



中华人民共和国国家标准

GB/T 27854—2011

化学品 土壤微生物 氮转化试验

Chemicals—Soil microorganisms—Nitrogen transformation test

2011-12-30 发布

2012-08-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 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 216《土壤微生物 氮转化测试》(英文版)技术性内容相同。

本标准做了下列结构和编辑性修改：

- 将原文的前言部分调整作为引言；
- 将术语和定义从原文的附录调整为正文内容；
- 将计量单位改为我国法定计量单位。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准起草单位：广东省微生物分析检测中心、湖北出入境检验检疫局、环境保护部化学品登记中心、中国检验检疫科学研究院、广东德美精细化工股份有限公司、东莞圣源环保科技有限公司。

本标准主要起草人：梅承芳、曾国驱、许玫英、郭坚、周红、陈会明、肖亿金、郭玉良。

引 言

本试验方法用于评估化学品单次暴露后对土壤微生物氮转化活性的长期影响。本试验主要依据欧洲及地中海地区植物保护组织推荐的试验方法^[1],同时参考了来自德国联邦生物科研机构^[2]、美国环保局^[3]、环境毒物学与化学学会^[4]及国际标准化组织^[5]的试验方法。1995年,OECD的土壤/沉积物工作组在意大利 Belgirate 就本试验中使用土壤的类型和数量达成了一致意见^[6]。有关土壤样品的采集、处理和储存等主要参考了ISO的指南文件^[7]以及 Belgirate 工作组的建议。

在对受试物的毒性进行评估时,例如,在需要提供农作物保护产品对于土壤微生物菌群的潜在负面影响时,或者当土壤微生物有可能暴露于除农作物保护产品以外的其他化学品时,需要测定受试物对土壤微生物活性的影响。氮转化试验就是用于测试这些化学品对于土壤微生物菌群的影响。如果受试物为农用化学品(如农作物保护产品、化肥、林产化学品),则需进行氮转化试验和碳转化试验。如果受试物是非农用化学品,则只需进行氮转化试验。然而,如果测得化学品氮转化试验的 EC_{50} 值落在商用硝化作用抑制剂(如2-氯-6-三氯甲基吡啶)的 EC_{50} 值范围内,则需通过进行碳转化试验以获得进一步的信息。

土壤由复杂的、非均一的生物和非生物混合体构成。微生物在沃土有机物的降解和转化过程中扮演着重要的角色,且不同种类的微生物对于土壤肥力的各方面均有贡献。而对于这些生化过程的任何长期干预都将干扰营养循环,进而改变土壤肥力。所有肥沃的土壤中都存在碳和氮的转化,尽管不同土壤中参与这些转化过程的微生物群落各不相同,但其转化途径在本质上都是一致的。

本试验用以考察有氧表层土中受试物对于氮转化过程的长期负面影响。该试验方法也可用于评价受试物对于土壤微生物菌群碳转化过程的影响。硝酸盐的形成通常发生在碳-氮键断裂之后。因此,当对照组和处理组的硝酸盐生成率相同时,可以推断其主要的碳降解途径是完整且有效的。试验选用的培养基(如紫花苜蓿粉末)应具有合适的碳氮比,通常在12/1至16/1的范围内。这样试验过程中微生物细胞的“碳饥饿”现象才会减少,且即使微生物群落受到了化学品的破坏,也可能在100 d内恢复。

本试验主要针对那些可以预期其在土壤中实际受纳量的物质,例如,农作物保护产品在田间的施用量是已知的。对农用化学品,根据其预计的施用量在试验时采用两种剂量即可。农用化学品可以以其活性成分(a. i.)或作为产品的形式进行试验。然而,该试验不仅仅适用于农用化学品。通过同时改变试验时土壤中受试物的量和数据评估的方式,本方法同样适用于那些在土壤中的受纳量还无法确定的化学品。因此,对非农用化学品,需要测定一系列不同浓度对氮转化的影响。根据得到的试验数据绘制剂量-效应曲线,并计算 EC_x 值,其中 x 定义为氮转化抑制百分率。

化学品 土壤微生物 氮转化试验

1 范围

本标准规定了化学品土壤微生物氮转化试验的方法概述、仪器设备、试验系统、试验程序、质量保证与质量控制、数据与报告。

本标准适用于评估化学品单次暴露后对土壤微生物氮转化活性的长期负面影响。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

氮转化 nitrogen transformation

微生物通过氨化和硝化作用,将含氮有机物最终降解为无机终产物硝酸盐的过程。

2.2

效应浓度 effective concentration, EC_x

引起氮转化的抑制百分率为 x 时土壤中受试物的浓度。

2.3

半数效应浓度 median effective concentration, EC_{50}

引起氮转化的抑制百分率为 50% 时土壤中受试物的浓度。

3 方法概述

过筛的土壤与植物碎片混合后用受试物处理或不加处理(对照组)。若受试物是农用化学品,则至少选用 2 个测试浓度,浓度设置可以参考受试物预计在田间施用的最高浓度。在培养 0 d、7 d、14 d 和 28 d 后,从处理组和对照组中取出一定量的土壤样品,用合适的溶剂浸提并测定提取液中硝酸盐的含量。比较处理组与对照组的硝酸盐形成率,计算处理组相对于对照组的百分比差异。所有试验至少持续 28 d,如果第 28 天处理组和对照组的差异不小于 25%,则试验可延至最长 100 d。若受试物是非农用化学品,则将一系列不同浓度的受试物加到土壤样品中,并在第 28 天测定处理组和对照组中硝酸盐的产生量。利用回归模型对系列浓度的试验结果进行分析,并计算 EC_x 值(即 EC_{50} 、 EC_{25} 和/或 EC_{10})。

4 仪器设备

4.1 试验容器需用化学惰性材料制成,且应具有与土壤培养方式相匹配的适宜的容积,即土壤样品以大批量整体的形式或者以系列分装独立的形式培养(见 6.1.2)。试验过程中应尽量降低水分的损失并保持气体的交换(例如:试验容器可以覆盖带有小孔的聚乙烯箔)。如受试物具有挥发性,应采用密闭或气密的试验容器。试验容器的大小以装填的土壤样品约占其 1/4 体积为宜。

4.2 需要下列标准的实验室仪器:

- 搅拌装置(机械振动器或类似设备);
- 离心(3 000g)或过滤装置(使用无硝酸盐滤纸);

——具有足够灵敏度和重现性的硝酸盐分析仪器。

5 试验系统

5.1 土壤

5.1.1 土壤的选择

使用单一土壤,推荐使用的土壤特征如下:

——砂含量:50%~75%;

——pH:5.5~7.5;

——有机碳含量:0.5%~1.5%;

——应测定微生物的生物量^[8-9],其碳含量应不小于土壤总有机碳含量的1%。

在多数情况下,具有上述特征的土壤代表着最差的情况,因其对受试物的吸附量最小,而最适合于微生物的生长。因此,通常不需要用其他土壤来进行试验。但是,在某些情况下,例如预计受试物主要用于某些特殊的土壤(如酸性森林土壤),或受试物带有静电,则需使用另外一种土壤。

5.1.2 土壤样品的采集与贮存

5.1.2.1 采集

应收集用于试验的土壤采集点的详细背景信息,包括:确切地点、植被覆盖、施用过农作物保护产品的日期、有机和无机肥料的施用情况、加入的生物材料或偶然混入的污染物。选用的土壤采集点应能长期使用,如永久的草场牧地,种植一年生谷类作物(玉米除外)的耕地,或者密植的绿肥田地。取样地点在取样前至少一年内未施用过农作物保护产品,至少在6个月内未施用过有机肥。除非为满足农作物需要而施用无机肥料,但应在土壤施肥至少3个月后方能采样。应避免使用那些施用过具杀生作用肥料(如氰胺化钙)的土壤。

应避免在长期干旱或水涝期间(超过30 d)采样,或在此期之后立即采样。在耕地取样的深度为0 cm~20 cm,在长期没有耕作(至少一个生长季节)的草场牧地或其他类型的土壤中取样时,最大深度可略超过20 cm(例如25 cm)。

运输土壤样品时应使用容器,并保持适宜的温度以确保土壤的性质不发生显著改变。

5.1.2.2 贮存

试验最好使用从田间新采集的土壤。如无法避免在实验室贮存,可置于4℃±2℃黑暗处,最长可保存3个月。土壤在贮存期间应保持有氧条件。如果采样地区每年至少有3个月冰冻期,也可在-18℃~-22℃条件下贮存6个月。每次试验前应测定土壤微生物的生物量,其生物量的碳含量应至少占土壤总有机碳含量的1%。

5.1.3 试验土壤的处理与制备

5.1.3.1 预培养

如土壤经过贮存,建议增加预培养过程,时间为2 d~28 d。预培养期间土壤的温度与湿度应与试验条件一致。

5.1.3.2 物理化学特性

人工去除土壤中的粗大物块(如石块、植物残体等),然后湿态过筛(避免过度干燥),使颗粒大小不

大于 2 mm。土壤湿度可用蒸馏水或去离子水调节,使其含水量相当于最大持水量的 40%~60%。

5.1.3.3 补充有机底物

土壤需要补充适当的有机底物来进行调节,例如,主要成分为紫花苜蓿(*medicago sativa*)的苜蓿-青草-绿色谷粉,碳氮比(C/N)在 12/1~16/1 范围内。建议每千克干重土壤中加入苜蓿-青草-绿色谷粉底物的比例为 5 g/kg。

5.2 施入土壤的受试物的制备

受试物一般通过载体施入。载体可以是水(用于水溶性物质),或者是惰性固体,如细石英砂(粒径: 0.1 mm~0.5 mm),应避免使用除水以外的其他液体载体,如丙酮、氯仿等有机溶剂,以防止其破坏微生物菌群。如用石英砂作载体,可用溶解或悬浮于某种适当溶剂中的受试物将其包埋。此时,可在受试物与土壤混合前通过挥发除去该溶剂。为使受试物在土壤达到一个最佳的分布状态,建议每千克干重土壤中加入砂的比例为 10 g/kg,对照组的土壤样品用等量的水或砂进行处理。

当测试具有挥发性的化学品时,处理过程中应尽量避免受试物的损失,并采取措施保证其在土壤中分布均匀(例如将受试物从土壤的多个不同位置施入)。

5.3 试验浓度

若测试农用化学品,则至少设置 2 个试验浓度。低浓度至少应反映在实际条件下受试物预计进入土壤的最大值,高浓度则是低浓度的数倍。加入到土壤中的受试物浓度的计算依据是:假定受试物与土壤均匀混合至 5 cm 深,且土壤容重为 1.5。对于可直接施入土壤的农用化学品,或可预测其在土壤中实际受纳量的化合物,推荐的测试浓度为最高的预测环境浓度(predicted environmental concentration, PEC)以及该浓度的 5 倍。预期一个季节中会多次施入土壤的受试物,其试验浓度为 PEC 乘以预计施入土壤的最多次数。但试验浓度的上限不应超过单一最大施用率的 10 倍。

若测试非农用化学品,则至少设置 5 个成几何级数排列的浓度,试验浓度应覆盖可以确定 EC_{50} 的浓度范围。

6 试验程序

6.1 暴露条件

6.1.1 处理与对照

若测试农用化学品,土壤分成等重的 3 份。其中 2 份与含有受试物的载体混合,另一份与不含受试物的载体混合。2 个处理组和一个对照组至少设置 3 个平行。若测试非农用化学品,土壤按重量分成 6 等份,其中 5 份与含有受试物的载体混合,第 6 份与不含受试物的载体混合。处理组和对对照组各设置 3 个平行。应仔细操作以确保处理组中的受试物在土壤样品中均匀分布。混合时,要避免土壤压紧或结块。

6.1.2 土壤样品的培养

可以采用两种方式培养土壤样品:

- a) 每一个处理组及对照组的土壤各作为一个整体样品;
- b) 将每一个处理组及对照组的土壤分装成一系列单独且等份的子样品。

但是,若受试物具有挥发性,土壤样品应分装成系列的单独子样品来进行试验。当土壤以整体形式进行培养时,每个处理组及对照组均需准备大量的土壤样品,试验过程中根据需要取样分析。每个处理

组和对照组最初制备的土壤量取决于取样量、样品分析的重复次数和预计的最高取样次数。整体培养的土壤在再次取样前应充分混合。当土壤以系列分装独立的子样品形式进行培养时,每个处理组和对照组的土壤根据需要来分装和使用。当预计试验中取样次数超过2次时,分装的小份土壤量需足够用于每次取样和所有平行。试验土壤至少设置3个重复在有氧条件下培养。所有测试中使用的容器应具有足够的上部空间,以避免产生厌氧状态。当测试挥发性物质时,土壤只能以系列单独子样品进行培养。

6.1.3 测试条件和时间

试验在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的黑暗条件下进行。在试验过程中,土壤样品的含水量应维持在土壤最大持水量的40%~60%之间,变化范围为 $\pm 5\%$ 。如有需要,可添加蒸馏水和去离子水进行调节。

试验期最少为28 d,若测试农用化学品,需要比较处理组和对照组的硝酸盐形成率。试验第28天时,假如形成率的差异大于25%,则试验持续直至该差异等于或小于25%,但最长不超过100 d,选择试验期较短为宜。对于非农用化学品,试验在28 d后结束。在第28天,测定处理组和对照组中土壤样品的硝酸盐含量,并计算 EC_x 。

6.2 取样和土壤分析

6.2.1 取样

若测试农用化学品,在试验0 d、7 d、14 d和28 d分析土壤样品。如需延长试验,则应在28 d后每隔14 d测定一次。

若测试非农用化学品,至少需要设置5个测试浓度,并在试验开始(0 d)和结束(28 d)时分析土壤样品的硝酸盐含量。如有必要,可增加一个期间测定,例如在第7天。第28天获得的数据可用于计算化学品的 EC_x 值。如有需要,对照组第0天的数据可用于报告土壤初始的硝酸盐含量。

6.2.2 土壤样品的分析

每次取样时,均需测定每个处理组和对照组样品的硝酸盐含量。用合适的提取剂(如0.1 mol/L的氯化钾溶液)与土壤样品混合振荡,提取硝酸盐,建议每千克干重土壤中加入氯化钾溶液的比例是5 mL/g。为优化提取效果,容器中所装的土壤和提取剂不应超过容器体积的一半。混合物在15.7 rad/s的转速下振荡60 min。将混合物离心或过滤后取液相分析其硝酸盐含量。去除固体颗粒的液相在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下最长可贮存6个月。

7 质量保证与质量控制

评价农用化学品的测试结果,是基于处理组和对照组中硝酸盐浓度之间的较小差异(如平均值 $\pm 25\%$),若对照组重复之间的差异过大将会导致错误结果。因此,对照组重复之间的差异应小于 $\pm 15\%$ 。

8 数据与报告

8.1 数据

若测试农用化学品,应记录每个平行土壤样品形成的硝酸盐量,并以列表给出所有平行的平均值。用适当且广泛被接受的统计学方法(例如: F 检验、5%显著性水平)来评价氮转化率。形成的硝酸盐量以每天每千克干重土壤产生硝酸盐的毫克数表示,单位为 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。比较每个处理组和对照组中

土壤样品的硝酸盐形成速率,并计算出处理组偏离对照组的百分率。

若测试非农用化学品,需要测定每个平行的硝酸盐含量,并绘制浓度-效应曲线,以计算 EC_x 值。将 28 d 后处理组中样品形成的硝酸盐量(即每千克干重土壤产生硝酸盐的毫克数,mg/kg)与对照组进行比较。根据这些数据,计算出每个试验浓度下的抑制百分率,并用这些百分数对试验浓度作图,应用统计学方法计算出 EC_x 值,并依据标准程序来确定 EC_x 值的置信限($p=0.95$)^[10-12]。

含氮量较高的受试物,可能会导致试验中形成的硝酸盐量增多。若这些受试物在较高浓度下进行试验(例如可能重复使用的化学品),则测试中应包括相应的对照组(即土壤中添加受试物,而不加植物粉)。在计算 EC_x 时需要参照这些对照组的数据。

8.2 结果解释

评估农用化学品的试验结果时,在试验 28 d 后的任何时间所取样品,若测定其低浓度处理组(即预计最高实际使用浓度)和对照组的硝酸盐形成速率的差异不大于 25%,则可认为该化学品对土壤中的氮转化没有长期影响。在评估农用化学品以外其他化学品的试验结果时,可采用 EC_{50} 、 EC_{25} 和(或) EC_{10} 值。

8.3 试验报告

试验报告应包括以下内容:

a) 完整的试验土壤鉴别信息

- 取样点的地理位置(纬度,经度);
- 取样点的背景信息(植被覆盖情况、农作物保护产品和肥料的使用、意外污染等);
- 利用方式(农业土壤、森林等);
- 取样深度(cm);
- 土壤(干重)中的砂粒/粉砂/黏土含量(%);
- pH 值(在水中);
- 土壤(干重)中的有机碳含量(%);
- 土壤(干重)中的氮含量(%);
- 初始硝酸盐浓度(每千克干重土壤中的硝酸盐量,mg/kg);
- 阳离子交换量(mmol/kg);
- 微生物的生物量(以占总有机碳的百分比表示);
- 每种参数测定方法的参考文献;
- 有关土壤采集和保存的全部信息;
- 土壤预培养的细节(如有)。

b) 受试物

- 物理性质,以及相关的理化性质;
- 受试物信息,包括:结构式、纯度(对于农作物保护产品,是指其中活性成分的百分比)、含氮量。

c) 底物

- 来源;
- 组成(即苜蓿粉,苜蓿-青草-绿色谷粉);
- 底物(干重)中的碳、氮含量(%);
- 筛分孔径(mm)。

d) 试验条件

- 利用有机底物改善土壤的细节;

- 设置受试物试验浓度的组数,并适当说明所选浓度的合理性;
- 向土壤中施入受试物的详细步骤;
- 培养温度;
- 试验开始时和试验过程中的土壤湿度;
- 土壤的培养方式(整体方式,或是系列单独子样品的方式);
- 试验组的重复数;
- 取样次数;
- 从土壤中浸提硝酸盐的方法。

e) 结果

- 用于分析测定硝酸盐含量的程序和仪器;
- 列表数据,包括硝酸盐测定的单个数据与平均值;
- 处理组和对照组中各重复之间的差异;
- 如果计算中涉及修正,应加以说明;
- 每次取样时硝酸盐形成速率的百分比变化,必要时,以及 EC_{50} 值及其 95% 的置信限,其他 EC_x (如 EC_{25} 或 EC_{10}) 及其置信区间,并绘制浓度-效应曲线图;
- 统计学处理;
- 有助于解释结果的全部信息和观察资料。

参 考 文 献

- [1] EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin, 1994, 24: 1-16
- [2] BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds.) 1990
- [3] EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797. 3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987
- [4] SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels
- [5] ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality-Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality-Biological Methods*
- [6] OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 1995: 18-20
- [7] ISO 10381-6 (1993). Soil quality-Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory
- [8] ISO 14240-1 (1997). Soil quality-Determination of soil microbial biomass-Part 1: Substrate-induced respiration method
- [9] ISO 14240-2 (1997). Soil quality-Determination of soil microbial biomass-Part 2: Fumigation-extraction method
- [10] Litchfield, J. T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther. , 96: 99-113
- [11] Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed. , Cambridge, London and New-York
- [12] Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK
-