

全氟辛烷磺酸盐(PFOS)替代品对中国白羽鹌鹑的毒性

王瀛寰, 王会利, 张艳峰, 刘乐乐, 李建中*

中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要: 为研究全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS)替代品对环境生物的毒害效应, 选用中国白羽鹌鹑作为受试生物, 建立其环境危害评价毒性测试方法, 并对 PFOS 替代化学品进行了急性经口、急性饲喂及繁殖毒性的风险评价。结果表明, 全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂急性经口毒性实验的 LD_{50} 为 $500.44 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 其余 3 种替代化学品在上限浓度 $2\ 000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 白羽鹌鹑均未出现明显死亡, 4 种 PFOS 替代品对中国白羽鹌鹑的急性经口毒性均为低毒。全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂急性饲喂毒性实验的 LC_{50} 为 $970.50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 对白羽鹌鹑的饲喂毒性为中毒, 而其余 3 种替代化学品在上限浓度 $5\ 000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 白羽鹌鹑均未出现明显死亡, 对中国白羽鹌鹑的急性饲喂毒性为低毒。在长期饲喂过程中, 织物三防整理剂和 C6 织物三防整理剂会表现出一定的生殖毒性, 造成中国白羽鹌鹑的孵化率降低, 胚胎死亡率及未受精率升高; 全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂会影响到中国白羽鹌鹑的未受精率, C4 织物三防整理剂未表现出明显的生殖毒性。

关键词: PFOS 替代化学品; 中国白羽鹌鹑; 急性经口毒性; 急性饲喂毒性; 繁殖毒性

文章编号: 1673-5897(2012)5-537-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxicity of Alternatives of Perfluorooctane Sulfonate(PFOS) to Chinese Recessive White Feather Quail

Wang Yinghuan, Wang Huili, Zhang Yanfeng, Liu Lele, Li Jianzhong*

Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 1 July 2012 accepted 6 September 2012

Abstract: Chinese recessive white feather quail were exposed to four alternative chemicals of perfluorooctane sulfonate (PFOS) to test the toxic effects of these chemicals. Toxicity evaluation methods of Chinese recessive white feather quail to chemicals were built. The results suggested that LD_{50} of acute oral toxicity experiment of surfactant was $500.44 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and Chinese recessive white feather quail did not appear obvious death when the acute oral concentrations of other three alternatives were up to $2\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the acute oral toxicity of four chemicals were all low toxicity. LD_{50} of acute dietary toxicity experiment of surfactant was $970.50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, indicating that surfactant was middle toxicity in acute dietary toxicity experiment. No Chinese recessive white feather quail appeared obvious death when the acute oral concentrations of other three alternatives were up to $5\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Also, the acute dietary toxicity assessments showed that these chemicals were low toxicity. However, all these chemicals did harm to the reproduction of Chinese recessive white feather quail in the long time test. The finishing agent and C6 finishing agent decreased the hatching rate, and increased the embryonic mortality and unfertilized rate. Surfactant would increase the unfertilized rate, while C4 finishing agent didn't.

收稿日期: 2012-07-01 录用日期: 2012-09-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2010AA065105 和 2012AA06A302)

作者简介: 王瀛寰(1990-), 男, 硕士, 研究方向: 化学品毒理学研究; E-mail: wang-yinghuan@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: jzli@rcees.ac.cn

't show obvious reproduction toxicity to the Chinese recessive white feather quail.

Keywords: alternative chemicals; Chinese recessive white feather quail; acute oral toxicity; acute dietary toxicity; reproduction toxicity

全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是一种新型的持久性有机污染物,可通过呼吸和摄食被生物体吸收,具有很高的生物蓄积性,也可能具有内分泌干扰毒性、遗传毒性和肝脏毒性等^[1]。2006年12月27日,欧洲议会和部长理事会联合发布《关于限制全氟辛烷磺酸盐销售及使用的指令》(2006/122/EC),并于2008年6月27日正式实施,对产品中PFOS的含量进行了明确规定^[2]。但PFOS的应用已涉及我国国民经济众多领域,对我国生态环境存在着潜在的威胁。从源头上控制PFOS的环境污染,推进PFOS的替代技术和替代品成为目前研究的热门问题。而强化替代品的风险评价,使之在开发中不产生新的环境污染物又是PFOS替代技术的关键。

陆生生物安全评价是整个生物风险评价中不可或缺的一部分,禽鸟又是陆生生态系统中主要的生物种群。化学品进入环境后,不但直接危害禽鸟类,而且可以通过生物链在其体内蓄积,构成对人类健康的潜在危害^[3]。而禽鸟中鹌鹑作为敏感的模式生物,对多种环境污染物均较敏感,因此被广泛应用于各种毒性评价中^[4]。美国国家环保局(USEPA)^[5]及经济合作与发展组织(OECD)^[6]准则中规定的受试鸟类均包括日本鹌鹑(*Coturnix coturnix japonica*)。国家环保总局于1989年制订的《化学农药安全评价实验准则》^[7]中规定,使用日本鹌鹑作为化学农药安全评价的受试鸟类。日本鹌鹑是由中国野生鹌鹑驯化而成^[8],目前在我国市场占有的份额很小。中国白羽鹌鹑是首次由我国自行驯化而成的蛋用鹌鹑,其生长及产蛋性能均超过日本鹌鹑,是目前我国饲养的主要鹌鹑品种^[9]。

因此,本实验筛选中国白羽鹌鹑作为受试生物,参照我国《化学农药安全评价实验准则》、USEPA及OECD关于鸟类安全评价实验的相关准则和文献,建立鸟类对化学品安全评价毒性测定方法,并对4种PFOS替代品进行环境风险评价。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 受试生物

实验鹌鹑:中国白羽鹌鹑(Chinese recessive white feather quail)由实验室自行饲养与繁育。

1.2 供试药剂

4种PFOS替代化学品:50%的全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂、用调聚法合成的织物三防整理剂(含固率23.7%)、用电解氟化法合成的C4及C6织物三防整理剂。

1.3 受试鹌鹑实验室条件下的规模化饲养及驯化

1.3.1 规模化饲养

中国白羽鹌鹑在育雏期属于容易死亡的高发期,需要保持较高的温度,在14日龄前保持温度在 $(35 \pm 3)^\circ\text{C}$,湿度保持在50%~70%,14日龄后,日龄每增加1天,温度可降低 1°C ,最终成年鹌鹑温度保持在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度保持不变。1~10日龄的幼年鹌鹑每天饮喂温开水,水温和室温相同,使用自动出水饮水器,防止鹌鹑发生溺水现象。10日龄之前幼体鹌鹑给予20h的光照,随后随日龄递减,最终光照条件保持为自然光照。将鹌鹑分笼进行饲喂,每笼20~30只,防止鹌鹑因大面积推挤而死亡。

40日龄后中国白羽鹌鹑进入成熟期,将鹌鹑按雌雄比3:1进行配对饲喂,每日收集白羽鹌鹑蛋,鹌鹑蛋存储在 $15 \sim 16^\circ\text{C}$ 、湿度55%~75%条件下,收集到一定数目的鹌鹑蛋转入到孵化箱内进行孵化,孵化温度控制在 37.5°C ,湿度保持在70%~75%,孵化时间约为14d。

1.3.2 实验室驯化

饲养后的中国白羽鹌鹑在实验前需要转入到实验用鹌鹑笼中进行为期一周的驯化,在驯化期间,没有出现明显死亡状况,再选取身体健康、大小一致的鹌鹑进行毒理实验。

1.4 中国白羽鹌鹑化学品安全风险评价毒性方法的建立

1.4.1 实验方法

急性经口毒性实验参照《化学农药安全评价实验准则》^[7]及USEPA^[5]相关准则,使用同一批大小均匀的中国白羽鹌鹑蛋孵化后饲养40d,选择体重 (100 ± 10) g、健康、活泼、雌雄各半的白羽鹌鹑进行实验。实验前1天停止喂食,仅供清水。室温在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照采用自然光照,每日12~16h,相对湿度50%~75%。根据预实验确定的浓度范围按一定间距设置5~7个剂量组,每组10只鹌鹑(雌雄各

半),并设空白对照组。实验用鹌鹑以经口灌注法一次性灌 $1.0 \text{ mL} \cdot (100 \text{ g 体重})^{-1}$,连续 7 d 观察实验用鹌鹑的死亡情况与中毒症状。记录实验用鹌鹑的死亡数,对实验数据进行数理统计,求出 LD_{50} 值及 95% 置信限。

急性饲喂毒性实验参照《化学农药安全评价实验准则》^[7]、EPA^[10]及 OECD^[6]相关准则,使用同一批大小均匀的鹌鹑蛋孵化后饲养 40 d,选择体重 $(100 \pm 10) \text{ g}$ 、健康、活泼、雌雄各半的白羽鹌鹑进行实验。实验前一天停止喂食,仅供清水。室温在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照采用自然光照,每日 12 ~ 16 h,相对湿度 50% ~ 75%。先用含有不同浓度替代品的饲料饲喂实验用鹌鹑 5 d,从第 6 天开始,以不含替代品的饲料饲喂 3 d,每天记录鹌鹑的中毒与死亡情况,并求出 LC_{50} 值及 95% 置信限。

繁殖毒性实验参照 EPA^[11]及 OECD^[12]相关准则,使用同一批大小均匀的鹌鹑蛋孵化后正常饲喂至 14 日龄,按照雌雄比为 2:1 进行分组,每组 21 只,使用混有实验设计浓度的 PFOS 替代品的饲料进行饲喂。从产蛋日期开始计算,收集 10 个周的鹌鹑蛋。然后每组选取 50 个蛋进行孵化,使用无毒饲料进行饲养至 14 日龄,记录蛋壳平均厚度、孵化率、未受精率、胚胎死亡率、雌雄比及存活率。10 日龄之前幼体鹌鹑给予 20 h 光照,随后随日龄递减,最终光照条件保持为自然光照。各个时期的条件控制见表 1。

表 1 繁殖实验条件

	温度/ $^\circ\text{C}$	相对湿度/%
成年鹌鹑饲喂	25 ± 2	50 ~ 75
蛋存储	15 ~ 16	55 ~ 75
孵化	37.5	70 ~ 75
幼体鹌鹑饲喂	35 ± 3	50 ~ 75

浓度设计参照美国 EPA 及 OECD 有关鸟类繁殖实验的规定,繁殖实验要保证饲喂过程中亲代白羽鹌鹑的存活率,因此繁殖实验浓度的设计参照急性饲喂实验确定的 LC_{50} 值,饲喂浓度为急性饲喂实验得出的 LC_{10} 值的一半,同时对应设置一个相应的低浓度梯度。繁殖实验的推荐最大饲喂浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。4 种 PFOS 替代化学品繁殖实验编号及浓度设计如表 2 所示。

1.4.2 数据处理

以药剂浓度的对数值为自变量(x),以相应浓度

下鹌鹑死亡率的几率值为因变量(y),采用 SPSS 数据处理软件,使用 Probit 进行回归分析,建立“剂量—效应”线性方程,并记录开方检验值、 LC_{50} (或 LD_{50}) 值及其 95% 置信限。

表 2 繁殖实验编号及浓度设计

Table 2 Numbers and design concentrations of reproduction test

名称	编号	浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
织物三防整理剂	1	1 000
织物三防整理剂	2	100
织物三防整理剂	3	10
C4 织物三防整理剂	4	1 000
C4 织物三防整理剂	5	100
C4 织物三防整理剂	6	10
C6 织物三防整理剂	7	1 000
C6 织物三防整理剂	8	100
C6 织物三防整理剂	9	10
全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂	10	60
全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂	11	20
全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂	12	10

1.4.3 参照标准

我国《化学农药安全评价实验准则》¹将农药对日本鹌鹑的急性经口毒性划分为 4 个等级: $LD_{50} \leq 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为剧毒; $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} < LD_{50} \leq 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为高毒; $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} < LD_{50} \leq 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为中等毒性; $LD_{50} > 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为低毒。将农药对日本鹌鹑的急性饲喂毒性划分为 4 个等级: $LC_{50} \leq 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为剧毒; $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} < LC_{50} \leq 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为高毒; $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} < LC_{50} \leq 1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为中等毒性; $LC_{50} > 1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为低毒。

我国《化学农药安全评价实验准则》规定对日本鹌鹑的限度实验的急性经口浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,急性饲喂浓度为 $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。而 USEPA^[5]相关准则中规定急性经口毒性的限度实验浓度为 $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,USEPA^[10]及 OECD^[6]相关准则中规定急性饲喂的限度实验浓度为 $5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2 结果 (Results)

2.1 急性经口毒性

USEPA^[5]相关准则中规定急性经口毒性的限度实验浓度为 $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,C4 织物三防整理剂、C6 织物三防整理剂和三纺织物整理剂在上限浓度

2 000 mg·kg⁻¹均未出现明显死亡现象,因此上述3种替代品对中国白羽鹌鹑急性经口毒性为低毒。

全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂对中国白羽鹌鹑的急性经口毒性实验结果如表3所示。从表中可以看出,随着全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂质量浓度的升高,中国白羽鹌鹑的死亡率也逐渐升高,二者呈现线性关系。由 Spss 软件分析得出全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂的 LD₅₀ 为 500.44 mg·kg⁻¹。根据《化学农药安全评价实验准则》中对鹌鹑急性经口毒性的分级标准,全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂对中国白羽鹌鹑急性经口毒性为低毒。

表3 全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂对中国白羽鹌鹑的急性经口半致死量

Table 3 Acute oral LC₅₀ values of fluorine butyl organic ammonium salt cationic surfactant to Chinese recessive white feather quail

项目	浓度组/(mg·kg ⁻¹)				
	200	300	450	675	1 012.5
死亡率/%	10.0	30.0	50.0	60.0	80.0
回归方程	y = - 7.498 + 1.206x 卡方:0.330 显著性值:0.954				
LD50/(mg·kg ⁻¹)	500.44				
95%置信区间/(mg·kg ⁻¹)	350.36 ~ 767.77				

2.2 急性饲喂毒性

USEPA^[10]及 OECD^[6]相关准则中规定急性饲喂的限度实验浓度为 5 000 mg·kg⁻¹, C4 织物三防整理剂、C6 织物三防整理剂和织物三防整理剂在上限浓度 5 000 mg·kg⁻¹的饲喂浓度下均未出现明显死亡现象,因此以上3种替代品对中国白羽鹌鹑经口饲喂毒性为低毒。

全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂对中国白羽鹌鹑的急性饲喂毒性实验结果如表4所示。从表中可以得看出,随着全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂质量浓度的升高,中国白羽鹌鹑的死亡率也逐渐升高,二者呈现线性关系。因此,由 Spss 软件分析得出全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂的 LC₅₀ 为 970.50 mg·kg⁻¹。根据《化学农药安全评价实验准则》中对鹌鹑急性饲喂毒性的分级标准,全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂对中国白羽鹌鹑急性饲喂毒性为中毒。

表4 全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂对中国白羽鹌鹑的急性经口半致死浓度

Table 4 Acute dietary LC₅₀ values of fluorine butyl organic ammonium salt cationic surfactant to Chinese recessive white feather quail

项目	浓度组/(mg·kg ⁻¹)				
	125	250	500	1 000	2 000
死亡率/%	10.0	20.0	30.0	50.0	70.0
回归方程	y = - 4.464 + 0.649x 卡方:0.086 显著性值:0.993				
LD50/(mg·kg ⁻¹)	970.50				
95%置信区间/(mg·kg ⁻¹)	535.95 ~ 3 484.89				

2.3 繁殖毒性

中国白羽鹌鹑母体在4种混有PFOS替代品饲料的饲喂过程中,均未出现明显的厌食及死亡现象。中国白羽鹌鹑的产蛋量、蛋壳厚度、孵化率和胚胎死亡率等如表5所示。

表5 繁殖实验结果

Table 5 Results of reproduction test

编号	十周产蛋量/只母鹌鹑	平均蛋壳厚度/mm	孵化率/%	未受精率/%	胚胎死亡率/%	雌雄比	幼体14 d存活率/%
1	55.78	0.24	60	30	10	15:13	93
2	56.43	0.23	80	5	15	18:16	85
3	56.13	0.23	75	5	20	16:18	91
4	48.75	0.24	75	15	10	16:14	80
5	60.63	0.23	85	5	10	20:17	87
6	55.13	0.24	95	5	0	20:20	84
7	46.46	0.23	60	15	25	11:14	83
8	56.11	0.23	70	25	5	16:14	86
9	52.6	0.26	75	15	10	16:15	84
10	56.09	0.24	75	20	5	17:16	88
11	47.5	0.24	80	20	0	20:20	85
12	59.38	0.22	80	15	5	17:19	90
空白	60.07	0.23	90	5	5	19:20	87

由上表可以看出:几种PFOS替代品对白羽鹌鹑的产蛋量、蛋壳厚度、雌雄比及幼体存活率几乎没有影响。而织物三防整理剂(1、2、3组)造成中国白羽鹌鹑胚胎死亡率升高、且高浓度条件下的织物三防整理剂(1组)会增高成未受精率,降低孵化率;高浓度C4织物三防整理剂(4组)使中国白羽鹌鹑的未受精率增加;C6织物三防整理剂(7、8、9组)会造成未受精率增高,而高浓度的C6织物三防整理剂(7

组)则会增高胚胎死亡率,并严重影响到中国白羽鹌鹑的孵化率;全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂(10、11、12组)则会增加中国白羽鹌鹑的未受精率。

3 讨论(Discussion)

3.1 鸟类模式生物的选择及鸟类化学品安全风险评价方法的建立

中国白羽鹌鹑是首次由我国自行驯化成功的蛋用鹌鹑,是目前我国饲养的主要鹌鹑品种,选取中国白羽鹌鹑对化学品进行安全风险评价,更有利于对我国主要鹌鹑品种进行保护。鹌鹑性情温顺、易于饲喂、繁殖期长、产蛋量大,因此是理想的受试鸟类物种;中国白羽鹌鹑生长速度及产蛋性能均超过日本鹌鹑,因此中国白羽鹌鹑更适合作为化学品风险评价的受试生物。

本研究成功实现了中国白羽鹌鹑的实验室规模化养殖和其初步实验动物化。并参照 USEPA、OECD 相关准则及我国《化学农药安全评价实验准则》建立了鸟类的化学品安全风险评价毒性测定方法,包括鹌鹑的急性经口毒性、急性饲喂及繁殖毒性,并对4种PFOS替代化学品的毒性进行了初步评价。

3.2 4种PFOS替代品对中国白羽鹌鹑的毒性评价

参照我国《化学农药安全评价实验准则》及 USEPA 和 OECD 化学品安全评价实验准则,4种PFOS替代品对中国白羽鹌鹑的急性经口毒性均为低毒。急性饲喂毒性除全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂为中等毒性外,其余3种均为低毒。而在长期饲喂过程中,织物三防整理剂和C6织物三防整理剂会表现出一定的生殖毒性,造成中国白羽鹌鹑的孵化率降低,胚胎死亡率及未受精率升高;全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂会影响到中国白羽鹌鹑的未受精率,C4织物三防整理剂未表现出明显的生殖毒性。

通讯作者简介:李建中(1963—),男,研究员,主要研究方向为环境化学及环境毒理学。

参考文献:

[1] Clarke B O, Smith S R. Review of emerging organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids [J]. *Environment International*, 2011, 37 (1):

226 - 247

- [2] Directive 2006 /122 /EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76 /769 /EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates) [OL]. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006L0122:en:NOT>
- [3] 朱鲁生. 辛硫磷甲氰菊酯及其混剂对鹌鹑的毒性[J]. *农业环境保护*, 1999, 18(6): 258 - 259
- [4] 陈昂, 张战泓, 刘勇, 等. 3种植物源农药对鹌鹑和斑马鱼的急性毒性评价[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(12): 6253 - 6255 (in Chinese)
- Chen Y, Zhang Z H, Liu Y, et al. Acute toxicity evaluation of three botanical pesticides to *Coturnix coturnix japonica* and *Brachydonio rerio* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38 (12): 6253 - 6255 (in Chinese)
- [5] United States Environmental Protection Agency (USEPA). *Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850. 2100 Avian Acute Oral Toxicity Test* [S]. USEPA, 1996
- [6] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). No. 205, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Avian Dietary Toxicity Test* [S]. Paris, France: OECD, 1984
- [7] 蔡道基, 杨佩芝, 龚瑞忠, 等. 化学农药环境安全评价试验准则[S]. 1989, 北京: 国家环境保护总局, 44 - 48
- [8] 李冬. 国内主要的鹌鹑品种、品系及配套系[J]. *河南畜牧兽医*, 2001, 22(10): 41 - 41
- [9] 甄莉, 贾海燕, 陈勇. 北京白羽鹌鹑生长性能的测定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010, (6): 148 - 150
- [10] United States Environmental Protection Agency (USEPA). *Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850. 2200 Avian Dietary Toxicity Test* [S]. USEPA, 1996
- [11] United States Environmental Protection Agency (USEPA). *Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850. 2300 Avian Reproduction Toxicity Test* [S]. USEPA, 1996
- [12] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). No. 206, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Avian Reproduction Toxicity Test* [S]. Paris: OECD, 1984

◆