

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx.7—xxxx

农药登记环境影响试验生物试材培养

第7部分：浮萍

Guidance on the housing and care of organisms used for environmental
impact test of pesticide registration—Part X: *Lemna* Sp.

(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 7 部分。

本部分按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

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 7 部分：浮萍

1 范围

本部分规定了农药登记环境影响试验用浮萍的引入、验收和培养管理等技术方法，以及记录与资料等要求。

本部分适用于小浮萍 (*Lemna minor*)、紫背浮萍(*Spirodela polyrrhiza*) 和圆瘤浮萍 (*Lemna gibba*) 的实验室培养。

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 3090 化学农药 浮萍生长抑制试验准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

分离纯化 isolation and purification

有一种以上的微生物培养物称为混和培养物 (Mixed culture)。如果在一个菌落中所有细胞均来自于一个亲代细胞，那么这个菌落称为纯培养 (Pure culture)。得到纯培养的过程称为分离纯化。

3.2

保种 Preservation

指从已纯化好的试验用浮萍中选出一部分浮萍种进行保存，以浮萍种延续为目的，不用于试验。

4 引入与验收

4.1 引入

试验用浮萍可从有资质的供应商购买或田间采集获得，如果从水生植物养殖商或者物种保藏中心等科研机构购买获得，必须具备浮萍品质鉴定文件。如果从田间采集，采集地点应未受各种明显污染，用小网从池塘或者湿地捞取浮萍，用小杯子和瓶子装足够的池塘水，使浮萍植株能够漂浮起来即可，并对采集到的浮萍植株进行无菌化处理。引入的来源均应被详细描述和记录。

4.2 验收

4.2.1 外观确认

检查浮萍状态，包括：

——观察是否存在病变。健康的浮萍叶状体颜色鲜绿、形状基本统一、叶脉清晰；不正常的浮萍可能出现叶状体萎黄、有凸起或坏疽、浮力缺失等症状。

——观察培养液有无变绿、浑浊等现象出现，是否有藻类、浮游动物、及其他杂质存在，以及其他异常问题。

4.2.2 品系确认

无菌条件下从浮萍中取出少量样本在显微镜下观察，确认浮萍的品系。引入的浮萍要符合《化学农药 浮萍生长抑制试验准则》（NY/T 3090）要求，浮萍形态具体描述参见附录 A。

5 培养管理

5.1 仪器和设备

所有接触到培养基的容器应为玻璃或其他惰性材料制成，所有玻璃仪器在使用前应清洗干净，避免化学污染物混入到培养基当中，并在 121℃ 高温湿热灭菌 20min。

仪器设备如下：

——培养器皿（三角瓶、表面皿、组织培养瓶等）。

——照度计。

——温湿度计。

——不锈钢叉。

——接种环。

——灭菌锅。

——超净工作台。

——人工气候箱。

5.2 培养基的选择

选择 SIS 培养基用于小浮萍和紫背浮萍的培养，20XAAP 生长培养基用于圆瘤浮萍的培养，Steinberg 培养基同样适用于培养小浮萍。培养基的制备参见附录 B。

5.3 日常培养方法

5.3.1 浮萍接种

在适宜的条件下，营养丰富的培养基中，浮萍的生长速度很快，培养 7~10 天，就会铺满容器并发生重叠，此时需将浮萍植株转接至新鲜的培养基中。应提前将培养基、培养器皿等进行高压灭菌。待恢复常温后，用不锈钢叉托起浮萍，将 3~4 簇浮萍转入盛有 200mL 培养基的培养器皿中，用橡胶筋扎好封口膜，然后放置于人工气候箱中进行培养，每隔 5~7d 更换培养液，以维持培养液中的营养成分浓度的稳定，接种过程应为无菌操作。

5.3.2 培养条件

培养温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，连续的冷或暖白荧光，光照强度在 6500-10000 lux 范围内，光暗比 16 h: 8 h。培养区域具备良好的通风和散热条件。培养基 pH 在 6~7。

5.3.3 接种周期：浮萍每 4~7 个工作日接种传代一次，传代尽量选用日期较新且生长状况良好的浮萍。

5.3.4 染菌状况检查。

应至少每月一次观察培养中的浮萍是否发生污染现象，并记录浮萍污染情况。

5.3.5 分离纯化

浮萍在培养过程中若出现绿藻、浮游动物污染等情况，需对其进行分离纯化。在超净工作台中，用酒精灯灼烧过的接种工具（接种环、不锈钢叉）选取一簇浮萍，将其分成若干单个体，用酒精灯灼烧过的手术刀片小心地去掉所有浮萍个体的根，在 0.5%（体积分数）的次氯酸溶液中浸泡约 1min，确保转接的浮萍个体叶状体底部的囊为绿色，将上述浮萍用无菌水或无菌培养液冲洗干净，转入到新培养基中进行培养。

5.3.6 保种

将浮萍放在光照较弱，温度较低的条件保种，保种的培养条件为 $2\sim 12^{\circ}\text{C}$ ，光照小于 1000 lux，保种可 2~3 个月进行一次。至少每周测定培养温度以及光照强度。

6 记录与资料

对于每批次浮萍，实验室应保存完整的培养记录，至少包括以下材料（记录表格参见附录 C）：

——引入与验收记录；

——培养记录；

——环境条件监测记录（温度、湿度、培养基pH等）；

——分离纯化记录（如有）等。

附录 A
(资料性附录)
浮萍形态学描述

A.1 小浮萍 (*Lemna minor*) 的形态学特征

小浮萍 (*Lemna minor*) 如图 A.1 (左) 所示: 根 1 条, 白色, 3~4cm, 根冠钝头; 叶状体扁平, 对称, 近圆形或倒卵形, 表面绿色, 背面浅黄色或绿白色或紫色, 长 1.5~5cm, 宽为 2~3cm; 脉 3 条, 不明显; 叶状体背面一侧有囊, 新叶状体从囊内浮出。



(左)

(中)

(右)

图 A.1 小浮萍 (*Lemna minor*)、紫背浮萍 (*Spirodela polyrhiza*) 及圆瘤浮萍 (*Lemna gibba*) 特征

A.2 紫背浮萍 (*Spirodela polyrhiza*) 的形态学特征

紫背浮萍 (*Spirodela polyrhiza*) 如图 A.1 (中) 所示: 根 5 (7)~16 条; 根冠尖呈白绿色; 叶状体, 扁平, 呈圆形或倒卵形, 表面绿色, 背面紫色, 长 5~8cm, 宽 4~6cm; 掌状脉 5~11 条; 根基其中一侧具有两个囊, 从囊中萌发新芽。

A.3 圆瘤浮萍的形态学特征

圆瘤浮萍如图 A.1 (右) 所示: 根 1 条; 叶状体, 扁平, 呈倒卵形, 叶状体顶端非对称性, 有明显的气囊, 长 3~6cm, 宽 4~6cm; 脉 3~5 条; 根基其中一侧的囊内形成圆形新芽。

附录 B
(资料性附录)
培养基制备

B.1 瑞士标准 (SIS) 培养基

瑞士标准 (SIS) 培养基的配方见表 B.1。储备液 A-E 需用高压锅 (120°C, 15min) 或过滤膜 (约 0.2 μm 孔径) 灭菌。储备液 F (最好和 G) 只需过滤膜 (约 0.2 μm 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 ₃	8.5	85
	KH ₂ PO ₄	1.34	13.4
B	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	75
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.2	36
D	Na ₂ CO ₃	4	20
E	H ₃ BO ₃	1	1
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005	0.005
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	0.05
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.2	0.2
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01	0.01
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.01	0.01
F	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.28	1.4
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.17	0.84
G	MOPS (buffer)	490	490

制备 1L SIS 培养基, 900mL 去离子水中加 10mL 储备液 A、5mL 储备液 B、5mL 储备液 C、5mL 储备液 D、1mL 储备液 E 及 5mL 储备液 F, 用 0.1mol·L⁻¹ 或 1mol·L⁻¹ HCl 或 NaOH 调 pH 为 6.5±0.2, 用去离子水定容至 1L。

需要注意, 当试验中需控制 pH 值稳定时 (例如, 供试物含重金属或易水解), 加 1mL 储备液 G (MOPS buffer)。

B.2 20X AAP 生长培养基

20X AAP 培养基配方见表 B.2。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和黑暗条件下, 可储存 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 1M HCl 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 0.2μm 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) ^①	培养液 (mg/L) ^①
A1	NaNO ₃	26	510
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12	240
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4	90
A2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	290
A3	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.4	30
B	H ₃ BO ₃	1.34	13.4
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.42	8.3
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.16	3.2
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.3	6
	ZnCl ₂	3.3mg/L	66ug/L
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.4mg/L	29ug/L
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7.3mg/L	145ug/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.012mg/L	0.24ug/L	
C	NaHCO ₃	15	300
①除非注明是其他单位；			

B.3 STEINBERG培养基 (ISO20079)

B.3.1 浓度和储备液

改进的STEINBERG培养基适用于小浮萍及圆瘤浮萍。制备培养基应使用试剂纯或分析纯化学品和去离子水。

表B.3 pH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 ₃	101.12	350.00	3.46
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236.15	295.00	1.25
KH ₂ PO ₄	136.09	90.00	0.66
K ₂ HPO ₄	174.18	12.60	0.072
MgSO ₄ ·7H ₂ 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 ₃ BO ₃	61.83	120.00	1.94

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.43	180.00	0.63
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.92	44.00	0.18
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197.84	180.00	0.91
FeCl ₃ ·6H ₂ 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 ₃	17.5
KH ₂ PO ₄	4.5
K ₂ HPO ₄	0.63
储备液 2	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.00
储备液 3	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ 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 ₃ BO ₃	120.00
储备液 5	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180.00
储备液 6	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44.00
储备液 7	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180.00
储备液 8	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760.00
EDTA Disodium-dihydrate	1500.00

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），推荐储备液8过无菌滤膜（0.2μm）。

B.3.2 STEINBERG最终浓度培养基的制备

储备液1、2和3各20mL（见表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（见表B.5），调节pH至5.5±0.2（加最小量的NaOH或HCl调节），用去离子水定容至1L。如果储备液是无菌的，加入无菌的去离子水，最终培养基无需灭菌。如培养基需要灭菌，则**储备液8**应在培养基高压灭菌（121℃，20min）后加入，培养基pH（最终酸碱度）应为5.5±0.2。

附录 C
(资料性附录)
记录表格 (示例)

- 验收和存放记录参见表 C.1。
- 日常培养记录参见表 C.2。
- 接种记录参见表 C.3。
- 分离纯化记录参见表 C.4。
- 浮萍保种记录参见表 C.5。
- 培养基配制记录参见表 C.6。

表 C.1 引入和验收记录

名称	
品系	
引入日期	
引入数量	
来源	
验收内容	品系证书: 有 <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/>
	包装确认:
	外观与状态确认:
实验室内批次	
存放位置	
品系确认	方法:
	结论:
验收人/验收日期	

表 C.2 日常培养记录

观察日期 (年/月/日)	试材 批次	容器 编号	培养基 pH	光照强度 (lux)	培养温度 (°C)	湿度 (%)	有无 污染

注：程序执行用“√”表示，程序未执行用“—”表示，异常状况要具体注明，包括（环境、培养基、水、物理伤害等），处理方法需具体注明

表 C.3 接种记录

接种日期（年/月/日）		
浮萍试材批次		
试材有无污染		
接种容器类型及编号		
每个容器接种浮萍植株数（个）		
接种数量（瓶/皿）		
培养用生长室/仪器编号		
培养条件	光照强度（lux）	
	培养温度（°C）	
	湿度（%）	
	培养基 pH	
操作者及操作日期		

表 C.4 分离纯化记录

分离纯化日期（年/月/日）		
浮萍试材批次		
培养用生长室/仪器编号		
次氯酸钠溶液的配制	溶液浓度及编号	
	基本信息（厂家/批号）	
	使用体积（mL）	
	加水体积（mL）	
分离纯化容器类型及编号		
分离纯化数量（瓶/皿）		
操作者及操作日期		

表 C.5 保种记录

保种日期（年/月/日）		
浮萍试材批次		
保种数量（瓶/皿）		
培养用生长室/仪器编号		
保种培养条件	光照强度（lux）	
	培养温度（℃）	
	湿度（%）	
	培养基 pH	
操作者及操作日期		

表 C.6 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								
Na ₂ CO ₃								
H ₃ BO ₃								
CuSO ₄ ·5H ₂ O								
ZnSO ₄ ·7H ₂ O								
MnCl ₂ ·4H ₂ O								
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O								
Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O								
Na ₂ EDTA·2H ₂ O								
FeCl ₃ ·6H ₂ O								
MOPS (buffer)								
仪器编号								
操作者/日期								
^a : 以 SIS 培养基为例; ^b : 备注储存位置、条件及有效期。								