

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

易挥发化学农药对蚯蚓急性毒性试验准则

Volatile chemical pesticide—Guideline for earthworm acute toxicity 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。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位: 农业农村部农药检定所、中国农业科学院植物保护研究所。

本标准主要起草人:

易挥发化学农药对蚯蚓急性毒性试验准则

1 范围

本标准规定了易挥发化学农药对蚯蚓急性毒性试验的概述、方法、质量控制、试验报告等基本要求。

本标准适用于为易挥发液体类和固体类化学农药登记而进行的蚯蚓急性毒性试验。

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。

GB 2890 呼吸防护 自吸过滤式防毒面具

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生殖带 **clitellum**

蚯蚓身体前端表皮上的一种腺体，为鞍状或环带状，通常可通过颜色与蚯蚓身体其他部分区分开。

3.2

成蚓 **adult worm**

身体前端呈现出生殖带的蚯蚓。

3.3

易挥发化学农药 **volatile chemical pesticides**

易挥发为气体或在施用过程中容易产生挥发性气体的一类化学农药，即 H （亨利常数）或空气/水分配系数大于 1、或蒸气压在 25 °C 时超过 0.013 3 Pa。

4 试验概述

将适量人工土放入试验密闭容器，每个重复放入 10 条蚯蚓，待蚯蚓钻入土壤后，施用被试物，在适宜条件下密闭培养两周，并观察记录蚯蚓的中毒症状和死亡数，求出农药对蚯蚓的半致死浓度 LC_{50} 值及 95% 置信限。

5 试验方法

5.1 材料和仪器

5.1.1 被试生物

推荐选择赤子爱胜蚯蚓 (*Eisenia foetida*) 成蚓进行试验, 体重在 0.30 g~0.60 g 之间。

5.1.2 被试土壤

人工土壤, 按照附录 A 进行配制。

5.1.3 被试物

被试物为农药制剂或原药。难溶于水的液体类药剂可用少量对蚯蚓毒性小的有机溶剂助溶后再溶于水进行稀释, 有机溶剂用量一般不得超过 0.1 mL/L; 固体类药剂可以通过适量的工业沙 (50 μm ~200 μm 颗粒含量大于 50%) 来稀释并混匀。

5.1.4 主要仪器设备

人工气候室;

电子天平 (感量 0.0001 g);

移液器 (0.1~2.5 μL , 2~10 μL , 10~100 μL , 100~1000 μL);

玻璃干燥器 (推荐规格为器口内径 160 mm, 对应容积 2.5 L);

防毒面具;

容量瓶等。

5.2 试验步骤

5.2.1 安全防护措施

试验操作人员在称量和施用被试物过程中, 应佩戴对被试物具有阻隔效果的防毒面具并穿戴防护服。防毒面具性能应符合“GB2890-2009 呼吸防护自吸过滤式防毒面具”的要求。施药过程中如有刺激流泪现象或闻到刺激性气味, 应立即离开施药区域, 并检查或更换防毒面具。

5.2.2 预试验

按正式试验的条件, 以较大的间距设若干组浓度, 求出被试物对蚯蚓全致死的最低浓度和全存活的最高浓度, 在此范围内设置正式试验的浓度。

5.2.3 正式试验

5.2.3.1 在预试验确定的浓度范围内按一定级差设置 5 个~7 个浓度组, 并设置一个空白对照组 (使用助溶剂的应增设溶剂对照组), 每个浓度组均设 3 个重复。

5.2.3.2 人工土加适量蒸馏水调节土壤含水量至最大持水量 (测定方法见附录 B) 的 65%~85%, 称取 500 g (干土重) 放入干燥器中 (干燥器中土壤厚度不低于 8 cm), 每个重复放入

10 条蚯蚓。

5.2.3.3 液体类药剂直接通过移液器移取后注射入土壤中；固体类药剂直接通过电子天平称取所需用量后混入土壤中；用量非常低而无法直接量取或称取时，易溶于水的液体类药剂可以通过溶于水进行稀释；难溶于水的液体类药剂可用少量对蚯蚓毒性小的有机溶剂助溶后再溶于水进行稀释，有机溶剂用量一般不得超过 0.1 mL/L ；固体类药剂可以通过适量的工业沙来稀释。

5.2.3.4 施入药剂后,迅速密闭容器,将干燥器放置于20 °C±2 °C、光线强度400lx~800lx的人工气候室中。14 d后倒出瓶内土壤,观察记录蚯蚓的中毒症状和死亡数(用针轻触蚯蚓尾部,蚯蚓无反应则为死亡)。根据蚯蚓14 d的死亡率,求出农药对蚯蚓的毒性 LC_{50} 值及95%置信限。

5.2.4 限度试验

设置上限浓度 1000 mg a. i./kg 干土, 若未见蚯蚓死亡, 则无需继续进行试验。

5.3 数据处理

5.3.1 统计分析方法的选择

可采用寇氏法、直线内插法或概率单位图解法计算得到每一观察时间（14 d）的 LC_{50} 和 95% 置信限，也可应用有关毒性数据计算软件进行分析和计算。

5.3.2 寇氏法

用寇氏法可求出蚯蚓在 14 d 的 LC_{50} 值及 95% 置信限。

LC_{50} 的计算见式(1)：

$$\log LC_{50} = X_m - i(\Sigma P - 0.5) \quad \dots \dots \dots \quad (1)$$

式中：

X_m ——最高浓度的对数;

i ——相邻浓度比值的对数;

ΣP ——各组死亡率的总和（以小数表示）。

95%置信限的计算见式 (2) :

$$95\% \text{置信限} = \log LC_{50} \pm 1.96 S \log LC_{50} \quad \dots \dots \dots \quad (2)$$

标准误的计算见式 (3) :

$$SlogLC_{50}=i\sqrt{\sum \frac{pq}{n}} \quad \dots \dots \dots \quad (3)$$

式中：

p ——1个组的死亡率;

$q = 1 - p$;

n ——各浓度组蚯蚓的数量。

5.3.3 直线内插法

采用线性刻度坐标, 绘制死亡百分率对被试物浓度的曲线, 求出 50% 死亡时的 LC_{50} 值。

5.3.4 概率单位图解法

用半对数纸, 以浓度对数为横坐标, 死亡百分率对应的概率单位为纵坐标绘图。将各实测值在图上用目测法画一条相关直线, 从直线中读出致死 50% 的浓度对数, 估算出 LC_{50} 值。

6 质量控制

质量控制条件应包括:

——空白对照组死亡率不超过 10%;

——参比物质试验中棉隆对蚯蚓 14 d LC_{50} 应在 1 mg a. i. /kg 干土~8 mg a. i. /kg 干土之间。

7 试验报告

试验报告至少应包括下列内容:

——被试物的信息, 包括被试农药的通用名、化学名称、结构式、CAS 号、纯度、基本理化性质、来源等;

——被试生物的名称、来源、大小及健康情况;

——试验条件, 包括试验温度、光照等;

——被试土壤中的被试物浓度及试验开始后 14 d 的 LC_{50} 值和 95% 置信限, 并给出所采用的计算方法;

——对照组蚯蚓的死亡率、行为反应异常的比例;

——注明人工土壤配方与配制方法。

附录 A

(资料性附录)

人工土壤组成成分及配比

人工土壤组成成分及配比参见附录 A.1

表 A.1 人工土壤组成成分及配比

成分	含量/%	说明
泥炭藓	10	pH 5.5~6.0
高岭土	20	高岭石含量大于 30%
工业沙	68	50 μm ~200 μm 颗粒含量大于 50%
碳酸钙	2	调节人工土壤 pH 至 6.0 ± 0.5

附录 B

(规范性附录)

土壤最大持水量测定方法

B.1 用合适的取样装置（螺旋管等）取定量（如 5 g）的试验土壤介质。

B.2 用浸满水的滤纸将螺旋管的底部盖住后放在水槽的架子上。水平面最初应低于管上端的管口。稍后应使水平面高于管口。装有土壤的管子留在水中约 3h。

B.3 将装有土壤样品的管子放在湿润的石英砂上 2 h 让多余的水分掉，石英砂装在有盖子的容器里（防止石英砂蒸干）。

B.4 然后称量样品，将样品在 105 °C 下烘干至恒重再进行称重。持水量 (WHC) 按照式 (B.1) 计算：

式中：

W_{HC}—持水量(干物质的百分含量), %;

S ——水饱和介质+管子的重量+滤纸的重量, 单位为克 (g);

T ——净重 (管子的重量+滤纸的重量), 单位为克 (g);

D ——介质的干重, 单位为克 (g)。

参考文献

- [1] NY/1667.1—2008 农药登记管理术语 第1部分: 基本术语
 - [2] NY/1667.2—2008 农药登记管理术语 第2部分: 产品化学
 - [3] FAO (1989). Guidelines on environmental criteria for the registration of pesticides. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
 - [4] OECD (1984). Guideline 207: Earthworm, acute oral toxicity test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
 - [5] US EPA (1985). Part II, Toxic substances control act test Guidelines, Final Rules, Federal register.
 - [6] US EPA (2012). Earthworm Subchronic Toxicity Test (OCSPP 850.3100). Ecological effects test guidelines. EPA 712-C-024, Washington DC, United States of America.
 - [7] ISO (1993). Soil quality-Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*)-Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate (ISO-11268-1—1993).
 - [8] 蔡道基. 农药环境毒理学研究. 北京: 中国环境科学出版社, 1999.
 - [9] Mao L, Zhang L, Zhang Y, Jiang H. (2017). Ecotoxicity of 1,3-dichloropropene, metam sodium, and dazomet on the earthworm *Eisenia fetida* with modified artificial soil test and natural soil test. Environmental Science and Pollution Research, 24:18692-18698.
-