

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

化学农药 蚯蚓田间试验准则

Chemical pesticide——Guideline for earthworm field test
(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

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

本标准按照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。

本部分负责起草单位：农业农村部农药检定所。

本部分主要起草人：

化学农药 蚯蚓田间试验准则

1 范围

本标准规定了在田间条件下测定化学农药对蚯蚓影响试验的概述、试剂与材料、仪器设备、试验准备、试验步骤、数据评估、计算和结果表达和试验报告等的基本要求。

本标准适用于在田间条件下测定化学农药对蚯蚓的影响。

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。

LY/T 1225 森林土壤颗粒组成(机械组成)的测定

NY/T 1121.2 土壤检测 第2部分：土壤 pH 的测定

NY/T 1121.6 土壤检测 第6部分：土壤有机质的测定

NY/T 3150 农药登记 环境降解动力学评估及计算指南

NY/T 2882.8 农药登记 环境风险评估指南 第8部分：土壤生物

ISO 11274 土壤质量 持水能力的测定 实验室方法 (Soil quality - Determination of water-retention characteristic - Laboratory methods)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

丰度 abundance

一个生物群落或某一环境、地区内某一物种的数量

4 试验概述

4.1 在各试验小区采集蚯蚓，并比较被试物处理小区与空白小区、对照物处理小区中蚯蚓的物种、数量和生物量。根据被试物的性质确定试验周期，宜为1年。应在蚯蚓的活跃时期采样。

4.2 每个处理小区应由四个随机分布的次级小区组成。对每次采集的各种蚯蚓的数量开展统计分析，通过比较对照小区和处理小区的丰度、生物量和多样性确定被试物对蚯蚓的影响。

4.3 可在处理小区采集蚯蚓样品并检测蚯蚓体内的被试物浓度。

5 试剂与材料

5.1 甲醛水溶液：4%（体积比）。

5.2 甲醛水溶液：37%（体积比）。

5.3 乙醇水溶液：70%（体积比）。

5.4 多菌灵：如 25% 多菌灵可湿性粉剂。

6 仪器设备

6.1 天平：感量 0.01 g。

6.2 解剖显微镜：10 倍~40 倍。

6.3 温度计。

6.4 烘箱。

6.5 塑料容器：250 mL、500 mL。

6.6 镊子。

6.7 厚塑料薄膜。1 m²~2 m²。

6.8 锹或铲。

6.9 水罐：宜为 20 L。

7 试验准备

7.1 试验点的选择

7.1.1 试验点应在水平地面，作物和土壤性质应与周边区域相同，不应选择以下区域作为试验点：

- 坡地；
- 临近沟渠或树林的区域；
- 压实的耕作路；
- 土壤类型特殊的地点，例如砂粒或粘粒含量过高的土壤。

7.1.2 试验点宜选择草地。当在草地进行的试验中观察到被试物对蚯蚓有影响时，高级阶段试验应包含能覆盖被试物的使用方法的特定场景（作物和区域）。不宜选择果园作为试验点，若以果园为试验点，应增加采样量或限制在特定区域采样。草地试验点蚯蚓的密度应不低于 100 条/m²，密度不足时应增加采样量。

7.1.3 若需要被试物在裸土中对蚯蚓影响的信息，可选择耕地作为试验点，耕地试验点试验开始前蚯蚓的密度应不低于 60 条/m²。

7.1.4 试验点应有所选择环境类型中常见的蚯蚓种群。例如，在农业区，重要的深栖类和内栖类蚯蚓物种应不少于各类蚯蚓数量的 10%。

7.1.5 为满足上述要求，试验前应在选中的试验点采样并初步研究蚯蚓的物种分布。

7.2 试验点的描述

7.2.1 对试验点的描述应包含以下理化和生物信息：

- 土壤粒径分布（按照 LY/T 1225 测定）；

- 土壤有机质含量（按照 NY/T 1121.6 测定）；
- 土壤 pH 值（按照 NY/T 1121.2 测定）；
- 土壤持水能力，*WHC_{max}*（按照 ISO 11274 测定）；
- 植被分布。

7.2.2 应在施药后每天记录土壤温度和含水率、气温、降水量、日照时间，气温和降水量应全年记录。

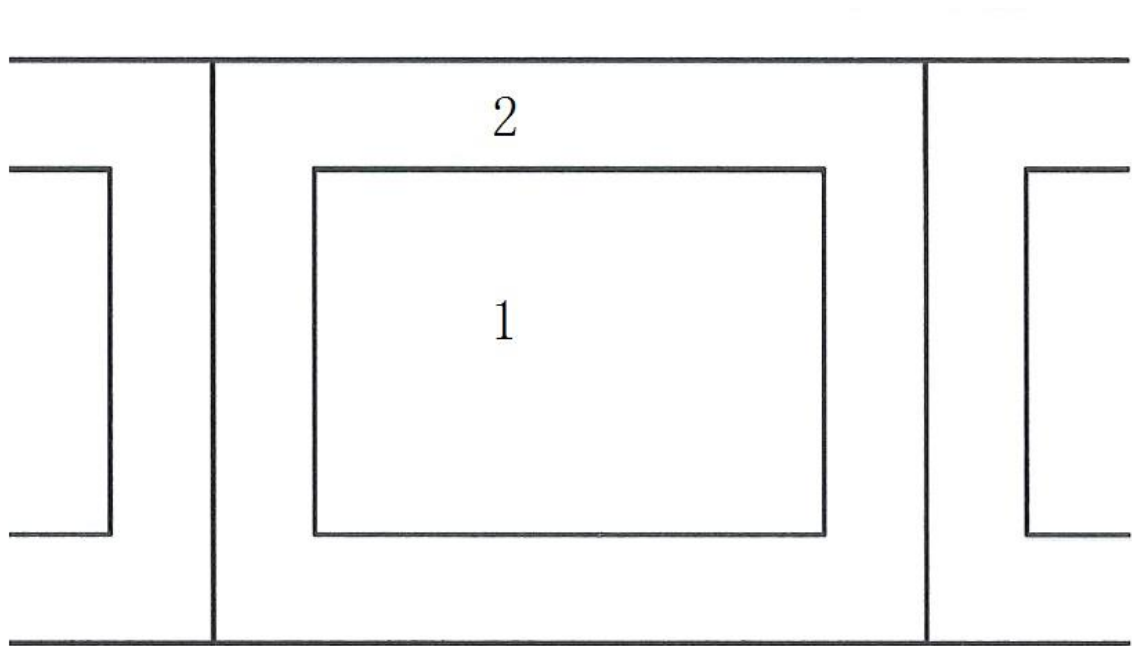
7.2.3 应了解试验点的耕作历史和农药、化肥、污泥历史使用情况。

7.3 试验设计

7.3.1 根据试验目的和试验点的情况设计试验。至少设置 1 个空白小区（仅用水喷雾）、1 个对照物处理小区（用对照物喷雾）和一个被试物处理小区。设置多个不同剂量的被试物处理小区更有助于环境风险评估。

7.3.2 试验应采用随机完全区组设计。应根据被试物处理小区数量和采样时间确定试验小区数量及试验地的面积。

7.3.3 每个小区的面积至少 100 m²（10 m×10 m）。应在小区的中部采样，以保证采样区域周边有 1 m~2 m 宽的被试物或对照物处理过的边缘地带（见图 1）。



- 说明：
- 1——采样区域；
 - 2——边缘地带。

图 1 试验小区示意图

7.3.4 同一天采样的两个采样区域应相距至少 2 m，后续采样时不应在已采样过的区域采样。

7.3.5 根据蚯蚓种群的密度和分布确定采样区域的数量。每个小区（空白对照、对照物处理、被试物处理）至少设置 4 个次级小区（重复），每个次级小区取 4 个随机样品（即每个小区 16 个独立样品）。

7.3.6 对于在田间 $DisT_{90} < 365$ d 的农药（ $DisT_{90}$ 按照 NY/T 3150 计算），宜按单次用量设计处理组，必要时根据农药的使用方法单独设计额外的处理组，单独设计额外的处理组时应考虑作物的叶面拦截系数。对于田间 $DisT_{90} > 365$ d 的农药，也宜按单次用量设计处理组，必要时根据农药的使用方法单独设计额外的处理组，但第一次施药时也应包含按土壤深度为 10 cm 计算的稳态坪浓度（稳态坪浓度按照 NY/T 2882.8 计算），除第一次施药外，施药时应考虑作物的叶面拦截系数。

7.4 试验地的日常维护

7.4.1 草地试验点应定期（每年 2 次~6 次）用覆盖式割草机割草，割下的草应保留在原地。割草应在施用被试物前 1 周~2 周进行。可仅保留施药前最后一次割下的草。

7.4.2 当试验在耕地上进行时，应按常规农事操作进行，但试验期间应避免翻耕或其他土壤处理措施。

7.4.3 试验小区不应使用被试物之外的农药，如必须使用农药，应选择对蚯蚓低毒且风险可接受的农药。若被试物为除草剂，耕地或草地（含对照小区）在试验开始前应先用另一种除草剂（非被试物）处理、耕地、再播种。施用除草剂（非被试物）和除草剂（被试物）应间隔至少 1 周。在解释试验结果时，应注意即使是使用对蚯蚓无影响的农药，其与被试物之间也可能发生相互作用。

7.4.4 若施药后 3 d 内降水量很少或没有降水，应喷灌。灌溉应安排在在采样前 1 周~2 周。灌溉量应根据试验地的气候条件确定，并在试验区域内均匀分布。施药后 3 天内，降水和灌溉合计宜达到 10 mm。

8 试验步骤

8.1 施药

8.1.1 根据委托方提供的被试物的施药剂量、剂型、施用方法等信息施药。施药设备宜与农业生产中所用设备相近（例如：使用相同的喷雾器、相同的药液量），使用前应校准喷雾器。按被试物可能使用的最大用量施药。多次施药时，根据标签推荐施药次数和间隔，按上述方法施药。

8.1.2 试验宜在春季开始。

8.2 采样

8.2.1 采样时间

8.2.1.1 施药前应全面采样以获取物种组成、密度、均匀性等方面的信息。

8.2.1.2 每次施药后 1 d~2 d 和/或灌溉后，应收集土壤表面的蚯蚓。

8.2.1.3 施用被试物后，应在蚯蚓活跃期至少采样 3 次，其采样时间如下：

——第一次采样：施药后 1 月~3 月；

——第二次采样：施药后 4 月~6 月；

——第三次采样：施药后 12 月。

8.2.1.4 试验时间根据被试物的性质确定。需要观察更长时间时，应间隔半年，并在蚯蚓的活跃期采样。

8.2.1.5 不应在蚯蚓因环境条件不适宜（即低土壤湿度和/或高温），处于滞育状态时采样。

注 1：在温带，不适宜的环境条件出现在冬季和盛夏。

8.2.2 采样方法

8.2.2.1 徒手分离法

8.2.2.1.1 根据蚯蚓的大小确定采样区域的面积。草地试验点每个采样区域的面积可设置为 0.25 m²；耕地试验点每个采样区域的面积可增加至 1 m²。对于蚯蚓密度低的地区（例如土壤 pH 值低于 4.5），应设置更大的采样区域，例如 1 m²。蚯蚓密度高的地区（例如，温带草地），采样区域可设为 0.125 m²。更小的采样区域（例如 0.0625 m²），需要增加采样区域的数量（例如 16 个采样区域）。

8.2.2.1.2 在草地试验点，采样前应移除采样区域的植被；试验人员应避免在采样区域内走动。

8.2.2.1.3 根据选择的采样区域面积，用金属或塑料围成高 10 cm~15 cm 方形或圆形。用锹或铲将表层土壤挖出，深度根据土壤性质确定，温带试验点宜取表层 20 cm 土壤。挖出的土壤铺在塑料薄膜上，将蚯蚓挑出。带塑料手套徒手挑出大蚯蚓、用镊子挑出小蚯蚓，应仅接触蚯蚓的前部。若挖土时蚯蚓被铲断，应将两段全部采集以测定准确的生物量，但统计物种数量时，仅前段计数。

注 2：根据环带的位置可判断成年蚯蚓的前段：环带总是更接近头部。

8.2.2.2 甲醛刺激分离法

8.2.2.2.1 应提前在采样点用水罐储备足够的水（每采样点 20 L）。将 25 mL37%甲醛水溶液（5.2）用水稀释至约 5 L，得到约 0.2%的甲醛水溶液。将稀释得到的 0.2%甲醛水溶液小心、均匀的施用于已移除表层土壤的采样区域。重复该步骤，直到加入的甲醛水溶液达到 20 L；可根据土壤性质改变甲醛水溶液的量。在施用甲醛水溶液的过程中，应注意观察，以确定采集到采样区域内所有出现在土壤表面的蚯蚓。最后一次施用甲醛水溶液后 30 min，停止采样。

8.2.2.2.2 带塑料手套徒手挑出大蚯蚓、用镊子挑出小蚯蚓。应仅采集身体大部分（宜全部）出现的蚯蚓，应仅接触蚯蚓的前部，宜仅接触环带之前。

注 3：本标准采用的低浓度甲醛水溶液，不会影响节肢动物等其他土壤生物，也对土壤微生物没有长期负面影响。该化合物在几天至几周时间内会被微生物降解，期间可能导致特定种类的植物发育迟缓。

注 4：在粘粒含量高的土壤中，在挖掘表层土壤时，可能会使蚯蚓洞堵塞，从而阻碍甲醛的下

渗和/或深栖类蚯蚓出现在土壤表面。出现此情况时，在施用甲醛水溶液前，可先用小刀清理蚯蚓洞口。

注 5：使用时，应采用必要的防护措施，以避免吸入或皮肤暴露导致的危害。根据 37%甲醛水溶液的产品安全数据单，该化合物具有皮肤致敏性并属于致癌物。

8.2.2.3 采样方法的选择

8.2.2.3.1 宜用先用徒手分离法采集表层土壤中的蚯蚓，然后在已移除表层土壤的采样区域继续采用甲醛刺激分离法采样，采样结束后，应将挖掘出的土壤回填。

8.2.2.3.2 当试验点中有巨蚓科蚯蚓时，可仅采用甲醛刺激分离法。在 4 m² 的范围内施用甲醛水溶液，在施用前应先移除土壤表面的杂草和杂物。

8.2.2.3.3 当试验点中没有深栖类蚯蚓（如正正蚓（*Lumbricus terrestris*）、长流蚓（*Aporrectodea longa*））时（例如：强酸性土壤），可不采用甲醛刺激分离法。可通过观察洞口（直径约 0.5 cm）的排泄物，确定是否有深栖类蚯蚓。

8.2.3 标本的保存

8.2.3.1 从同一采样点用不同方法采集到的蚯蚓标本应储存在不同的塑料容器中。

8.2.3.2 采集到的蚯蚓应立即在 250 mL 或 500 mL 塑料容器内用 70%乙醇（5.3）固定，时间至少 0.5 h，但不应超过 24 h。容器应有标识，并应记录观察到的现象。

注 6：为避免在乙醇中快速固定导致的形态变化（如口前叶的倒置），可将蚯蚓置于温去离子水中约 1 min，使蚯蚓松弛后再转入乙醇。

8.2.3.3 可采用以下方法保存蚯蚓标本：

——固定后，浸泡在 4%甲醛水溶液（4.1）中至少 4 天，推荐 1 周至 2 周，然后在 70%乙醇（4.3）溶液中长期保存；

——采集后用 70%乙醇溶液（4.3）和 4%甲醛水溶液（4.1）的混合物（98:2，体积比）固定，并在采样完成后用新配置的溶液置换。

8.3 对照物

对照物宜使用多菌灵，当施药剂量为 6 kg a.i./hm²~10 kg a.i./hm² 时，在至少 1 次采样中，对照物处理组的蚯蚓丰度和/或生物量与空白对照组相比差异应大于 50%。若对照物处理组未对蚯蚓产生显著影响，试验结果难以用于风险评估。

注 7：若前两次采样中，已观察到对照物对蚯蚓产生显著影响，对照物处理小区可不安排第 3 次采样。

注 8：在蚯蚓不活跃或滞育时，多菌灵的影响会显著降低，在试验设计时应考虑此因素。

9 数据评估

9.1 试验终点

每次采样时对蚯蚓群落的评估应包括：

——每平方米蚯蚓的丰度和生物量；

——优势种（>10%的物种和/或至少 10 条-15 条蚯蚓每平方米）的丰度和生物量。若某次采样中内栖类或深栖类没有优势种，可将相同生态类群（例如：内栖类）或相同形态类群（例如：口前叶为穿入叶式和口前叶为上叶式）的蚯蚓合并统计。应在物种水平或每个生态类群或形态类群开展评估。

——非优势种幼蚓和成蚓的丰度和生物量。同一属的幼蚓通常难以区分到种，因此可只评估到形态类群。

注 1：试验期间优势种可能发生变化。

9.2 蚯蚓物种的鉴别

对蚯蚓物种的鉴别应根据相关文献，并采用系统命名法。同一物种的成蚓和幼蚓应分别计数。难以区分到种的幼蚓至少应区分到形态类群。

注 2：口前叶的形态变化是重要的分类学依据。口前叶是蚯蚓身体前端肉质的叶状突起，有摄食、掘土和触觉功能。突出于口，未包含在体节数内；口前叶既不是蚯蚓的起端，也不是它的体节构成。如果没有 1 条沟与第 1 节区分，为合叶式；如果能够区别，但没有侵占第 1 节，分割沟是 1 直横，为前叶式；如果侵占了，但只占第 1 节很少，为前上叶式；如果侵占更加明显，为上叶式。后部伸入第 1 节的区域叫做舌，如果舌回到第 1 节和第 2 节之间的节间沟上，为穿入叶式。

9.3 含胃含物的生物量的测定

用保存的标本测定生物量。将蚯蚓用水清洗 5 min，用滤纸吸干，并用天平测定。测定后，蚯蚓仍用 70%乙醇溶液或乙醇-福尔马林混合液保存。测定的鲜重乘以 0.15 的系数可以转化为干重。不同物种的成蚓和幼蚓体重应分别记录。

10 计算和结果的表达

10.1 统计每次采样时每种蚯蚓成蚓和幼蚓的数量及生物量。采用合适的统计方法比较处理组与空白对照组之间的差异。根据试验数据是否服从正态分布、方差是否齐性选择统计检验与推断方法。比较处理组与空白对照组的数据时，不应使用对照物处理组的数据。

10.2 正态性检验和方差齐性检验分别采用 Shapiro-wilk 方法、Levene's 方法。对于符合正态分布、方差齐性的数据，应进行随机完全区组设计多重比较，例如 Dunnett's 检验、William's 检验 ($\alpha = 0.05$, 单尾)。如果数据不服从正态分布，可对数据进行转换（例如对数转换、平方根转换），或使用广义

线性模型、非参数检验方法来进行评估，例如 Bonferroni U 检验、Step-down Jonckheere-Terpstra 检验。当试验中仅设置了一个被试物处理组时，若试验数据满足参数检验的前置条件（正态分布、方差齐性），采用 T 检验法进行比较，否则，采用 Mann-Whitney U 检验法。此外，除上述单变量统计方法外，还可采用多变量统计工具，如 PRC（主响应曲线）方法等。

11 试验报告

试验报告至少应包括下列内容：

- 试验结果（见 10）；
- 被试物的详细信息及有助于解释试验结果的物理化学性质；
- 对试验点的描述（见 7.2）；
- 试验期间的气象条件；
- 试验设计及试验点的管理（试验小区大小、重复数、样品数）；
- 采样方法；
- 所有采集时间的蚯蚓总丰度和生物量；
- 显示与空白对照相比，每个试验小区、处理及采样时间蚯蚓总丰度和总生物量的百分比的

表格；

- 所有采集时间，每种蚯蚓的蚯蚓总丰度和总生物量；
- 显示与空白对照相比，每次采样、每种蚯蚓的丰度和生物量的百分比的表格；
- 表现试验期间每种蚯蚓的丰度和生物量变化的图；
- 对照物的试验结果。

参考文献

- [1] 徐芹, 肖能文.中国陆栖蚯蚓. 北京: 中国农业出版社. 2011.
 - [2] ISO 11268-3:2014, Soil quality - Effects of pollutants on earthworms-Part3: Guidance on the determination of effects in field situations.
 - [3] ISO 23611-1:2006, Soil quality - Sampling of soil invertebrates - Part 1: Hand-sorting and formalin extraction of earthworms
-