料制成，培养和试验所用玻璃仪器应清洗干净，避免化学污染物混入试验液，并灭菌。

#### 5.1.5 培养基

推荐选择SIS培养基用于小浮萍和紫背浮萍的培养和试验；选择20XAAP生长培养基用于圆瘤浮萍的培养和试验；Steinberg培养基也适用于培养小浮萍。上述培养基配方参见附录B。

#### 5.1.6 培养和试验条件

用连续的暖和白荧光灯提供光，在叶与光源同样距离的点测定光合活性辐射时（400-700nm）时，光强度在6500-10000lx范围内。培养和试验环境温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。试验期间对照培养基的pH升高值不超过1.5个单位。

培养时每隔7d更换培养液。

#### 5.1.7 试验有效性

对照组叶片数量的倍增期应在2.5d（60h）内，相当于在7d内应有7倍的增长率，并且平均特定生长率为 $0.275\text{d}^{-1}$ 。

### 5.2 试验操作

#### 5.2.1 供试生物的培养

按无菌操作法将试验用浮萍接种到装有培养基的培养皿中，在5.1.6的条件下培养。为免受诸如绿藻和原生动物的其他生物的污染，应进行单一培养。有被绿藻或其他生物污染的明显迹象的可以进行浮萍叶面样品的表面消毒，然后转移到新的培养基中。

#### 5.2.2 方法的选择

按农药的特性选择静态试验法、半静态试验法或流水式试验法。如使用静态或半静态试验法，应确保试验期间试验药液中供试物浓度不低于初始浓度的80%。如果在流水式试验法试验期间试验药液中供试物浓度发生超过20%的偏离，则应检测试验药液中供试物的实际浓度并以此计算结果，或使用流动试验法进行试验，以稳定试验药液中供试物浓度。选择半静态培养时，在试验的第3d、5d更换试验药液。

#### 5.2.3 预试验

按正式试验的条件，以较大的间距设置若干组浓度，求出供试物使试验用浮萍生长受抑制的最低浓度和不受抑制的最高浓度，在此范围内设置正式试验的浓度。

#### 5.2.4 正式试验

在预试验确定的浓度范围内以一定比例间距（几何级别应控制在3.2倍以内）设置5-7个浓度组，并设空白对照组，使用助溶剂的还应该增设溶剂对照组，每个浓度组设3个重复。

#### 5.2.5 限度试验

设置上限浓度为 $100\text{mg a.i/L}$ ，即在供试物达 $100\text{mg a.i/L}$ 时，未对浮萍产生影响。若供试物溶解度小于 $100\text{mg a.i/L}$ ，则采用其溶解度上限作为试验浓度。对照组和处理组至少设置6个重复，并且对浓度组和对照组进行差异显著性分析（比如 $t$ 检验）。推荐进行暴露浓度的化学分析测定。

#### 5.2.6 染毒

在无菌条件下，用不锈钢叉将有2-4片可见叶的无性繁殖群从接种培养随机转接进试验容器中。每个试验容器中应包括9-12片叶，每个试验容器中的叶片数和无性繁殖群数应相同。

试验容器在培养箱中应随机摆放，以减低光强和温度影响的空间差异。

如果预先的稳定性试验表明供试物浓度在试验期间（7d）不能保持稳定（即测定浓度低于初始浓度的80%），推荐采用半静态试验系统。这种情况下，一个试验周期内试验液和对照液应至少更新2次新液（如第3天和第5天）。更换新液的频率应根据供试物的稳定性决定，极不稳定或挥发物质要求更高频率地更换，以保持较恒定浓度，在一些情况下，要求采用流水式试验系统。（5.2.2的重复性，斟酌，放入前面适合）

### 5.2.7 测定方法

试验开始时，详细记录各处理组及对照组中浮萍叶片数量，应保证突起和清晰可见的叶片均被计数，并且在试验开始期间每3d观察一次（即7d试验期内至少观察2次）。记录的基本信息包括植株发育的改变，如叶片大小及形态、坏死、变色或突起的征兆、无性繁殖群破裂或丧失浮力和根长及形态，试验用培养基的显著特征（如不溶物的存在、浮萍的生长）也应记录。

总叶片面积、干重和鲜重可按下列方法测定：

a) 总叶片面积：所有无性繁殖群的总叶片面积可通过影像分析进行测定。用摄影机将试验容器和植株的剪影拍下来（即将容器放入光盒中），把产生的影像数字化。通过与已知面积的平面形状校准，总叶片面积可以测定。须小心排除试验容器边缘造成的干扰。或将试验容器和植株影印下来，切下无性繁殖群的剪影，用叶片面积分析机或方格纸测定面积。也可采用无性繁殖群剪影面积和单位面积的贴纸重量比等技术。

b) 干重：每个试验容器中的所有无性繁殖群收集起来后，用蒸馏水或去离子水清洗，吸干多余的水后在60℃烘干至恒量重量，所有根的碎片应包括在内，干重精度应精确到0.1mg。

c) 鲜重：所有无性繁殖群转移到事先称重的聚苯乙烯（或其他惰性材料）圆底管（圆底上有1mm小孔），然后将管放入离心机中离心（室温下3000r min<sup>-1</sup>离心10min），在称重装有无性繁殖群的管，减去空管的重量就得出鲜重。

### 5.2.8 测定频率和浓度分析

a) 光强及温度，试验期间，生长室、培养箱或房间内离浮萍叶片同样距离的光强需测定，试验期间至少测定1次。生长室、培养箱或房间内放置的备用培养基的温度需要每天记录1次。

b) pH，如采用静态试验，试验开始和试验结束时测定每个处理的pH。采用半静态试验，测定更换药液前后的pH值。

c) 供试物浓度，试验期间应以适当间隔测定供试物浓度。

静态试验至少要在试验开始和结束时测定浓度。



半静态试验中，试验液的浓度应保持在设计浓度的20%变化率内，需要分析测定每次更换时新制备的溶液浓度和旧液浓度。若供试物的初始浓度不在设计浓度的20%变化率内，当有充分证据表明初始浓度可重复并且稳定（即保持在初始浓度的80%-120%范围内），可以只对最高浓度和最低浓度进行浓度测定。所有情况的旧液中供试物浓度测定只需要每个浓度的1个重复的溶液（或各重复的混合液）。

流水式试验的取样方式和半静态试验描述相似，包括试验开始、中途和试验结束取样测定，这种类型的试验，稀释液和供试物或供试物母液的流量应每天检查。

d) 结果测定，如果整个试验期间，供试物浓度一直保持在设计浓度或测定初始浓度的20%变化率内，结果分析可根据设计或测定的初始浓度值进行。如果偏离设计浓度或测定初始浓度的20%变化率外，结果分析要根据实际测定浓度进行。

## 6. 数据处理与分析

### 6.1 倍增时间的测定

测定叶片数的倍增时间( $T_d$ )，符合验证试验的标准，用下列公式来计算对照组的数据：

$$T_d = \ln 2 / \mu \text{ (格式)}$$

此处 $\mu$ 代表3.3提到的平均特定生长率的测定值。

### 6.2 效应变量的计算

本试验的目的是测定供试物对浮萍植株的影响，本试验选择以下效应变量来评价试验影响。

a) 平均特定生长率：这个变量根据叶片数的对数增长计算，另外，也根据对照和处理组另一个测量参数随时间（表示为每天）的对数增长（总叶面积、干重或产量）。有时称为相对生长率。

b) 产量：本反应变量根据叶片数的变化计算，另外，也根据对照和处理组测量参数直到试验结束时变化（总叶面积、干重或鲜重）计算。

毒性估计应根据叶片数和一个另外的测量变数（总叶面积、干重或鲜重），因为某些物质对其他测量变量产生的影响比对叶片数大，只计算叶片数则检测不到这种影响。

叶片数和任何其他测量变量即总叶面积、干重或鲜重，每次测量时与供试物浓度一起列表表示，随后的数据分析应根据各个重复的值计算，不计算每个处理组的平均值。

#### 6.2.1 平均特定生长率

特定时期的平均特定生长率是计算对数生长期内生长变量（叶片数、总叶面积），使用下列公式计算对照和处理的每个重复。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t}$$

式中：  $\mu_{i-j}$  从时间*i*到*j*时的平均特定生长率；

$N_i$ —*i*时试验或对照组的测量变量；

$N_j$ —*j*时试验或对照组的测量变量；

$t$ —从*i*到*j*的时间。

每个处理组和对照组计算一个生长率平均值和标准差。另外，还要计算整个试验期间的平均特定生长率（上述时间*i*为试验开始时间，时间*j*为试验结束时间）。

根据下列公式计算每个试验浓度（处理组）的生长抑制百分率（*I<sub>r</sub>*）：

$$I_r = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100\%$$

式中： *I<sub>r</sub>*—平均特定生长抑制率；

$\mu_c$ —对照组 $\mu$ 平均值；

$\mu_t$ —处理组 $\mu$ 平均值。

#### 6.2.2 产量

根据两个测量变量，即每个试验容器试验开始和试验结束时的叶片数和一个其他测量变量（总叶面积、干重或鲜重），测定产量影响。对于干重或鲜重来说，试验开始的测定是在与试验接种同一批次的培养液中取样测定（5.2.1）。每个试验浓度和对照计算一个产量平均值和标准值。每个处理组的平均产量抑制率（*I<sub>y</sub>*）可计算如下：

$$I_y = \frac{bc - bt}{bc} \times 100\%$$

式中： *I<sub>y</sub>*—产量减少百分率；

$bc$ —对照组最终生物量与开始生物量之差；

$bt$ —处理组最终生物量与开始生物量之差。

#### 6.2.3 浓度—反应曲线图

应绘制以反应变量的平均抑制百分率（依据6.2.1或6.2.2计算出的*I<sub>r</sub>*或*I<sub>y</sub>*）和供试品浓度对数为坐标的浓度—反应曲线。

#### 6.2.4 EC<sub>50</sub>的计算

EC<sub>50</sub>的估算应根据平均特定生长率（ErC<sub>50</sub>）和产量（EyC<sub>50</sub>），每个又根据叶片数和一个测量变量（总叶面积、干重或鲜重）计算，这是因为供试物对叶片数和其他变量影响不同。因此，采用合适的统计学软件分析浮萍试验数据，共得到4个抑制水平计算的EC<sub>50</sub>值：ErC<sub>50</sub>（叶片数）、ErC<sub>50</sub>（总叶面积、干重或鲜重）；EyC<sub>50</sub>（叶片数）和EyC<sub>50</sub>（总叶面积、干

重或鲜重)。

### 6.3 统计方法选择

目的是通过回归分析获得一个定量的浓度-效应关系。对反应数据进行线性增长转换后可以利用加权线性回归,如概率法、Logit或Weibull法,但在处理不能避免的不规律数据和偏离于平滑分布情况时,非线性回归步骤是首选的方法。

如果可用的回归模型/方法不适合这些数据,EC<sub>50</sub>值和置信限也可以用直线内插法进行计算。

## 7 质量控制

质量控制条件包括:

——试验期间,供试生物应是处于对数生长期的纯种浮萍;

——试验期间,对照组和各浓度组的试验温度、光照等环境条件应按要求完全一致;

——试验期间,尽可能维持恒定条件。如有必要,应使用流水式试验;

——试验期间,供试物的实测浓度应不小于配置浓度的80%,如果试验期间供试物实测浓度与配置浓度相差20%,则以供试物实测浓度平均值来确定试验结果。

——试验期间,对照组叶片数量的倍增期应在2.5d(60h)内,相当于在7d内应有7倍的增长率,并且平均特定生长率为0.275d<sup>-1</sup>。

## 8 试验报告

试验报告必须包括下列内容:

### a) 供试物的信息

——供试农药的物理状态及相关理化特性等包括(通用名、化学名称、结构式、水溶解度)等;

——化学鉴定数据(如CAS号)、纯度(杂质);

### b) 供试生物

——浮萍学名、无性繁殖体及来源,供试生物的培养基及培养方式;

### c) 试验条件

——试验持续时间及试验周期;

——采用试验方法,如静态、半静态或流水式;

——试验设计描述,包括试验容器(容量、型号、密闭方式、静置、振荡或通气方式)、溶液体积、试验开始每个试验容器无性繁殖群和叶面数;

——母液和试验液的制备方法,包括任何溶剂或分散剂的使用;

——试验期间培养条件的温度、光照

——试验液和对照的pH、供试物浓度和浓度定量方法（验证试验、标准偏差或置信限分析）；

——叶片数和其他测量可变因子（干重、鲜重或叶面积）测定方法

——有对准则的背离

#### c) 结果

——原始数据：每次观察和浓度分析时每个试验组合对照组叶片数和其他测量变量数量；

——试验期间，无死亡发生的最高浓度；

——试验期间，导致100%死亡的最低浓度；

——每个推荐观察时间下，各个浓度的累积死亡率；

——对照组叶片数倍增时间/增长率；

——确定EC<sub>50</sub>值的统计学方法；

——对照组的死亡率；

——试验期间，可能会影响试验结果的因素；

——观察到的效应，浮萍颜色、形态和大小的变化；死亡、抑制生长等效应情况等；

——供试物的浓度与抑制曲线图，得出的 $E_rC_{50}$ 、 $E_rC_{50}$ 值，并注明计算方式；

——试验质量控制条件描述；

附录 A  
(资料性附录)  
供试生物信息

浮萍(duckweed,*Lemna* spp) , 属于浮萍科, 浮萍科 (*Lemnaceae* L.) , 属种子植物门, 单子叶植物纲, 天南星目, 该科为世界性广布(除南北极区外), 主要在静止的淡水及半盐水(河口湾)中, 多分布于热带及亚热带至温带地区。浮萍科植物被划分成5个属, 分别是 *Spirodela* (紫萍属)、*Lemna* (浮萍属)、*Wolffia* (微萍属或无根萍属)、*Wolffiella* (我国不产)和*Landoltia Punctata*, 全世界的浮萍科植物共38种。紫萍属 (*Spirodela* Schleiden), 英文名称为giant duckweed, 是浮萍科植物中形体最大、相对较原始的类群, 并且, 它具有最多数目的根, 比较容易鉴定的优点。

圆瘤浮萍 (*Lemna gibba*)、小浮萍 (*Lemna minor*) 是温带地区代表种, 通常用于毒性试验。紫背浮萍 (*Spirodela polyrrhiza* (Linnaeus) Schleiden.)在我国分布最广、数量最大、最具有优势, 三个种都有漂浮的或没入水中的盘状茎(叶)和从每个叶片最低的表面伸出的非常细小的根。浮萍很少开花, 靠无性繁殖产生新叶进行繁殖。和老叶相比, 新叶色淡一些, 有较短的根, 由大小不同的2-3片叶组成。浮萍 (*Lemna*) 的体形小, 结构简单, 无性繁殖和世代短, 使浮萍属非常适于实验室培养。因为可能存在敏感性的种间变异, 所以只有种内的敏感性比较是有效的。

## 附录 B (资料性附录) 培养基制备

培养基的配方参见表B.1-B.5。

### 1 瑞士标准（SIS）培养基

储备液A-E需高压锅（120℃，15min）或过滤膜（约0.2μm孔径）灭菌。储备液F（最好和G）只需过滤膜（约0.2μm孔径）灭菌，不需高压灭菌。灭菌后的储备液应冷藏盒黑暗条件保存。储备液A-E可保存6个月，而储备液F（最好和G）只能保存1个月。

表 B.1 瑞士标准（SIS）培养基配方

储备液类型	试剂	储备液（g/L）	培养液（mg/L）
A	NaNO <sub>3</sub>	8.5	85
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.34	13.4
B	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15	75
C	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.2	36
D	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4	20
E	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1	1
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.005	0.005
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	0.05
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.2	0.2
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01	0.01
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01	0.01
F	Na <sub>2</sub> EDTA ·2H <sub>2</sub> O	0.28	1.4
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.17	0.84
G	MOPS（buffer）	490	490

制备1LSIS培养基，下列物质加900mL去离子水：

- a) 10mL储备液A。
- b) 5mL储备液B。
- c) 5mL储备液C。
- d) 5mL储备液D。
- e) 1mL储备液E。
- f) 5mL储备液F。

g) 1mL储备液G(可选)。

需要注意，某些供试物需加储备液G（MOPS buffer）。最后用0.1mol L<sup>-1</sup>或1mol L<sup>-1</sup>HCL或NaOH调pH为6.5±0.2，用去离子水定容至1L。

2 20X AAP生长培养基

用无菌蒸馏水或去离子水制备储备液。无菌储备液应储存在冷藏盒黑暗条件下。这样可以储存6-8周。要准备5个营养储备液（A1、A2、A3、B和C）制备20X AAP培养基，用试剂纯试剂。每种储备液取20mL加入约850mL去离子水配成生长培养基。用0.1M或1MHCl或NaOH调节pH为7.5±0.1，用去离子水定容至1L。然后将培养基过约0.2um孔径滤膜装入无菌容器内。用于试验的生长培养基在试验开始前1-2d准备，使pH值稳定下来。在使用前应测定培养基pH，如果需要，用0.1M或1M HCl或NaOH调pH。

表B.2 20X AAP培养基配方

储备液类型	试剂	储备液（g/L） <sup>①</sup>	培养液（mg/L） <sup>①</sup>
A1	NaNO <sub>3</sub>	26	510
	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	12	240
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	4.4	90
A2	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	15	290
A3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	1.4	30
B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.34	13.4
	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.42	8.3
	FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.16	3.2
	Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	0.3	6
	ZnCl <sub>2</sub>	3.3mg/L	66ug/L
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1.4mg/L	29ug/L
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	7.3mg/L	145ug/L
	CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.012mg/L	0.24ug/L
C	NaHCO <sub>3</sub>	15	300 <sup>②</sup>

①除非注明是其他单位；

②理论最适最终重碳酸盐浓度（可避免pH调节）是15mg/L，不是300mg/L。

3 STEINBERG培养基（ISO20079）

3.1 浓度和储备液

改进的Steinberg培养基在ISO20079中仅用于小浮萍，但试验证明对圆瘤浮萍也能达到很好的培养效果。制备培养基应使用试剂纯或分析纯化学品和去离子水。由储备液或培养基最大浓度没有沉淀析出的10倍浓缩培养基制备营养培养基。

表B.3pH稳定的STEINBERG培养基配方

物质		营养培养基	
常量元素	摩尔质量	mg/L	mmol/L
KNO <sub>3</sub>	101.12	350.00	3.46
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	236.15	295.00	1.25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	90.00	0.66
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174.18	12.60	0.072
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246.37	100.00	0.41
物质		营养培养基	
微量元素	摩尔质量	ug/L	umol/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	120.00	1.94
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	287.43	180.00	0.63
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	241.92	44.00	0.18
MnCL <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	197.84	180.00	0.91
FeCL <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	270.21	760.00	2.81
EDTA Disodium--dihydrate	272.24	1500.00	4.03

表B.4储备液（常量元素）

常量元素（50 倍浓缩）	g/L
储备液 1	
KNO <sub>3</sub>	17.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.63
储备液 2	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.00
储备液 3	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14.75

表B.5储备液（微量元素）

微量元素（1000 倍浓缩）	mg/L
储备液 4	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120.00
储备液 5	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	180.00
储备液 6	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44.00
储备液 7	



MnCL <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	180.00
储备液 8	
FeCL <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	760.00
EDTA Disodium-dihydrate	1500.00

储备液2、3、4-7可直接加，为达到更长保存期，储备液在121℃条件下高压灭菌20min或过无菌滤膜（0.2um），强烈建议储备液8过无菌滤膜（0.2um）。

### 3.2 STEINBERG最终浓度培养基的制备

储备液1、2和3各20mL（附表B.4）加入900mL去离子水以防产生沉淀。加储备液4、5、6、7和8各1.0mL（附表B.5），条件pH至 $5.5 \pm 0.2$ （加最小量的NaOH或HCl调节）用水定容至1000mL。如果储备液是无菌的，适当的水加入使不在无菌。如果最终培养基已灭菌，储备液8应高压灭菌（121℃，20min）后加入，培养基pH（最终酸碱度）应为 $5.5 \pm 0.2$ 。

## 参 考 文 献

- [1] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Test No. 221, *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, Adopted 23 March, 2006.
- [2] 田延辉, 农药对紫背浮萍的生长抑制试验, 华南农业大学学位论文, 2005
-