

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx.6—xxxx

农药登记环境影响试验生物试材培养

第6部分：近头状伪蹄形藻

Guidance on the housing and care of organisms used for environmental
impact test of pesticide registration—Part 6: *Pseudokirchneriella subcapitata*

(征求意见稿)

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

NY/T ×××× 《农药登记环境影响试验生物试材培养》，分为 8 部分：

- 第 1 部分：蜜蜂；
- 第 2 部分：日本鹌鹑；
- 第 3 部分：斑马鱼；
- 第 4 部分：家蚕；
- 第 5 部分：大型蚤；
- 第 6 部分：近头状伪蹄形藻；
- 第 7 部分：浮萍；
- 第 8 部分：赤子爱胜蚓。

本部分是 NY/T ×××××的第 6 部分。

本部分按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

请注意本部分的某些内容可能涉及专利，本部分的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本部分起草单位：

本部分主要起草人：

农药登记环境影响试验生物试材培养

第 6 部分：近头状伪蹄形藻

1 范围

本部分规定了农药登记环境影响试验用近头状伪蹄形藻的引入、验收、培养条件、保种培养、预培养等技术方法，以及记录资料要求。

本部分适用于近头状伪蹄形藻（*Pseudokirchneriella subcapitata*，曾用名：羊角月牙藻/*Selenastrum capricornutum*）的实验室培养，其他品种的淡水藻类如普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）、近具刺链带藻（*Desmodesmus subspicatus*，曾用名：*Scenedesmus subspicatus*）可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本部分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部分。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本部分。

GB/T 31270.14 化学农药环境安全评价试验准则 第13部分：藻类生长抑制试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

液体培养基 liquid culture medium

微生物或动植物细胞的液状培养基。

3.2

固体培养基 solid culture medium

在一般培养温度下呈固体状态的培养基。

3.3

保种培养 stock culture

在实验室内用固体或液体培养基小规模培养单一藻种，以备分离、转移到新鲜培养基中并培养成为受试藻的过程。

3.4

预培养 pre-culture

试验前，从保种培养的藻中分离出一部分并接种至与试验时相同的培养基中，在与试验相同的条件下反复接种和培养获得受试藻的过程。

4 引入与验收

4.1 应从专业的藻类研究或培养机构引入藻种，并由其提供品系证明。近头状伪蹄形藻的生物学背景信息和形态特征参见附录 A。

4.2 提前准备好培养基，藻种到达后尽快进行转接。

5 培养条件

5.1 培养设备

5.1.1 主要仪器设备包括：

- 洁净工作台、高压灭菌锅等无菌操作相关设备；
- 恒温振荡光照培养箱，光照培养箱等培养设备；
- 生物显微镜，血球计数板或流式细胞仪、紫外分光光度计等观察与计数仪器；
- 冰箱、温度计、照度计（球形传感器/余弦传感器）等环境监控仪器设备；
- 电子天平等称量仪器。

5.1.2 培养容器

应采用玻璃或其他化学惰性材料制成，且透光性好。常采用玻璃锥形瓶、螺口玻璃试管等。同时，配备透气棉塞或透气封口膜等，便于容器内外部的空气交换。所有器皿、封口材料、吸管等在使用前应进行无菌处理（121℃下高压灭菌至少 15 min）。

5.2 培养基

5.2.1 培养基的选择

根据藻种选择适宜其生长的培养基。近头状伪蹄形藻可在多种培养基中保存，推荐使用 BG11 培养基或 OECD 藻类培养基。

5.2.2 培养基配制方法

5.2.2.1 液体培养基

BG11 培养基的配方见 GB/T 31270.14 附录 A。OECD 藻类培养基的配方见本部分附录 B。培养基使用前应经过高压灭菌（121℃，至少 15min）处理。

5.2.2.2 固体培养基

在液体培养基中加入适量琼脂条或琼脂粉，经高压灭菌（121℃，15 min~20min）后，在试管中铺成斜面培养基，冷却备用。

5.2.2.3 配制培养基的试剂应至少为分析纯等级，配制用水应为蒸馏水或去离子水（电导率 $\leq 10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ）。

6 保种培养

6.1 液体培养基培养

6.1.1 将一定量的藻细胞转接至液体培养基中，并摇匀。在18℃~24℃、4440 lux~8880 lux持续光照条件下培养。培养期间，保持持续振荡或搅拌。

6.1.2 根据培养条件和生长状况，每3 d~15 d转接1次（例如，盛装100 mL培养液的锥形瓶，置于20℃持续光照下培养，每周转接1次）。

6.1.3 如需长期保种，可将处于指数生长期的藻培养液冷藏（0℃~8℃）避光保存，每半年转接1次。

6.2 固体培养基培养

6.2.1 如需长期保种，还可将处于指数生长期的藻培养液转接（划线）到固体斜面培养基上，封口。在21℃~24℃、4440 lux~8880 lux持续光照下培养至固体培养基表面长出藻细胞，然后，转为冷藏避光保存。

6.2.2 每2个月进行1次复壮。将藻体转接到液体培养基中培养至指数生长状态，转接1次~2次后再转为固体培养基培养。

6.3 所有操作必须在无菌条件下进行，以免受到细菌或其他藻类的污染。

6.4 状态检查

6.4.1 定期镜检，以确认藻未被污染。

6.4.2 当出现轻微污染时，可采取合适的分离措施，例如：

- 采用脱脂棉或滤纸进行过滤（适用于寄生虫和藻细胞体积相差较大的情况）；
- 采用离心法进行分离（适用于寄生虫和藻细胞重量相差较大的情况）；
- 采用琼脂板划线培养进行分离纯化等。

6.4.3 当污染严重时，应重新引入新的藻种。

7 预培养

7.1 培养条件

7.1.1 温度：21℃~24℃。

7.1.2 连续均匀光照。光合有效辐射范围（400 nm~700 nm）内，液面上方光照强度保持在 $60\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ~ $120\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ （相当于冷白光光源，4440 lux~8880 lux）。不同位点光照强度差异应在15%范围内。

7.1.3 培养过程中保持持续振荡或搅拌，使藻细胞处于悬浮状态。

7.2 培养方法

7.2.1 从保种培养中分离并接种一定量藻细胞至新鲜无菌的液体培养基中（接种藻细胞浓度约为 5.0×10^3 个/mL~ 5.0×10^4 个/mL），摇匀后在试验条件下培养3 d~4 d使其达到对数生长状态，然后再转接至新鲜无菌的培养基中。对于近头状伪蹄形藻以外的其他藻种，根据种类不同，接种藻细胞浓度和达到对数生长所需的时间均不同。

7.2.2 反复接种2次~ 3次。每次转接前应通过镜检确定培养液中藻细胞生长是否健康正常，并测定藻细胞浓度。当藻类培养液中含有变形或异常细胞时，不应继续培养和用于试验。

7.2.3 所有操作必须在无菌条件下进行，以免受到细菌和其他藻类的污染。

6 记录资料

对每批次保种培养、预培养的藻，实验室均应保存完整的培养记录，相关原始记录表格设计参见附录 C。主要记录资料包括：

- 引入与验收记录；
- 保种培养记录；
- 预培养记录；
- 培养基配制记录；
- 水质检测记录（外部检测报告，必要时）；
- 环境条件（可包含在相关仪器设备的记录文件中）等。

附录 A

(资料性附录)

生物学背景资料与形态特征

A.1 生物学背景

近头状伪蹄形藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 是国际上藻类毒性测试的模式种之一, 属于绿藻门绿球藻目小球藻科。在我国, 其曾用名羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornutum*)。《中国淡水藻志》第八卷中也曾称为头状蹄形藻 (*Kirchneria subcapitata*)。目前国际上已将其归为伪蹄形藻属 (无蛋白核)。

A.2 形态特征

近头状伪蹄形藻的形态特征参见图 A.1。其形状弯曲, 大小约为 $(8\ \mu\text{m}\sim 14\ \mu\text{m}) \times (2\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m})$, 体积约为 $40\ \mu\text{m}^3$ 。在实验室内 $21\ ^\circ\text{C}$ 、 $70\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 持续光照条件下生长速率约为 $1.5\sim 1.7\ \text{d}^{-1}$ 。



图 A.1 近头状伪蹄形藻的形态特征

附录 B
(规范性附录)
OECD 培养基配方

OECD 培养基配方见表 B.1。

表 B.1 OECD 培养基配方

序号	组分	含量 (mg/L)
1	NaHCO ₃	50.0
2	NH ₄ Cl	15.0
3	MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12.0
4	CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	18.0
5	MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	15.0
6	KH ₂ PO ₄	1.60
7	FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0.064
8	Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0.100
9	H ₃ BO ₃	0.185
10	MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0.415
11	ZnCl ₂	0.00300
12	CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0.00150
13	Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0.00700
14	CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0.00001
pH	8.1	
备注：将各组分配制成浓缩储备液，经高压灭菌（121 °C，15 min）后冷藏备用。制备培养基时，向无菌蒸馏水中加入适量储备液；如需制备固体培养基，可添加 0.8%的琼脂。		

附 录 C
(资料性附录)
记录表格示例

- 引入与验收记录参见表 C.1;
- 保种/预培养记录参见表C.2;
- 预培养记录参见表C.3;
- 培养基配制记录参见表C.4。

表 C.1 藻种引入与验收记录

名称	
品种	
引入日期	
引入数量	
引入来源	
实验室内批次	
放置位置	
到达时状态	
接收人/日期	
品系确认：（详细描述镜检方法与结论等）	
操作者/日期：	

表 C.2 保种培养记录

名称/品种	引入批次 ^a	保种培养批次 ^a /编号		培养基名称	放置位置 ^b		
日期	藻细胞数 (个) / 仪器编号:	藻细胞浓度 (个/mL)	藻细胞 状态	接种量 藻液量 (mL) / 培养基体积 (mL)	保种培养 新批次 ^a	操作者/日期	备注
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			

^a: 批次编号中应包含相应的日期, 即: 引入批次应包含引入日期, 其余批次应包含该批次从上一批次中分离出来的日期;
^b: 所用仪器相关记录中应包含仪器使用期间的温度监控记录、光照周期及强度检查记录。

表 C.3 预培养记录

名称/品种	引入批次 ^a	保种培养批次 ^a /编号		培养基名称	放置位置 ^b		
日期	藻细胞数 (个) / 仪器编号:	藻细胞浓度 (个/mL)	藻细胞 镜检状态	接种量 藻液量 (mL) / 培养基体积 (mL)	预培养批次 ^{a,c}	操作者/日期	备注
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			
	/ / / / / / / / / /			/			

^a: 批次编号中应包含相应的日期, 即: 引入批次应包含引入日期, 其余批次应包含该批次从上一批次中分离出来的日期;
^b: 所用仪器相关记录中应包含仪器使用期间的温度监控记录、光照周期及强度检查记录。
^c: 当转接瓶数 ≥ 1 时, 还应给出不同容器的编号。

表 C.4 培养基配制记录^a

组 分	来源 (批号、厂家)	实际称取量 (g)	定容量 (mL)	灭菌温度	灭菌时间	储备液编号 ^b	取用量 (mL)	最终定容体积 (mL)
NaNO ₃								
K ₂ HPO ₄								
MgSO ₄ ·7H ₂ O								
CaCl ₂ ·2H ₂ O								
C ₆ H ₈ O ₇								
FeC ₆ H ₅ O ₇ ·NH ₄ OH								
EDTANa ₂								
Na ₂ CO ₃								
BO ₃								
MnCl ₂ ·4H ₂ O								
ZnSO ₄ ·7H ₂ O								
NaMoO ₄ ·2H ₂ O								
CuSO ₄ ·5H ₂ O								
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O								
仪器编号								
操作者/日期								
^a : 以 BG11 培养基为例; ^b : 备注储存位置、条件及有效期。								

参 考 文 献

- [1] Organisation for Economic Co-operation and Development. Testing Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test[R]. Paris: OECD, 2011.
- [2] 毕列爵, 胡征宇. 中国淡水藻志 第八卷 绿藻门绿球藻目. 科学出版社[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 198.
-