附件8

土壤熏蒸剂对作物安全性评价室内试验方法

（征求意见稿）

**1 范围**

本部分规定了土壤熏蒸剂对作物产生药害风险的室内试验及安全性评价的基本要求和方法。

本部分适用于登记用土壤熏蒸剂的作物安全性评价。

适用靶标作物包括小麦、水稻、棉花、马铃薯、苹果、甘薯、大白菜、小白菜、甘蓝、菠菜、茼蒿、生菜、萝卜、胡萝卜、芋头、豇豆、扁豆、豌豆、荷兰豆、蚕豆、芹菜、芦笋、黄瓜、南瓜、冬瓜、西葫芦、丝瓜、西瓜、甜瓜、香瓜、哈密瓜、番茄、辣椒、茄子、韭菜、葱、蒜、姜、洋葱。

**2术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**2.1**

**安全性 Safety**

土壤熏蒸剂在推荐剂量及在高于推荐剂量一定范围内使用对处理作物不会造成药害的特性，安全性越高，药害风险越低。

**2.2**

**药害 Phytotoxicty**

土壤熏蒸剂使用后对作物产生的可视伤害。

**2.3**

**无影响剂量 No~effect does**

指无视药害的最大试验剂量。

**2.4**

**苗前处理 Preemergence treatment**

土壤熏蒸剂于休茬期进行土壤消毒处理

**2.5**

**安全系数 Safety factor**

作物正常生长发育可以忍耐药剂最大剂量或最高浓度与该药剂使用的最高推荐剂量之比。

**3基本要求**

**3.1试验药剂**

采用与申请登记药剂组分或配方一致的样品，注明通用名、有效成分含量和剂型。

**3.2剂量设置**

以生产企业推荐的田间药效试验最高剂量为最低试验剂量。按1×、2×、4×剂量的梯度设计试验处理剂量，以不含药剂的处理作为空白对照。

**3.3施药方法和施药时期**

采用生产企业推荐的土壤熏蒸剂田间药效试验施药方法和时期。

**3.4供试作物**

**3.4.1品种**

每种供试作物选用3个以上（含3个）不同生物型的品种（如南瓜属的美洲南瓜、印度南瓜和中国南瓜）。如该作物品种的生物型数量不足3个，则选用3个以上（含3个）不同的主栽品种，记录作物品种名称和来源。

**3.4.2栽培**

作物品种种子质量或生长势应保持一致。选用干净饱满的种子，采用营养一致的健康土壤，在光、温、湿可控的条件下使用栽培槽进行土壤消毒处理及栽培，保持适宜的水肥管理。

**4仪器设备**

4.1人工气候培养箱：或光照培养箱、人工气候室或可控日光温室（光照、温度、湿度）。

4.2电子天平：感量0.1 mg。

4.3移液器

4.4栽培槽：尺寸不低于72cm\*20cm\*24cm（长\*宽\*高），不同温度处理时保证深度不低于20cm，尺寸可以减半。

4.6培养皿

**5 试材**

5.1 种子：质量一致，去除空瘪粒，冲洗干净并晾干，空白对照发芽率应符合良种标准。

5.2 土壤：取健康田园土经风干过5mm直径筛后备用。

**6试验方法**

土壤熏蒸剂安全性测试有别于其他杀菌剂和杀虫剂，影响的因素比较多，包括药剂浓度，土壤湿度，土壤类型，土壤温度及处理时间，使用大型栽培槽进行土壤消毒处理及栽培评价。

**6.1不同剂量土壤熏蒸剂对作物安全性测试**

**6.1.1土壤处理**

在相同的环境和土壤条件下以生产企业推荐的田间药效试验最高剂量为最低试验剂量。设置土壤相对含水量60%，日光温室自然温度条件下，按1×、2×、4×剂量的梯度设计试验处理剂量，以不含药剂的处理作为空白对照。将不同浓度土壤熏蒸剂与栽培槽内土壤充分混合均匀后，使用地膜对栽培槽进行封闭处理，确保槽内气体不外逸，每个剂量处理12个栽培槽，处理时间为10天，将地膜揭开后对栽培槽内土壤进行翻晾敞气处理，敞气时间为7天。

**6.1.2 种植试验**

进行出苗试验，土壤相对含水量60%条件下，将3种不同生物型的品种，每个栽培槽播种25粒，每个剂量处理分4个重复（4个栽培槽），置于温室条件（22-25℃）下于出苗后7d、14d、21d定期观察记录作物的生长状况和描述药害症状，检查和计算不同处理间的出苗率、苗高、根长、根数、鲜重、干重、根茎重量和长度比。

**6.2不同土壤湿度环境对土壤熏蒸剂安全性影响**

**6.2.1土壤处理**

在相同环境条件下设置20%、40%和60%的土壤相对含水量，以5.1测试的对作物安全的最高剂量为处理的药剂浓度进行土壤处理，以不含药剂的处理作为空白对照，将相同剂量的土壤熏蒸剂与栽培槽内土壤充分混合均匀后，使用地膜对栽培槽进行封闭处理，确保槽内气体不外逸，每个土壤含水量处理12个栽培槽，处理时间为10天，将地膜揭开后对栽培槽内土壤进行翻晾敞气处理，敞气时间为7天。

**6.2.2 种植试验**

进行出苗试验，土壤相对含水量为60%，将3种不同生物型的品种，每个栽培槽播种25粒，每个土壤含水量处理分4个重复（4个栽培槽），置于温室条件（22-25℃）下于出苗后7d、14d、21d定期观察记录作物的生长状况和描述药害症状，检查和计算不同处理间的出苗率、苗高、根长、根数、鲜重、干重、根茎重量和长度比。

**6.3不同土壤温度对土壤熏蒸剂安全性影响**

**6.3.1土壤处理**

在相同土壤类型条件下，以5.1测试的对作物安全的最高剂量，5.2测试的对作物安全的最低土壤含水量为标准，设置1℃、10℃、20℃、25℃、30℃、40℃、50℃七种土壤温度梯度，以不含药剂的处理作为空白对照，将相同剂量的土壤熏蒸剂与小型栽培槽内土壤充分混合均匀后，使用地膜对栽培槽进行封闭处理，确保槽内气体不外逸，每个温度处理12个栽培槽，分别放在1℃、10℃、20℃、25℃、30℃、40℃、50℃培养箱内，处理时间为10天，将地膜揭开后对栽培槽内土壤进行翻晾敞气处理，敞气时间为7天。

**6.3.2 种植试验**

进行出苗试验，土壤相对含水量为60%，将3种不同生物型的品种，每个栽培槽播种25粒，每个温度处理分4个重复（4个栽培槽），置于温室条件（22-25℃）下于出苗后7d、14d、21d定期观察记录作物的生长状况和描述药害症状，检查和计算不同处理间的出苗率、苗高、根长、根数、鲜重、干重、根茎重量和长度比。

**6.4不同熏蒸时间对土壤熏蒸剂安全性影响**

**6.4.1 土壤处理**

在相同土壤类型条件下，以5.1测试的对作物安全的最高剂量，5.2测试的对作物安全的最低土壤含水量为标准，5.3测试的对作物安全的最低温度条件下，不含药剂的处理作为空白对照，将相同剂量的土壤熏蒸剂与土壤充分混合均匀后，使用地膜对栽培槽进行封闭处理，确保槽内气体不外逸，每个密闭间隔期处理12个栽培槽，设置密闭处理7天， 15天，20天，从20天、15天、7天依次处理，统一敞气时间，将地膜揭开后对栽培槽内土壤进行翻晾敞气处理7天。

**6.4.2 种植试验**

进行出苗试验，土壤相对含水量为60%，将3种不同生物型的品种，每个栽培槽播种25粒，每个密闭时间处理分4个重复（4个栽培槽），置于温室条件（22-25℃）下于出苗后7d、14d、21d定期观察记录作物的生长状况和描述药害症状，检查和计算不同处理间的出苗率、苗高、根长、根数、鲜重、干重、根茎重量和长度比。

**6.5不同土壤类型对土壤熏蒸剂防效及安全性影响**

**6.5.1 土壤处理**

选择9种不同的土壤类型，以5.1测试的对作物安全的最高剂量，5.2测试的对作物安全的最低土壤含水量为标准，5.3测试的对作物安全的最低温度、5.4测试的对作物安全的最低熏蒸时间条件下测试不同土壤类型对土壤熏蒸剂防效及安全性影响。每种土壤以不含药剂的处理作为空白对照，将相同剂量的土壤熏蒸剂与土壤充分混合均匀后，使用地膜对栽培槽进行封闭处理，确保槽内气体不外逸，每个密闭间隔期处理12个栽培槽，将地膜揭开后对栽培槽内土壤进行翻晾敞气处理7天。

**6.5.2 种植试验**

进行出苗试验，土壤相对含水量为60%，将每个栽培槽播种4粒黄瓜品种，每种土壤处理分4个重复（4个栽培槽），置于温室条件（22-25℃）下于出苗后21d定期观察记录作物的生长状况和描述药害症状，检查和计算不同处理间的出苗率、株高、叶面积和产量。

**7 药害评价内容**

调查对出苗的影响，评价土壤熏蒸剂处理后出苗率、株高、根系数量和主根长度、根/茎鲜重比及植株形态和叶色的伤害等。

**8 药害症状描述**

**8.1变色**

包括褪绿、黄化、白化、花叶、锈斑、褐化、绿化等。

**8.2 坏死**

斑点、枯斑、叶缘坏死、生长点或攀缘茎枯死、落叶、落花、落果、空秕粒等。

**8.3生长发育延缓**

矮化、节间缩短、叶片伸展受抑、出苗不齐、成熟期改变、生长发育停滞。

**8.4萎蔫**

植株失水萎蔫、青枯。

**8.5畸形**

分蘖异常、生长不定根、侧向生长、徒长、叶片卷曲或扭曲变形、茎缢缩、花穗变形。

**9药害程度描述**

**9.1变色**

土壤消毒后作物没有任何可见药害症状为很安全；

土壤消毒后有少于10%的作物叶片有轻微变色，或3d~4d内可恢复为安全；

土壤消毒后有11%~20%的作物叶片有明显变色，或7d~10d内可恢复为轻微药害；

土壤消毒后有21%~50%的作物叶片明显变色，或10d内不能恢复为中度药害；

土壤消毒后有50%以上的叶片明显变色，且不能恢复为严重药害。

**9.2坏死**

土壤消毒后作物没有任何可见药害症状为很安全；

有10%以内的作物器官出现少数斑点或坏死，占作物器官面积1%以下，或增加1%以下的落叶为安全；

有11%~20%的作物器官出现斑点或坏死，占作物器官面积3%以下，或增加3%以下的落叶为轻微药害；

有21%~50%的作物器官出现斑点或坏死，占作物器官面积10%以下，或增加10%以下的落叶为中度药害；

有50%以上的作物器官出现斑点或坏死，占作物器官面积10%以上，或增加10%以上的落叶为严重药害。

**9.3生长停滞**

土壤消毒后作物没有任何可见药害症状为很安全；

土壤消毒后21d内生长速率抑制率10%以内、或出苗延缓1d~2d以内、或7d~14d内对出苗率的抑制率5%以内为安全；

土壤消毒后21d内生长速率抑制率11%~20%、或出苗延缓2d~3d以内、或7d~14d内对出苗率的抑制率6%~10%为轻微药害；

土壤消毒后21d内生长速率抑制率21%~50%、或出苗延缓3d~7d以内或7d~14d内对出苗率的抑制率11%~20%为中度药害；

土壤消毒后21d以内生长速率抑制率50%以上，或7d~14d内对出苗率的抑制率20%以上为严重药害。

**9.4萎蔫**

土壤消毒后作物没有任何可见药害症状为很安全；

土壤消毒后3d以内作物叶片在中午有1h~2h短暂失水萎蔫，然后恢复为安全；

土壤消毒后3d以内作物叶片在中午有3~5h失水，早晚恢复为轻微药害；

土壤消毒后3~5d以内作物叶片在一天内有5h以上失水萎蔫，早晚恢复为中度药害；

土壤消毒后作物萎蔫，且在5d后不能恢复而枯萎为严重药害。

**9.5畸形**

土壤消毒后作物没有任何可见药害症状为很安全；

土壤消毒后21d，有5%以内的植株生长不定根、侧向生长、徒长、叶片卷曲或扭曲变形、茎缢缩为安全；

有6%~25%以内的植株生长不定根、侧向生长、徒长、叶片卷曲或扭曲变形、茎缢缩为轻微药害；

有26%~50%以内的植株生长不定根、侧向生长、徒长，叶片卷曲或扭曲变形、茎缢缩为中度药害；

有50%以上的植株生长不定根，侧向生长、徒长、叶片卷曲或扭曲变形、茎缢缩为严重药害。

**10有关药害程度系数的计算**

**10.1发芽率和出苗率的抑制率**

按式(1)计算出苗率(%)

......................................................（1）

式中：

G—出苗率，单位为百分率(%);

N1—出苗数；

N2—测试种子数。

按式(2)计算出苗率的抑制率(%)

......................................................（2）

式中：

GI—出苗率的抑制率，单位为百分率(%);

C—空白对照出苗率，单位为百分率(%);

T—土壤熏蒸剂处理出苗率，单位为百分率(%);

**10.2生长速率抑制率：**

按式(3)计算生长速率

....................................................（3）

式中:

R—生长速率，单位为毫米每天(mm/d)；

L—植株或根系新生高度或长度、鲜重或干重，单位为毫米或克(mm/g)；

D—为时间，单位为天(d)。

按式(4)计算生长速率抑制率(%):

....................................................（4）

式中:

RI—生长速率抑制率，单位为百分率(%);

Rck—空白对照生长速率；

RT—土壤熏蒸剂对照生长速率。

**10.3安全系数**

按式(7)计算安全系数：

....................................................（5）

式中:

I—安全系数；

C一土壤熏蒸剂对作物的最大无影响试验剂量；

W—土壤熏蒸剂田间最高推荐使用剂量。

**11安全性评价**

根据测试靶标作物的经济价值、药害症状及伤害程度或安全性系数，评价药剂对作物的安全性。

**12结果**

根据统计结果进行分析评价，写出正式试验报告，并列出原始数据和附药害症状照片。

# 附录A

**（资料性附录）**

**土壤消毒剂**

**A. 1 学名**

### 氰氨化钙（[*Calcium Cyanamide*](https://www.so.com/link?m=ae3wnZP8+xBEpdDxULaVa/0r3Rn9EF4b1F9hWGz/sHRZhtoKt90f4Pw+OQgyYiY7J1NurWqqhXVlQnSIF5+RkpEvf00swWVbgTrAZzuaAto/u6/eO6r5y3Al/pWHlBMRfxwLJ9YZPBmq5fkd0QrLtL3unfLlM1UU32DFky9Qk8eg=)）

棉隆（*dazomet*）

威百亩（*Metam-Sodium*）

**A.2 类型描述**

氰氨化钙（*Stemphylium solani*），俗名石灰氮或碳氮化钙。纯品为白色结晶，不纯品为灰黑色，存特殊臭味，含N20%，CaO 50%。。熔点1300℃，沸点1150℃（升华），密度2.29g/m3，不溶于水，但可水解；其小鼠急性毒性（经口）为大鼠急性毒性（经口）LD50为334mg/kg，大鼠急性毒性（径口）对LD50为158mg/kg；对神经、眼睛和呼吸道有刺激作用。

棉隆（*dazomet*）又名必速灭，化学名称：四氢-3,5-二甲基-2H-1,3,5-噻二嗪-2-硫酮，分子式：C5H10N2S2，为灰白色针状结晶，微溶于水，能溶解于多数有机溶剂，常温下稳定，但遇湿易分解，制剂为98%微粒剂。急性毒性：雌雄大鼠急性经口 LD50分别为 710 mg/kg 和 550 mg/kg，小鼠急性经口 LD50为 400mg/kg，兔急性经皮 LD50为 2360～2600 mg/kg，对兔的皮肤无刺激效果，对眼睛有轻微刺激作用，对大鼠 2 年饲喂试验无作用剂量为每天 10mg/kg，对狗 1 年饲喂试验无作用剂量为每天 45mg/kg，试验剂量内对动物试验未见致癌、致畸、致突变作用。鲤鱼 LC50为 10mg/L（48h），野鸡经口 LD50 473 mg/kg，对蜜蜂安全，根据我国农药急性毒性分级标准属低毒物质。

威百亩（Metam-Sodium），又名线克，是一种无色结晶固体。在水中溶解度为722g/L（20℃），同时溶于甲醇，几乎不溶于其他有机溶剂，遇酸和重金属盐易分解，低等毒性。制剂有水剂、水剂、水剂。

|  |  |
| --- | --- |
| IMG_256 |  |
| **图1 氰氨化钙** | **图2棉隆** |
| IMG_256 |
| **图3威百亩** |

# 附录B

**土壤消毒剂对不同作物的安全性评价记录表**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 作物 | 出苗率% | 苗高cm | 根长cm | 根数/个 | 鲜重 g | 干重 g | 叶面积 cm2 |
| 番茄 |  |  |  |  |  |  |  |
| 辣椒 |  |  |  |  |  |  |  |
| 黄瓜 |  |  |  |  |  |  |  |
| 甜瓜 |  |  |  |  |  |  |  |

 技术鉴定负责人（签字）：

# 附录C

（资料性附录）

主要参考文献

NY/T 3129-2017 棉隆土壤消毒技术规范

DB 13/T 1418-2011 高温闷棚土壤消毒技术规程

吴雪芬, 周英, 陈军,等. 土壤消毒技术在安全无公害作物生产上的应用[J]. 安徽农业科学, 2015, 000(011):85-87.