

· 专论与综述 ·

农药生态毒理学概念及方法学探讨

李少南*

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

摘要: 农药生态毒理学是横跨毒理学、农药学和生态学的一门交叉学科。文章从“关注对象”、“关注层面”、“学科归属”和“成果应用”4个方面归纳了“农药生态毒理学”与“农药环境毒理学”的区别,并从“试验历期”、“剂量设置”、“可控性”、“暴露评估”以及“研究的阶段性”等不同侧面阐述了农药生态毒理学研究的方法学要素。对于除人类以外的非靶标生物的关注以及提倡用生态学方法进行研究,是农药生态毒理学区别于农药环境毒理学的明显特征。按照试验历期的长短,农药生态效应评估试验可分为“急性”、“亚急性”和“慢性”3类;按照试验条件的可控性,则可分为“室内”、“半田间”和“田间”3个层次。从经济和时效性角度考虑,农药生态效应评估试验应遵从先急性、后慢性,先室内、后田间的顺序;为避免出现“假阴性”结果,试验设计时应确保受试生物在室内试验中所受的胁迫强度高于半田间或田间试验。鉴于农业生态系统的多样性和复杂性,农药生态毒理学家应该有意识地使其研究内容和研究方法与现有的农药生态风险评估体系相衔接,惟其如此,相关研究成果的生态学意义才能够得到充分体现。随着人们对农药与农业生态系统相互关系认识水平的提高,农药生态毒理学在理论及实践方面将会得到进一步发展,并将反过来促进农药生态风险评估体系的发展和完善。

关键词: 农药;生态毒理学;生态系统;风险评估

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2014.04.02

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1008-7303(2014)04-0375-12

Pesticide ecotoxicology: concepts and methodology

LI Shaonan*

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The discipline of pesticide ecotoxicology stretches across toxicology, pesticide science, and ecology. The pesticide ecotoxicology and the pesticide environmental toxicology were compared from four aspects, *i. e.* ‘organisms in concern’, ‘levels in concern’, ‘discipline affiliation’ and ‘practical employments’. Methodology of the discipline was outlined from a few aspects, such as ‘test spans’, ‘dosages selected’, ‘controllability’, ‘exposure estimations’, ‘research phases’, etc. The outstanding feature of the discipline is that it pays more attention to non-target organisms apart from the human being and favors to study them from ecological point of view. The hazard estimation experiments can be classified as ‘acute’, ‘subchronic’ and ‘chronic’, based on the test spans, and they can be divided into ‘indoor’, ‘semi-field’ and ‘field’, according to the controllability of the experiments. From economical and temporal point of view, the experiments should start from acute

收稿日期:2014-01-25;修回日期:2014-04-15.

作者简介: * 李少南,通信作者(Author for correspondence),男,博士,副教授,主要研究方向为农药生态毒理,**E-mail:** snli@zju.edu.cn
基金项目:浙江省自然科学基金(LY12B07008).

and/or indoor, and followed, if necessary, by chronic and/or field. To avoid ‘false negative’ results, one must ensure that the organisms be exposed in severe stress in indoor experiments compared with those being exposed in field experiments. Considering the diversity and complexity of agricultural ecosystems, ecotoxicologists should consciously accord the items and the methodologies of their researches to the requirements of risk assessment. Only then the ecological senses of them could be properly revealed. Along with deepen in understanding of the interaction between pesticides and ecosystems, the discipline of pesticide ecotoxicology would progress in both theory and practice and this would in turn promote ecological risk assessment of pesticides.

Key words: pesticide; ecotoxicology; ecosystems; risk assessment

对于生态系统中残留的农药,很多时候人们所关心的并不是它们对系统中某一个或几个环节的影响,而是对系统的整体影响。鉴于生态系统的多样性和复杂性,农药生态毒理学的许多研究成果所蕴藏的生态学意义,往往需要在经过风险评估之后方能得到揭示。正因为如此,农药生态毒理学的研究内容和研究方法与农药生态风险评估体系之间始终存在着相互依存、相互制约及相互促进的关系。近20年来,农药生态毒理学本身有了较快的发展,相应地,农药生态风险评估体系也在不断发展和完善。对于后者,近年来已有不少相关文献报道^[1-3]。在此,笔者拟主要从农药生态毒理学的概念和方法学要素方面进行阐述,以加深人们对该学科的认识和理解。

1 农药生态毒理学的内涵和外延

“生态毒理学(ecotoxicology)”一词最早是由法国毒理学家 René Truhaut 提出的。Truhaut 当时给生态毒理学所下的定义为:“毒理学的一个分支,注重研究自然或人类来源(人工合成)污染物对于作为生态系统组成部分的动物(包括人类)、植物和微生物等的整体影响^[2]”。自从 Truhaut 给出该定义之后,不断有学者提出了自己的观点。具体可参见 Connell 等^[4]、Chapman^[5]、王德铭^[7]、孟紫强^[8]及 Tarazona 等^[9]的著述。基于各自的专业背景,这些学者就生态毒理学给出了不同的解释,这在一定程度上影响了人们对“农药生态毒理学”内涵和外延的界定。比照 Truhaut 的定义,可以认为,农药生态毒理学是研究农药及其有毒代谢产物对作为农业生态系统组成部分的非靶标生物影响的一门学科。

农药在野外的迁移和降解,其过程与室内模拟条件下相似,因此可采用室内的研究结果外推,但就效应而言,则必须重视二者的区别。一个明显的例子,现实生态系统如果受到农药的胁迫,随着胁迫因

子的减弱或消失,系统本身有可能恢复,但这在室内条件下几乎不可能发生。在现实生态系统中,农药直接的作用对象虽然是个体,但该个体身处包含多个物种的群落之中,而群落与外界之间又保持着频繁的物质和能量交换,因此若想揭示农药在系统层面的危害效应,必须借助生态学的理论和方法。

作为起源关系极为密切的2个学科,农药环境毒理学和农药生态毒理学在概念上存在交叉。其区别主要体现在:1)关注对象不同。对于非靶标生物,农药环境毒理学重点关注人类,而农药生态毒理学则重点关注人类以外的其他物种;在介质方面,生态毒理学重点关注土壤、水/底泥系统以及大气,而环境毒理学重点关注农作物可食部分、饮用水以及人类频繁活动的场所。2)关注层面不同。对于危害,农药生态毒理学重点关注农药的群落和系统效应,即关注农业生态系统的多样性和完整性是否因为农药的使用而遭到损害;而农药环境毒理学目前重点关注农药在个体及个体以下层面的危害效应。3)学科归属不同。农药环境毒理学从本质上讲属于预防医学的一个分支,而农药生态毒理学在本质上属于生态学。4)成果的应用领域不同。农药生态毒理学的研究成果主要应用于农药生态风险评估;相应地,农药环境毒理学的研究成果主要应用于农药健康风险评估。

对于除人类以外的非靶标生物的关注以及提倡用生态学方法进行研究,是农药生态毒理学区别于农药环境毒理学的明显特征。在现实科研中,农药生态毒理学家有时会以细胞、分子乃至基因为对象来研究农药的毒害效应,而农药环境毒理学家有时也会采用“流行病学”等研究方法。但值得注意的是,农药环境毒理学家在从事流行病学调查时,他们所关注的始终是被调查群体中的个体——人,而农药生态毒理学家在研究细胞、分子乃至基因时,他们其实并不关注农药在这些层面的毒害效应本身,而

是想进一步了解这些毒害效应与被暴露群体的生存状况之间的关联^[10-11]。

2 农药生态毒理学研究的方法学要素

农药生态毒理学研究涉及面广,内容庞杂,因此只有突出重点、周密设计、严格实施,所得结果才有可能最大限度地满足农药风险评估的客观需求。以下将从不同角度对农药生态毒理学研究的方法学要素加以探讨。

2.1 试验历期

按照历期,农药生态效应评估试验可分为“急性”、“亚急性(或称“亚慢性”)”和“慢性”3种类型。

2.1.1 急性毒性试验 急性试验用于检测生物短期接触高剂量农药后的中毒反应。典型的急性试验是在一次性给药的方式下进行的,美国环保署(EPA)的“鸟类急性口服试验”^[12]和“蜜蜂急性接触试验”^[13-14]即属于此类型。而经济合作与发展组织(OECD)的“蜜蜂急性经口试验”^[14]和我国现行“化学农药环境安全评价试验准则”^[15-17]中的“赤眼蜂(成蜂)急性接触试验”规定染毒时间为1 h,均属于不太典型的急性试验。

急性试验要求受试生物在急性染毒后的观察期要足够长^[18]。所谓足够长,是指在该时段内,农药对受试生物的毒害效应随观察期的延续而明显增强,超出这一时段,农药的毒害效应则不再随观察期的延续而增强。

在OECD颁布的“鱼类急性(96 h)毒性试验”^[19]、“水蚤急性(48 h)毒性试验”^[20]、“蚯蚓急性(14 d)毒性试验”^[21]、“鸟类(5 d)饲喂毒性试验”^[22]、“藻类(72 h)生长抑制试验”^[23]等试验中,受试生物接触药剂的时间与试验历期相同,因此它们并非典型意义上的急性试验。之所以仍将其划归于急性试验的范畴,是因为在这些试验中受试生物接触药剂的时间很短(通常只有1到数天),且该时间段只占受试生物整个生命历期的很小一部分。

除OECD“藻类(72 h)生长抑制试验”^[23]这样的以种群抑制率为测试终点的试验外,急性试验通常以死亡率作为测试终点。

2.1.2 亚急性毒性试验 亚急性试验是在持续胁迫或重复给药的方式下进行的,此类试验的历期明显长于急性试验,如OECD的“鱼类长期(14 d)毒性试验”^[24],EPA的“蚯蚓亚慢性(28 d)毒性试验”^[25]等。虽然死亡率仍是常用的测试终点,但体

长、体重等个体指标在此类试验中受到了更多的关注。

2.1.3 慢性毒性试验 慢性试验是为衡量生物长期暴露于低剂量化学品中所受的毒害而设立的,其历期通常涵盖受试生物生活史的大部分时间或者整个世代,如EPA和OECD的“溞类(21 d)繁殖毒性试验”^[26-27]、OECD的“摇蚊沉积物毒性试验”^[28-29]等。相对于急性试验中的死亡率,慢性试验更侧重于关注受试生物的体长、体重等个体指标,以及生殖率、种群内禀增长率等群体指标^[26-27]。

将急性试验的结果与农药在环境中的短期沉积量相比较,可以得知农药对环境生物的急性风险(acute risk);相应地,将亚急性或慢性的试验结果与农药在环境中的长期沉积量相比较,可得知农药对环境生物的长期风险(chronic risk)^[30]。

2.2 剂量设置

农药生态效应评估试验的剂量(或浓度)设置方案主要有2种,即考虑或不考虑农药的环境沉积量,前者可称之为“主观剂量法”,后者可称作“客观剂量法”。

所谓主观剂量法,即试验剂量(或浓度)是由研究者主观确定的。采用该方法开展试验时,其目的在于建立剂量-效应方程,再根据所建立的方程求得 $x\%$ 效应值(ED_x)或 $x\%$ 效应浓度(EC_x),或者通过各处理组之间或处理组与对照组之间的差异显著性分析,求得受试物的最高无作用剂量/最低有效剂量(NOED/LOED)或最高无作用浓度/最低效应浓度(NOEC/LOEC),进而确定受试物的最大允许剂量(maximal allowable toxicant dosage, MATD)或最大允许浓度(maximal allowable toxicant concentration, MATC)。

需要指出的是,采用主观剂量法的试验,因其以建立剂量-效应方程、求取效应中值(ED_{50})或效应中浓度(EC_{50})为目的,所以判断试验设计合理与否,要看所设剂量下的效应变化能否满足回归分析的需要。至于各剂量组(包括对照组)内部是否需要设置重复以及需设置多少个重复,在此并非重点^[28-29](测试终点为数量型结果的例外,因为这些试验中每一剂量组的数据均需要与对照组比对,因而此时的对照组宜多设重复);相反,如果试验以求取MATD或MATC为目的,则各剂量组(包括对照组)内部不仅必须设置重复,而且重复次数需达到一定标准,以满足差异显著性分析的需要。

采用客观剂量法开展试验时,研究者以农药的

田间沉积量(或沉积浓度)作为剂量选择的依据^[31-32]。天敌和土壤微生物是较多采用客观剂量法进行测试的生物类群^[18, 33]。以田间沉积量(或沉积浓度)作为试验剂量的选择依据,从理论上讲,其结果可以直观显示受试农药的生态风险。然而该方法也具有局限性:首先,农药田间沉积量预测结果本身即存在一定的误差;其次,即便选定的剂量能够真实反映农药的田间沉积量,其所反映的也仅是某一位点和某一时刻的沉积量。一旦处理组的效应与对照组差异不明显,人们将无从推断受试农药在更高剂量下可能产生的影响。可见从风险评估的角度,客观剂量法的试验结果并不具有更高的利用价值,相反,将通过主观测量法测得的有害剂量(EC_{50} 、NOEC/LOEC等)与暴露数据相对照,不但能够判断相关农药在某一时空节点的风险大小,而且能够给出这种风险的时间和空间分布。

2.3 试验的可控性

按照试验的可控性,农药生态效应评估试验大致可分为“室内”、“半田间”和“田间”3个层次。

2.3.1 室内试验 室内试验要求在相对稳定的环境条件下进行。例如“OECD 化学品测试准则”判断鱼类和溞类试验结果是否有效的前提之一,就是稀释液中的溶解氧含量在试验过程中能否保持在其饱和值的60%以上,为了满足这一条件,有时需要周期性地更换稀释液,甚至可能需要在“流水”条件下进行试验^[19-20]。再如土壤微生物试验,“OECD 化学品测试准则”规定土壤含水量应控制在最大持水量的40%~60%之间^[31-32],相应地,美国EPA“生态效应测试准则 OPPTS 850.5100”对于土壤含水量的规定值为10 kPa左右^[34]。

环境标准化是人们对室内试验的一项基本要求。天然土壤由于理化性质各异,导致农药在其中的有效性(availability)不同,因而有可能影响试验结果的重现性,为此,除微生物试验外,原本以土壤为基质的试验,目前大多以人工土代替^[21, 28-29, 35]。

室内生物试验中所用的受试物种通常要求具有较高的经济价值和/或生态价值,材料易得,并具有较强的生命力。我国现行“化学农药环境安全评价试验准则”推荐鲤鱼 *Cyprinus carpio* 和斑马鱼 *Brachydonio rerio* 作为鱼类急性毒性试验的代表物种。鲤鱼在我国各地均有分布,又是重要的经济鱼类,因此我国选用鲤鱼的理由跟欧美国家选用虹鳟鱼 *Oncorhynchus mykiss* 和太阳鱼 *Lepomis cyanellus* 完全一致;斑马鱼是一种小型的热带观赏鱼,其在我

国境内并没有自然分布,更谈不上所谓经济和生态价值,但该鱼室内生命力强,易于繁殖,因而同样成为了常用的受试物种;以同样原因入选的受试物种还有非洲爪蟾 *Xenopus laevis*、赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* 等。相反,在我国分布广且具有重要经济价值的“四大家鱼”(青鱼、草鱼、鲢鱼、鳙鱼)却很少被选作毒性试验的受试物种,其原因则是由于这些鱼类的幼体很难适应室内饲养。

虽然室内试验的对象以单物种居多,但也有例外。在检测化学品对土壤微生物碳转化和氮转化影响的试验中,作为介质的土壤包含了多种微生物,因此此类试验在本质上属于小型微宇宙试验^[31-32]。类似的还有美国测试和材料学会(ASTM)颁布的“标准化水生微宇宙(standard aquatic microcosm, SAM)试验”^[36-37]。

室内试验所能采用的给药方式不可避免地会受到风险评估体系的影响。以家蚕为例,从技术的角度,可采用的给药方式包括“浸叶”、“浸虫”、“点滴”、“拌叶”、“定量喷雾”等,但从风险评估的角度考虑,只有定量喷雾法和拌叶法的测定结果能够与现有评估体系较好地衔接,因此应优先采用。当可选的给药方式不止1种时,应以评估目标作为选择的向导。如对于非靶标植物,可用的给药方式有“水培”、“土培”、“叶面喷雾”等,但对于茎叶处理剂,如除草剂草甘膦等,则只有叶面喷雾法的测定结果能够为风险评估提供有价值的信息,采用其他给药方式所得的测量结果很可能使评估结论出现偏差。

2.3.2 田间和半田间试验 以室内试验,特别是单物种室内试验的结果来推测农药对农田及周边区域的生态效应,其结果的可靠性往往受到质疑。这主要是因为:1)野外环境条件,如温度、湿度、光照等的昼夜和季节性变化,以及农药野外残留的时空变化等在室内条件下很难准确模拟。2)农药的诸多效应,如间接毒性、二次毒性、趋避作用等,在室内条件下很难被准确测量。3)在室内条件下,人们很难观测到被暴露系统的恢复情况。鉴于室内试验在预测农药生态效应方面的局限性,当存在争议时,田间试验就成为了人们否认(或者确认)农药产品生态风险的最终依据。图1形象地展示了田间试验在农药生态风险评估中的地位 and 作用。

从图1可看出,田间试验的作用主要体现在:1)为(暴露)模型提供来自田间的验证数据。2)最终否认(或确认)农药产品的生态风险。3)为农药

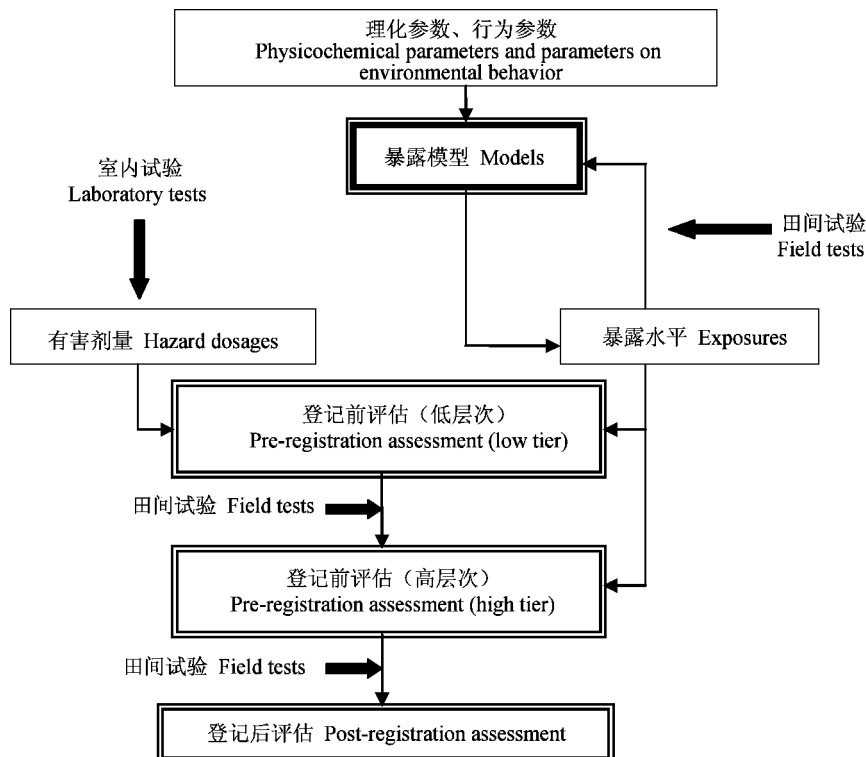


图1 田间试验在农药生态风险评估中的地位和作用

Fig. 1 Position and function of field tests in pesticide ecological risk assessment

的“登记后评估”提供数据。

田间试验虽然能够较为真实地反映农药的生态风险,但通常存在花费昂贵、试验周期长、可控程度低、结果重现性差等缺点。鉴于此,人们又设计出一系列相当于中间环节的试验系统,即“半田间试验”系统。根据所占空间的大小,半田间试验系统可进一步被划分为“微宇宙(microcosms)”、“中宇宙(mesocosms)”及“大宇宙(macrocosms)”,其共同特点是既可在一定程度上保留生态系统的结构和功能,又允许人们对系统进行一定程度的操控^[38-39]。至于微宇宙、中宇宙和大宇宙的具体规格划分,目前学界尚无定论。对水生生物而言,Heimbach^[40]认为:小于 0.1 m^3 的,只能算作“烧杯”; $0.1\sim 1\text{ m}^3$ 的,可算作“水族箱”; $1\sim 15\text{ m}^3$ 的,可视为微宇宙;而可以被称作中宇宙的,应该是体积大于 15 m^3 的水生生态系统。从生物结构上,上述半田间试验系统又可划分为“静水(lentic)”和“流水(lotic)”两大类。其中静水系统可以再区分为以维管植物为主要能量来源、物种构成比较复杂的“浅水系统”和以浮游植物为主要能量来源、物种构成比较简单的“深水系统”。需要特别指出的是,浅水系统所代表的池塘沿岸和排水沟渠是较容易受到农药污染的区域,故应得到农药生态毒理学家的重

点关注。

2.3.3 层次之间的衔接 从经济和时效性的角度,为评估农药生态效应而开展的试验应遵从先急性后慢性,先室内后田间的顺序。如果室内试验的结果能够明确否认受试农药的生态风险,整个试验即可终止;相反,如果室内试验的结果显示受试农药具有风险,要明确这种风险是否真会在田间发生,则需进一步开展半田间甚至田间试验。

为避免在试验的任何层次上出现假阴性结果,试验设计者应该确保受试生物在室内试验中所受的胁迫强度高于半田间或田间试验^[18, 41]。例如“OECD 化学品测试准则”中的“鱼类急性(96 h)毒性试验”,其质量控制标准之一就是在整个试验过程中,受试药剂在稀释液中的实际浓度始终不低于理论添加浓度的20%^[19]。又如“OECD 化学品测试准则”之“土壤微生物氮转化试验”和“土壤微生物碳转化试验”给土壤微生物群落设定了一个代表“最差状况(worst case situation)”的基质条件,预期化学品在此基质中的有效性最高且降解率最低,如果在以该基质配制的毒土中测得农药对土壤微生物碳转化或氮转化的抑制作用不明显,就无需再用其他基质进行测试^[31-32]。

同样是出于避免假阴性结果的考虑,在受试生物的选择上,生态毒理学家在室内试验中倾向采用处于生理敏感期的生物个体,如出生后 6~24 h 的幼蚤、蛙类蝌蚪、2 龄起家蚕(其大小可确保症状观察能够顺利进行)、羽化赤眼蜂等。这与在室内药效试验中倾向采用非敏感个体(如末龄幼虫)的经济昆虫学家的做法有所不同。

2.4 暴露评估

开展暴露评估的目的在于确定农药在环境介质中的沉积量及沉积范围。方法主要有 2 种:实地测量和模型预测。表 1 为农药初始残留分布的实地测量数据(测量时的气温为 25 °C,风速 5 m/s)。基于这些数据,人们可以推算出药剂在不同作物农田周围的沉积量和沉积范围。

表 1 农药漂移基础数据^[42]

Table 1 Basic drift values used for pesticide exposure assessment^[42]

距田边的距离 Distance from field edge/m	漂移率 Spray drift ^a /%				
	大田作物 Field crops	高秆作物 Tall growing crops ^b			
		葡萄树 Grape vine		其他果树 Other fruit trees	
		前期 Early stage	后期 Late stage	前期 Early stage	后期 Late stage
1	1.39				
2	0.58				
3	0.41	4.99	2.39	18.16	9.18
5	0.24	2.88	0.75	12.02	4.92
10	0.11	0.91	0.21	5.74	1.84
20	0.04	0.24	0.06	1.90	0.51
30	0.02	0.11	0.03	0.89	0.22

注:^a漂移率是指漂移部分占农药整个喷施用量(单位:kg/hm²)的百分率。用漂移率计算农药在施药区外围某一位点的沉积量(D , kg/hm²),其公式为: $D = \text{施药量} \times \text{农药在施药区外某一位点的漂移率}$ 。^b用鼓风机喷雾器喷施农药。

Note:^a Spray drift is the percentage drifted against rate (unit: kg/hm²) applied by spray. It can be used to calculate deposition (D , kg/hm²) of pesticide at a point outside application area. The formula is: $D = \text{application rate} \times \text{spray drift at a point outside application area}$. ^bThe pesticide was applied by air blast sprayer.

模型预测是确定农药沉积量和沉积范围的另一种常用方法。人们针对特定场景(scenario)开发了相应的预测模型,如预测农药在水体中沉积量的 GENEEC 和 EXAMS,预测农药在旱地沉积量的 T-REX 和 TIM,以及可预测农药在大气中含量的 AgDRIFT® 和 AgDISP 等^[43]。

在运用上述模型时,人们首先需要了解相关农药的使用方式和用量,此外还需了解该农药的理化性质和环境行为等信息(表 2)。其中涉及农药环境行为的信息既可来自室内试验,也可来自半田间或田间试验,但在大多数情况下其来自于室内试验。

2.5 名义浓度和实测浓度

将农药暴露水平与其有害剂量相对比,即可获得该农药对于非靶标生物的“风险商值(risk quotient, RQ)”。RQ 属于无单位量纲。作为 RQ 的决定因子,暴露水平和有害剂量在衡量尺度上应该一致,而基于化学分析的“实测浓度(actual concentrations)”正是提供了这样一种衡量尺度。因

此从理论上讲,有害剂量通常应该以实测浓度来衡量;至于“名义浓度(nominal concentrations)”,只有当有证据表明其与实测浓度高度吻合(吻合度达到 80%^[19])时,才可取代后者而参与有害剂量的确定,进而参与 RQ 的求取。由此可见,从风险评估的角度,在进行毒性试验的过程中总是应该同步测量各处理组的农药含量,以求得基于实测浓度的 EC_x 或 MATC。

2.6 研究的阶段性

在农药产品登记之前开展的研究,可以称之为“预测性研究(prospective studies)”,旨在明确农药产品入市之后可能造成的生态风险;针对已经获得登记的农药产品而开展的研究,应该称之为“追溯性研究(retrospective studies)”。尽管生态毒理学的研究方法和生态风险评估体系均在不断改进和完善,但鉴于生态系统的多样性和复杂性,任何管理部门和研究机构都不能确保已通过评估程序并获得登记的农药产品在实际使用中不会对农田及周边区域

造成不良影响,因此有必要开展追溯性研究。不仅如此,有一些农药产品在预测性研究中即被认为具有某种程度的生态风险,但经过风险-效益评估,在附加了限制条件之后被允许进入市场,至于这些限

制是否合理,是否需要进行修改,要回答诸如此类的问题,也需要开展追溯性研究。追溯性研究的结果仍有可能对评估结论产生重大影响。

表 2 暴露评估中常用的农药理化性质和环境行为参数

Table 2 Some physic-chemical properties and parameters on environmental behaviors employed in pesticide exposure estimations

化学圈 Chemosphere	理化性质 Physic-chemical property	环境行为特征 Environmental behaviors	
		移动性 Mobility	降解性 Degradability
土壤 Soil	—	吸附/解吸附,淋溶性(薄层层析、柱淋溶)、挥发性 Absorption/desorption, leaching (thin-layer and column chromatography), volatility	光解性、降解性(好氧、厌氧) Photolysis, degradability (aerobiotic, anaerobic)
水/沉积物 Water/sediment	水溶性、水解性 Solubility, hydrolysis	挥发性 Volatility	光解性、降解性(好氧、厌氧) Photolysis, degradability (aerobiotic, anaerobic)
大气 Air	蒸气压 Vapor pressure	—	光解性 Photolysis

2.7 生物标志物

在包括农药在内的化学污染物的胁迫下,生命有机体的生理和生化过程会发生改变,这些改变可通过组织学和形态学等特征表现出来,甚至影响到物种的行为和生存。因此从理论上讲,任何与生命活动有关的生理和生化过程,包括相关的组织学、形态学特征,只要易受污染物的影响而发生变化,均有可能成为生态毒理学的“生物标志物(biomarkers)”。在众多生物标志物中,应用最广的当数来自动物脑和血清中的胆碱酯酶(cholinesterase, ChE)^[44-47]。

从应用的角度,生态毒理学研究所选用的标志物应该具有较高的灵敏度和适当的特异性。以氨基乙酰丙酸脱水酶(aminolevulinatase dehydratase, ALAD)为例,由于该酶对铅十分敏感,若水禽血液中 ALAD 活性下降,则无需进一步测定即可断定水禽血液中铅的含量达到了一定水平^[48]。同样,当水生和陆生动物脑和血清中 ChE 活性下降时,说明动物机体受到了有机磷或氨基甲酸酯类杀虫剂的污染^[44-47]。就特异性而言,ChE 不如 ALAD,因为要想判断污染源究竟来自何种有机磷或氨基甲酸酯,仍需要对样品进行化学分析。需要指出的是,生物标志物的特异性并非越高越好,比如 ALAD,其特异性虽高,但是对 ALAD 的测定结果并不能提供有关其他污染物的任何信息。

除了显示环境中污染物的存在之外,生态毒

理学家还希望标志物能够显示污染物的毒害效应,即具有预警功能。在仪器分析手段已日益完善的今天,生物标志物之所以仍然能够吸引研究者的关注,其原因正在于此。例如在溞类的研究中,人们已经将注意力放在 ChE 活性变化与被暴露群体生物量变化的对应关系上^[10-11, 49]。需要指出的是,生物标志物的反应与污染物有害效应之间是否存在对应关系,以及究竟存在何种对应关系,要视标志物和污染物的种类和性质而定。这方面尚有许多问题等待人们去探究。

开展农药生态效应评估试验,往往需要大量收集物种及其生物量方面的信息。此类信息有时可以通过对诸如磷脂脂肪酸、几丁质酶等标志物的测定而获得^[50-51]。充分利用这类标志物,可以在一定程度上减少因为取样及样品鉴定所造成的误差。

3 其他要素

除上文已提到的主要方法学要素之外,另有一些要素,如良好实验室规范(GLP)、试验准则、动物福利等,从概念上讲它们并不专属于农药生态毒理学,但是这些要素深刻影响着该学科的研究内容和研究方法,故在此一并加以探讨。

3.1 GLP

GLP 的最初建立被认为与 20 世纪 70 年代发生在美国的涉及药品和化学品(主要是农药)的一系列动物试验诈骗案件有关^[52]。1979 年,美国食品

药品监督管理局(FDA)颁布了世界上第一个GLP法规;1980年,美国EPA颁布了有关农药的GLP法规;1981年,以美国FDA的GLP法规为蓝本,OECD推出了涵盖所有化合物的GLP法规^[53]。

我国GLP建设首先是从医药领域开始的,农药行业的GLP建设始于2002年,此后农业部陆续制订了涉及农药理化性质、残留、毒理和环境毒理的GLP准则,并于2010年5月公告了沈阳化工研究院安全评价中心等6家农药GLP实验室。

建立GLP的目的在于加强对试验机构及试验操作的管理。按照GLP的要求开展试验,其相关的一切过程,包括人员任命、培训、样品接收、试验方案制定、试验操作、样品采集、仪器使用、试验结果记录、质量核查、资料保存等均需要加以“文件化”,以便自查和外部核查。基于上述原因,GLP体系下形成的数据在真实性方面具有比较可靠的保障。

对于农药,在涉及质量、药效、健康风险及环境风险的各项试验中,产品质量和药效试验较多关乎生产商的经济利益,而健康风险和环境影响试验较多关乎公众利益,为确保试验结果的真实性,有必要将这2类试验过程置于GLP的管控之下。对于一些探索性的课题,例如确认化学品的某种未知危害方式或作用机理等时,出于知识产权保护或其他类似原因,研究者不愿公布其研究过程或研究方法的细节,这在学术界并非不可接受,但这种做法与GLP所倡导的“公开性”原则相冲突,所以在对于非GLP数据的选用上,风险评估人员往往持谨慎态度,在同等条件下,他们会优先选用GLP体系下的数据。

3.2 试验准则

人们早已认识到,方法上的细微差别会对测试结果产生明显影响。例如在测定农药对鱼的急性毒性时,供试鱼的龄期、试验温度、暴露时间(48 h或96 h)、稀释水的水质等均会影响试验结果。又如薄层层析试验中,因土层厚度不同,农药在其上的移动性也会有所不同。为此有必要对测试方法加以规范,以保证不同实验室的不同人员在不同时刻开展试验,均能够得出相同或相近的结果。可见,制订各类试验准则的目的之一是确保试验结果的重现性。

目前OECD所制定的化学品测试准则中均包含了对试验本身的质量要求。例如“溞类(21 d)繁殖毒性试验”,其质量要求之一是在试验结束时对照组每一雌性个体的平均繁殖量 ≥ 60 ^[27];又如“藻类(72 h)生长抑制试验”,其质量要求之一是在试

验结束时对照组的细胞密度 \geq 试验开始时的16倍^[23]。这些要求若得到满足,相关试验才被认为是合格的。

从1981年起,OECD陆续颁布了一系列“化学品测试准则”^[54]。这些准则共包含5个系列:1)理化特性(physical chemical properties);2)生物效应(effects on biotic systems);3)降解和蓄积(degradation and accumulation);4)健康效应(health effects);5)其他(主要涉及农药残留)。截至2013年7月,生物效应系列中共收录了涉及19种(类)生物的35项(急、慢性)试验准则;降解和蓄积系列中共收录了涉及生物富集、土壤和水/沉积物(好氧和厌氧)转化、(土)柱淋溶以及(水中)光转化的7项试验准则;而有关水解和土壤吸附的试验准则被收录在系列1(理化特性)中。这些准则基本涵盖了涉及农药生态风险评估的各项室内试验。

联合国粮农组织(FAO)于1979年召开了有关农药生态风险评估程序和资料要求的专家咨询会议,并于1981年颁布了有关“农药登记环境试验”的若干准则(即:second expert consultation on environmental criteria for registration of pesticides)^[55]。1989年,FAO又对该准则做了修订,最终将农药登记的环境试验分为3部分:1)理化性质(physico-chemical properties);2)归趋和移动(fate and mobility in environment);3)环境效应(effects on environment)^[56]。

美国EPA的“化学安全和污染防治办公室(OCSPP)”自1996年起陆续制订了11个系列的试验准则,即“OPPTS(the office of prevention, pesticides and toxic substances)测试准则”^[57]。其中与农药生态风险评估相关的试验准则分别被收录在“OPPTS 835”、“OPPTS 840”和“OPPTS 850”之中。OPPTS 835收录了涉及“归趋(fate)”、“迁移(transport)”和“转化(transformation)”方面的试验准则;OPPTS 840收录了涉及“喷雾漂移(spray drift)”的试验准则;有关“生态效应(ecological effects)”的试验准则被收录在了OPPTS 850之中。

我国有关农药环境行为和生态毒性试验的“化学农药环境安全评价试验准则”最初由南京环境科学研究所负责起草,经全国农药登记评审委员会讨论通过后,由国家环境保护总局于1989年颁布^[15-17]。该准则由“农药对环境安全性影响因素”、“农药环境安全性评价指标与评价试验程序”和“农药对环境安全评价试验准则”3部分组成,重点是第3部分。在该部分中,农药对环境的安全性评价试

验被分为2类:“农药环境行为特征评价试验”和“农药对非靶生物毒性试验”,每一类分别包含10项试验。以蔡道基院士为首的课题组于20世纪80年代中后期开展的一系列研究^[58-73]为该准则的起草奠定了基础。自2004年我国第一批农药登记环境毒理试验单位获得认证后,农业部农药检定所多次组织有关专家对该准则进行补充和修订,修订后的“化学农药环境安全评价试验准则”共包含农药环境行为特征评价试验8项,农药对非靶生物毒性试验13项。

随着人们认识的深化和提高,涉及农药生态毒理学的新的试验准则还将不断建立,旧的准则也会在修订中不断完善。但是,试验准则的建立当前是、将来也主要是为了解决生态毒理学研究中一些具有共性的科学问题,在对农药等化学品开展生态毒理学研究的过程中,人们会不断遇到各种特殊的具体问题,为解答这些特殊问题而开展的研究,现在没有、将来也不一定有相关的试验准则可供依赖。

3.3 动物福利及“3R”原则

所谓“动物福利”,即要求人们从生理和心理上善待动物。早在1959年,Russell和Burch^[74]在其著作《The Principles of Humane Experimental Technique》中,针对实验动物提出了以“减少(reduction)”、“替代(replacement)”和“优化(refinement)”为核心的“3R”原则。其中减少原则得以体现的一个明显例子,是OECD取消了“化学品测试准则”系列4(健康效应)中饱受批评的1981和1987年版的“401”,代之以“420”、“423”和“425”^[75-78]。

动物福利及“3R”原则对农药生态效应评估试验具有一定的影响。例如1981年版的OECD化学品测试准则“203”中对试验用鱼的数量未作规定,后来从减少试验用鱼的角度出发,1984年版的“203”规定每一浓度组不少于10条即可,1992年版的“203”则进一步规定每一浓度组不少于7条即可;与此同时,1981年版的“203”规定正式试验中相邻2个浓度的间隔比不得超过1.8,1984年版的“203”规定间隔比不得超过2,而在1992年版的“203”中,间隔比被放宽到了2.2^[19,79-80]。

对于试验结束之后的剩余个体,以往惯用的扔进垃圾桶、下水道等处理方式,从动物福利的角度衡量均属于违规行为。正确的方法应是依次采用丁香油和酒精进行处理,且顺序不能颠倒,也不可以将两者混在一起使用,原因是丁香油属于麻醉剂,能使鱼进

入昏迷状态,而酒精可使昏迷的鱼不再苏醒,但酒精本身无麻醉作用,并且会刺激鱼,因此如果先使用酒精或两者混用,则无法实现鱼的安乐死(euthanasia)。

4 结语

人类使用农药,其最初的目的是生产足够多的农产品。经过几代人的努力,该目标已初步实现,于是人们开始关注农产品的质量和安全性问题,并由此推动了农药环境毒理学的建立与发展。随后,人们进一步意识到仅仅重视人类自身的安全是不够的,还应该确保整个农业生态系统不会因为农药的使用而受到损害。在为实现这一目标而奋斗的过程中,农药生态毒理学从农药环境毒理学中分化出来并得以发展。因此可以把农药生态毒理学看作是农药环境毒理学发展到一定阶段的产物,是农药环境毒理学在生态领域的强调和补充。

鉴于生态系统的多样性和复杂性,以产品登记为目标的农药生态毒理学研究,其结果的生态学意义只有在经过科学评估之后才能够显现。为此,研究人员必须确保相关的研究内容和研究方法与现有评估体系之间的衔接。为了不使两者脱节,研究人员在试验设计阶段即应该加强与生产商和风险管理机构之间的信息沟通;在追求研究内容和方法的新颖性和先进性的同时,研究人员亦不可忽视对于GLP、现有试验准则以及动物福利原则的必要遵从,而不应主观认为这样做会束缚学科的发展。纵观历史,农药生态毒理学以往的研究成果导致了农药生态风险评估体系的建立,该体系今后的发展和完善同样离不开农药生态毒理学研究的新成果。

总之,随着人们对农药与农业生态系统相互关系认识水平的提高,农药生态毒理学在理论及实践方面均会得到进一步发展,并将反过来促进农药生态风险评估体系的发展和完善。

参考文献(Reference):

- [1] 续卫利,周军英,程燕,等. 农药生态风险分级标准研究[J]. 农药科学与管理, 2012, 33(12): 23-30.
XU Weili, ZHOU Junying, CHENG Yan, et al. Research on ecological risk classification standard of pesticide[J]. *Pestic Sci Admin*, 2012, 33(12): 23-30. (in Chinese)
- [2] 赵亮,周军英,程燕,等. 国内外农药生态风险评价暴露模拟外壳述评[J]. 生态与农村环境学报, 2012, 28(1): 10-18.
ZHAO Liang, ZHOU Junying, CHENG Yan, et al. Review of exposure simulation shells for pesticide ecological risk assessment [J]. *J Ecol Rural Environ*, 2012, 28(1): 10-18. (in

- Chinese)
- [3] 周军英, 程燕. 农药生态风险评价研究进展[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(4): 95-99.
ZHOU Junying, CHENG Yan. Advancement in the study of pesticides ecological risk assessment[J]. *J Ecol Rural Environ*, 2009, 25(4): 95-99. (in Chinese)
- [4] TRUHAUT R. Ecotoxicology-objectives, principles and perspectives [J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 1977, 1(2): 151-173.
- [5] CONNELL D, LAM P, RICHARDSON B, et al. Introduction to Ecotoxicology [M]. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd., 1999: 1-18.
- [6] CHAPMAN P M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 44(1): 7-15.
- [7] 王德铭. 生态毒理学的定义及方法学探讨[J]. 生态科学, 1992(2): 1-6.
WANG Deming. Definition and methods for ecotoxicology[J]. *Ecol Sci*, 1992(2): 1-6. (in Chinese)
- [8] 孟紫强. 关于生态毒理学与环境毒理学几个基本概念的见解[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(2): 97-104.
MENG Ziqiang. Discussion on some essential concepts of ecotoxicology and environmental toxicology [J]. *Asian J Ecotoxicol*, 2006, 1(2): 97-104. (in Chinese)
- [9] TARAZONA J V, DOHMEN G P. Chapter 5, ecotoxicology of rice pesticides [M] // CAPRI E, KARPOUZAS D. Pesticide Risk Assessment in Rice Paddies: Theory and Practice. Elsevier Ltd., 2007: 69-90.
- [10] PRINTES L B, FELLOWES M D E, CALLAGHAN A. Clonal variation in acetylcholinesterase biomarkers and life history traits following OP exposure in *Daphnia magna* [J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2008, 71(2): 519-526.
- [11] DUQUESNE S. Effects of an organophosphate on *Daphnia magna*, at suborganismal and organismal levels: implications for population dynamics[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2006, 65(2): 145-150.
- [12] EPA 712-C-96-139, Ecological effects test guidelines OPPTS 850.2100, avian acute oral toxicity test [S]. 1996-04.
- [13] EPA 712-C-96-147, Ecological effects test guidelines OPPTS 850.3020, honey bee acute contact toxicity [S]. 1996-04.
- [14] OECD No. 213, OECD guidelines for the testing of chemicals, honey bees, acute oral toxicity test [S]. 1998-09-21.
- [15] 南京环境科学研究所. 化学农药环境安全评价试验准则[J]. 农药科学与管理, 1990(2): 1-5.
Nanjing Institute of Environmental Sciences. Guidelines for testing and assessing environmental safety of chemical pesticides [J]. *Pestic Sci Admin*, 1990(2): 1-5. (in Chinese)
- [16] 南京环境科学研究所. 化学农药环境安全评价试验准则(续) [J]. 农药科学与管理, 1990(3): 3-5.
Nanjing Institute of Environmental Sciences. Guidelines for testing and assessing environmental safety of chemical pesticides (continue) [J]. *Pestic Sci Admin*, 1990(3): 3-5. (in Chinese)
- [17] 南京环境科学研究所. 化学农药环境安全评价试验准则(续) [J]. 农药科学与管理, 1990(4): 4-9.
Nanjing Institute of Environmental Sciences. Guidelines for testing and assessing environmental safety of chemical pesticides (continue) [J]. *Pestic Sci Admin*, 1990(4): 4-9. (in Chinese)
- [18] HASSAN S A. Standard methods to test the side-effect of pesticides on natural enemies of insect and mites[J]. *Bull OEPP/EPPO Bull*, 1985, 15(2): 214-255.
- [19] OECD No. 203, OECD guidelines for the testing of chemicals, fish, acute toxicity test [S]. 1992-07-17.
- [20] OECD No. 202, OECD guidelines for the testing of chemicals, *Daphnia* sp., acute immobilization test [S]. 2004-04-13.
- [21] OECD No. 207, OECD guidelines for the testing of chemicals, earthworm, acute toxicity tests [S]. 1984-04-04.
- [22] OECD No. 205, OECD guidelines for the testing of chemicals, avian dietary toxicity test [S]. 1984-04-04.
- [23] OECD/OCDE No. 201, OECD guidelines for the testing of chemicals, freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test [S]. 2006-03-23.
- [24] OECD No. 204, OECD guidelines for the testing of chemicals, fish, prolonged toxicity test; 14-day study [S]. 1984-04-04.
- [25] EPA 712-C-96-167, Ecological effects test guidelines oppts 850.6200, earthworm subchronic toxicity test [S]. 1996-04.
- [26] EPA 712-C-96-120, Ecological effects test guidelines OPPTS 850.6200, *Daphnid* chronic toxicity test [S]. 1996-04.
- [27] OECD No. 211, OECD guidelines for the testing of chemicals, *Daphnia magna* reproduction test [S]. 2012-10-02.
- [28] OECD No. 218, OECD guidelines for the testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment [S]. 2004-04-13.
- [29] OECD No. 219, OECD guidelines for the testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked water [S]. 2004-04-13.
- [30] 顾宝根, 程燕, 周军英, 等. 美国农药生态风险评价技术[J]. 农药学报, 2009, 11(3): 283-290.
GU Baogen, CHENG Yan, ZHOU Junying, et al. Review on USA pesticide ecological risk assessment techniques[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2009, 11(3): 283-290. (in Chinese)
- [31] OECD/OCDE No. 216, OECD guidelines for the testing of chemicals, soil microorganisms; nitrogen transformation test [S]. 2000-01-21.
- [32] OECD/OCDE No. 217, OECD guidelines for the testing of chemicals, soil microorganisms; carbon transformation test [S]. 2000-01-21.
- [33] EHLE H. Side-effects on soil microflora [C] // Abteilung für Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik, Braunschweig, Herausgegeben, von der Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Berlin-Dahlem. Criteria for Assessment of Plant Protection Products in the Registration Procedure. Berlin und Hamburg: Kommissionsverlag Paul Parey, 1993: 84-86.
- [34] EPA 712-C-96-161, Ecological effects test guidelines OPPTS 850.5100, soil microbial community toxicity test [S]. 1996-04.

- [35] OECD No. 222, OECD guidelines for the testing of chemicals, earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia anderi*) [S]. 2004-04-13.
- [36] ASTM E 1366-02, Standard practice for standardized aquatic microcosms; fresh water [S]. Philadelphia: ASTM, 2003-03.
- [37] 吴颖慧, 蔡磊明, 王捷, 等. 莠去津对标准化水生微宇宙的影响[J]. 农药学学报, 2008, 10(3): 343-348.
WU Yinghui, CAI Leiming, WANG Jie, *et al.* The effect of atrazine on standardized aquatic microcosm [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2008, 10(3): 343-348. (in Chinese)
- [38] TOUART L W. Aquatic Mesocosm Tests to Support Pesticide Registrations [M]. Washington, DC, 1988.
- [39] CAQUET T, LAGADIC L, SHEFFIELD S R. Mesocosms in ecotoxicology (1): outdoor aquatic systems [J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2000, 165:1-38.
- [40] HEIMBACH F. Methodology of aquatic field tests: system design for field tests in still water [M]//HILL I R, HEIMBACH F, LEEUWANGH P, *et al.* Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals. Boca Raton: CRC Press, 1994: 608.
- [41] SCHMIDT H W, BRASSE D, KÜNAST C, *et al.* Introduction of indices for the evaluation of tent tests and field tests with honeybees [J]. *Bulletin Insectol*, 2003, 56(1): 111-117.
- [42] GANZELMEIER H, RAUTMANN D, SPANGENBERG R, *et al.* Studies on the spray drift of plant protection products—results of a test program carried out throughout the federal republic of Germany [M]//Mitteilungen Aus Der Biologischen Bundesanstalt Fuer Land-und Forstwirtschaft 305. Braunschweig, 1995.
- [43] EPA. Models and databases [DB/OL]. [2014-05-29]. http://www.epa.gov/pesticides/science/models_db.htm
- [44] STIEN X, PERCIC P, GNASSIA-BARELLI M, *et al.* Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea [J]. *Environ Pollution*, 1998, 99(3): 339-345.
- [45] CAJARAVILLE M P, BEBIANNO M J, BLASCO J, *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach [J]. *Sci Total Environ*, 2000, 247(2-3): 295-311.
- [46] DEN BESTEN P J, VALK S, VAN WEERLEE E, *et al.* Bioaccumulation and biomarkers in the sea star *Asterias rubens* (Echinodermata: Asteroidea): a North Sea field study [J]. *Marine Environ Res*, 2001, 51(4): 365-387.
- [47] ABDEL-HALIM K Y, SALAMA A K, EL-KHATEEB E N, *et al.* Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate, Egypt: implications for monitoring and biomarker responses [J]. *Chemosphere*, 2006, 63(9): 1491-1498.
- [48] 吴晓薇, 黄国城. 生物标志物的研究进展 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2008, 33(2): 14-18.
WU Xiaowei, HUANG Guocheng. Progress in research of biomarkers [J]. *Guangdong J Animal Veterinary Sci*, 2008, 33(2): 14-18. (in Chinese)
- [49] LI S N, TAN Y J. Hormetic response of cholinesterase from *Daphnia magna* in exposure by triazophos and chlorpyrifos [J]. *J Environ Sci*, 2011, 23(5): 852-859.
- [50] 姚钦, 宋洁, 潘凤娟, 等. 磷脂脂肪酸技术在不同土地管理方式下土壤微生物多样性研究的应用 [J]. 大豆科技, 2012(2): 26-30.
YAO Qin, SONG Jie, PAN Fengjuan, *et al.* Application of phospholipid fatty acid (PLFA) analysis in soil microbial diversity under different soil managements [J]. *Soybean Sci Tech*, 2012(2): 26-30. (in Chinese)
- [51] AVILA T R, DE SOUZA MACHADO A A, BIANCHINI A. Estimation of zooplankton secondary production in estuarine waters: comparison between the enzymatic (chitobiase) method and mathematical models using crustaceans [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2012, 416-417: 144-152.
- [52] WIKIPEDIA. Good laboratory practice [DB/OL]. [2014-05-16]. http://en.wikipedia.org/wiki/Good_laboratory_practice
- [53] 陈铁春. 经济合作与发展组织良好实验室规范培训手册 [M]. 北京: 人民法院出版社, 2009: 1-5.
CHEN Tiechun. Good Laboratory Practice (GLP) Training Manual [M]. Beijing: Court Press, 2009: 1-5. (in Chinese)
- [54] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals [DB/OL]. [2014-04-02]. http://www.oecd-ilibrary.org/content/package/chem_guide_pkg-en
- [55] FAO. Second Expert Consultation on Environmental Criteria for Registration of Pesticides [M]. Rome: Publications Division, FAO, 1981.
- [56] FAO. Revised Guidelines on Environmental Criteria for Registration of Pesticides [M]. Rome: Publications Division, FAO, 1989.
- [57] EPA. Harmonized test guidelines [DB/OL]. [2014-04-06]. <http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/home/guidelin.htm>
- [58] 朱忠林, 蔡道基, 蒋新明. 农药分配系数测定方法比较研究 [J]. 环境科学学报, 1991, 11(3): 376-380.
ZHU Zhonglin, CAI Daoji, JIANG Xinming. Determination for partition coefficient for pesticides [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1991, 11(3): 376-380. (in Chinese)
- [59] 孙超白, 周风帆, 龚瑞忠. 农药对水蚤的毒性及安全评价初探 [J]. 农村生态环境, 1988(4): 27-29.
SUN Chaobai, ZHOU Fengfan, GONG Ruizhong. A preliminary study on toxicity of pesticides to *Daphnia carinata* and safety evaluation [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1988(4): 27-29. (in Chinese)
- [60] 张爱云, 杨佩芝, 蔡道基. 化学农药环境安全评价研究. XIV. 咪喃丹等三种农药在水中的水解测定 [J]. 农村生态环境, 1987(4): 15-18.
ZHANG Aiyun, YANG Peizhi, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. XIV. Hydrolysis of carbofuran and other two pesticides [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(4): 15-18. (in Chinese)
- [61] 蔡道基, 江希流, 蔡玉琪. 化学农药对生态环境安全评价研究. I. 化学农药对土壤微生物的影响与评价 [J]. 农村生态环境, 1986(2): 9-13.

- CAI Daoji, JIANG Xiliu, CAI Yuqi. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. I. Testing and assessing impact of chemical pesticides on soil microorganisms [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1986(2): 9-13. (in Chinese)
- [62] 张壬午, 李治祥, 白清云, 等. 化学农药对生态环境安全评价研究. II. 化学农药对蚯蚓的毒性与评价[J]. 农村生态环境, 1986(2): 14-18.
- ZHANG Renwu, LI Zhixiang, BAI Qingyun, *et al.* Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. II. Testing and assessing toxicity of chemical pesticides to earthworms [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1986(2): 14-18. (in Chinese)
- [63] 杨佩芝, 蒋新明, 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. III. 化学农药对禽鸟的毒性与评价[J]. 农村生态环境, 1986(3): 8-11.
- YANG Peizhi, JIANG Xinming, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. III. Testing and assessing toxicity of chemical pesticides to birds [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1986(3): 8-11. (in Chinese)
- [64] 陈锐, 张爱云, 蔡道基, 等. 化学农药对生态环境安全评价研究. VI. 农药对家蚕毒性试验方法[J]. 农村生态环境, 1986(3): 12-15.
- CHEN Rui, ZHANG Aiyun, CAI Daoji, *et al.* Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. IV. Testing and assessing toxicity of chemical pesticides to silkworms [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1986(3): 12-15. (in Chinese)
- [65] 张爱云, 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. V. 农药对藻类的毒性与安全评价初报[J]. 农村生态环境, 1986(4): 7-11.
- ZHANG Aiyun, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. V. Testing and assessing toxicity of chemical pesticides to algae [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1986(4): 7-11. (in Chinese)
- [66] 龚瑞忠, 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. VI. 用紫露草微核技术测定农药的毒性[J]. 农村生态环境, 1986(4): 12-14.
- GONG Ruizhong, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. VI. Evaluating of chemical pesticides by *Tradescantia* micronucleus biomonitoring [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1986(4): 12-14. (in Chinese)
- [67] 陈锐, 张爱云, 龚瑞忠, 等. 化学农药对生态环境安全评价研究. VII. 化学农药对蜜蜂的毒性与评价[J]. 农村生态环境, 1987(1): 12-15.
- CHEN Rui, ZHANG Aiyun, GONG Ruihong, *et al.* Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. VII. Testing and assessing toxicity of chemical pesticides to honeybees [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(1): 12-15. (in Chinese)
- [68] 江希流, 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. VIII. 农药在水体中和土壤表面的光降解[J]. 农村生态环境, 1987(1): 16-19.
- JIANG Xiliu, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. VIII. Photolysis of chemical pesticides in water and on soil surface [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(1): 16-19. (in Chinese)
- [69] 蔡道基, 汪竟立, 杨佩芝, 等. 化学农药对生态环境安全评价研究. IX. 农药对鱼类的毒性与评价的初步研究[J]. 农村生态环境, 1987(2): 7-11.
- CAI Daoji, WANG Jingli, YANG Peizhi, *et al.* Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. IX. Testing and assessing toxicity of chemical pesticides to fish [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(2): 7-11. (in Chinese)
- [70] 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. X. 化学农药对非靶生物安全评价准则[J]. 农村生态环境, 1987(2): 12-15.
- CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. X. Guidelines for assessing of chemical pesticides towards non-target organisms [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(2): 12-15. (in Chinese)
- [71] 周丽楚, 陈锐, 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. XI. 农药对天敌赤眼蜂的毒性与评价[J]. 农村生态环境, 1987(3): 12-14.
- ZHOU Lichu, CHEN Rui, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. XI. Testing and assessing toxicity of chemical pesticides to *Trichogramma* [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(3): 12-14. (in Chinese)
- [72] 杨佩芝, 张爱云, 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. XII. 农药在土壤中的降解[J]. 农村生态环境, 1987(3): 15-18.
- YANG Peizhi, ZHANG Aiyun, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. XII. Degradation of pesticides in soil [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(3): 15-18. (in Chinese)
- [73] 蒋新明, 蔡道基. 化学农药对生态环境安全评价研究. XIII. 农药在土壤中的吸附与解吸[J]. 农村生态环境, 1987(4): 11-14.
- JIANG Xinming, CAI Daoji. Testing and assessing environmental safety of chemical pesticides. XIII. Sorption and desorption of pesticides in soil [J]. *J Ecol Rural Environ*, 1987(4): 11-14. (in Chinese)
- [74] RUSSELL W M S, BURCH R L. The Principles of Humane Experimental Technique [M]. London: Methuen & Co. Ltd., 1959: 238.
- [75] OECD No. 401, OECD guidelines for the testing of chemicals, acute oral toxicity [S]. 1987-02-24.
- [76] OECD No. 420, OECD guidelines for the testing of chemicals, acute oral toxicity - fixed dose procedure [S]. 2002-02-08.
- [77] OECD No. 423, OECD guidelines for the testing of chemicals, acute oral toxicity - acute toxic class method [S]. 2002-02-08.
- [78] OECD No. 425, OECD guidelines for the testing of chemicals, acute oral toxicity - up-and-down procedure [S]. 2008-10-16.
- [79] OECD No. 203, OECD guidelines for the testing of chemicals, fish, acute toxicity test [S]. 1981-05-12.
- [80] OECD No. 203, OECD guidelines for the testing of chemicals, fish, acute toxicity test [S]. 1984-04-04.