

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—2015

## 化学农药 蚯蚓繁殖毒性试验准则

Chemical pesticide—Guidelines for earthworm reproduction 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。

2015-XX-XX发布

2015-XX-XX实施

中华人民共和国农业部发布

## 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No.222《蚯蚓繁殖试验》（英文版）技术内容相同。

本标准做了下列结构和编辑性修改：

- 为与现有标准一致，将标准名称改为《化学农药 蚯蚓繁殖试验准则》；
- 将术语定义由附录1转到正文；
- 在术语和定义中增加供试物、化学农药、行为症状、生殖带、成蚓和死亡的定义及描述；
- 计量单位改为我国法定计量单位；
- 在供试物信息中增加化学结构式和纯度；
- 根据现行农药登记要求，删除试验准则中对物质进行化学分析的建议；
- 根据化学农药特性和参考现行蚯蚓急性毒性试验相关上限浓度，将限度试验上限浓度修正为100 mg a.i./kg<sub>干土</sub>。

本标准由中华人民共和国农业部种植业司提出并归口。

本标准起草单位：农业部农药检定所、南京环境科学研究所

本标准主要起草人：

# 化学农药 蚯蚓繁殖试验准则

## 1 范围

本标准规定了蚯蚓繁殖试验的术语和定义、供试物信息、试验概述、试验方法、试验质量控制、试验报告的基本要求。

本部分适用于为化学农药而进行的蚯蚓繁殖毒性试验，其他类型的农药可参照使用。

本部分适用于不论其水溶性如何的所有物质。但该方法不适用于挥发性的化学农药，此处定义为化学农药的亨利常数或空气/水分配系数大于 1。也不适用于 25°C 下蒸汽压超过 0.0133Pa 的化学农药。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

**x%效应浓度** Effect concentration for x% effect,  $EC_x$

给定的试验期限内，和对照组相比引起受试生物 x% 某种效应的受试物浓度。比如，半效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 指经过给定的暴露时间后，在试验终点时引起受试生物 50% 某种效应的受试物浓度

注：单位为  $mg\ a.i./kg_{干土}$ （人工土壤，干重）。

### 2.2

**无致死浓度** No lethal concentration,  $LC_0$

给定的试验期限内，没有杀死任何受暴露供试生物死亡的供试物最大浓度

注：单位为  $mg\ a.i./kg_{干土}$ （人工土壤，干重）。

### 2.3

**半致死浓度** Median lethal concentration,  $LC_{50}$

给定的试验期限内，引起 50% 受暴露供试生物死亡时的供试物浓度

注：单位为  $mg\ a.i./kg_{干土}$ （人工土壤，干重）。

### 2.4

**全致死浓度** Totally lethal concentration,  $LC_{100}$

给定的试验期限内，引起 100% 受暴露供试生物死亡时的供试物浓度

注：单位为  $mg\ a.i./kg_{干土}$ （人工土壤，干重）。

### 2.5

**最低可见效应浓度** Lowest Observed Effect Concentration,  $LOEC$

毒性试验中，供试物对供试生物的效应和空白对照组相比有统计学显著性差异 ( $p < 0.05$ ) 的

最低浓度，即供试物对供试生物有不利影响的最低浓度。

## 2.6

**无可观测效应浓度 No Observed Effect Concentration, NOEC**

毒性试验中，未观察到供试物对供试生物效应与空白对照组具有统计学显著性差异( $p < 0.05$ )的供试物最高浓度，一般为低于 LOEC 的供试物最高浓度。

## 2.7

**成蚓 Adult worms**

身体前部出现生殖带的成熟蚯蚓。

## 2.8

**生殖带 Clitellum**

成蚓前端表皮的一个腺体，呈马鞍形或环状，通常有明显不同的颜色。

## 2.9

**繁殖率 Reproduction rate**

试验期内每条成年蚯蚓生产的幼蚓数量的平均值。

## 2.10

**行为症状 Behavioral symptoms**

供试物引起蚯蚓中毒后的非正常生物学行为的描述指标。一般包括土壤表表面翻滚、僵硬缩短、伸长并且做脉冲式运动，或者在土壤中停止活动，缩成一团。可以识别蚯蚓在测试容器中的每一个明显变化，。

## 2.11

**死亡 Mortality**

用细小的针刺试验蚯蚓的前部和尾部，没有明显反应的生物体。因蚯蚓死亡后分解很快，在密闭实验容器的土壤中引入活蚯蚓数量的损失也可认为是死亡发生。

## 3 供试物信息

试验应明确供试物但不限于下列信息：

- a) 化学结构式；
- b) 纯度；
- c) 水溶性；
- d) 水中和光中的稳定性
- e) 辛醇-水分配系数；
- g) 蒸汽压。

## 4 试验概述

通过不同浓度的供试物溶液与定量的人工配制土壤混合，引入定量健康和稳定繁殖力的成蚓，并在 4 周内观察试验土壤中成蚓死亡率和生长受到的影响；8 周内观察土壤中子代数量，以评估供试物对蚯蚓繁殖的影响。

供试物浓度的选择应包括在八周内可能会引起亚致死和致死效应的浓度，并使  $EC_x$  值应当在试验选择的浓度范围内，使得  $EC_x$  的测定来自内插法而不是外推法。成蚓暴露四周后取出观察到的成蚓，继续暴露四周后，观察、统计土壤中的子代数量。通过统计分析供试物处理组和空白对照组繁殖率的差异，确定 LOEC 和 NOEC，和/或通过回归模型来估算  $EC_x$ （如  $EC_{10}$  和  $EC_{50}$ ）。

## 5 试验方法

### 5.1 材料和条件

#### 5.1.1 供试生物的选择和准备

试验推荐使用赤子爱胜蚓（*Eisenia foetida*）和安德爱胜蚓（*Eisenia andrei*），选择具有生殖带的两个月至一年大小的成蚓。同一个试验中所用的蚯蚓应来自同一生长环境，虫体大小、虫龄需均匀一致，虫龄差别一般不超过四周。试验前，应先将选好的蚯蚓在试验用的人工土壤环境中驯养至少一天的时间，驯养期间使用的食物应和试验中保持一致。

经驯养的试验用成蚓应先用去离子水清洗干净，然后放到滤纸上吸去多余水分，每 10 条蚯蚓为一组，每组单独称重，蚯蚓的重量应在 250mg~600mg 之间。称重后成蚓在试验开始前随机分配到各试验培养容器中。

#### 5.1.2 供试物

供试物可使用农药制剂、原药。难溶于水的供试物可用少量对蚯蚓毒性低的有机溶剂助溶，有机溶剂用量一般不得超过 0.1 mL (g) /L。

#### 5.1.3 参比物

为检验实验室的设备、条件、方法及供试生物的质量和稳定性是否合乎要求，实验室须设置参比物质做方法学上的可靠性检验，实验室可按蚯蚓培养或引入的批次进行参比物可靠性检验，一般一年测试参比物一次，或者当试验进行频率比较低时，可以与供试物的繁殖毒性一起一起测定。本准则使用多菌灵（Carbendazim）或苯菌灵（Benomyl）作为参比物，其 LOEC 应在 1mg/kg 干土 ~5mg/kg 干土。

#### 5.1.4 供试土壤

人工配制土壤，由干重分别为68%的70号标准筛过滤的石英砂、20%的高岭土、10%泥炭藓（土）和2%碳酸钙混合组成。实验时用去离子水或蒸馏水将其含水量调节为35%。

#### 5.1.5 主要仪器设备

标本瓶或其他玻璃容器，横截面积需在 200cm<sup>2</sup> 左右，容积 1~2 升，使放置 500g~600g 试验用人工土壤后的厚度在 5~6cm，容器口加盖透气、透光的盖板。

pH 计和光度计；

合适的精准天平；

温湿度可控的培养箱；

容量瓶；

镊子，钩或环；

水浴锅等。

#### 5.1.6 试验条件

试验温度为 20℃ ±2℃，相对湿度为 70%~90%，光照强度 400 Lux~800 Lux，光暗时间比 16h:8h。定期称重试验容器（去盖）来监测土壤的含水量。必要时，添加去离子水来补充水量损失，使试验人工土壤含水量变化的范围不超过初始含水量的 10%。

### 5.2 试验操作

#### 5.2.1 染毒

根据测试目的来选择染毒方式，一般可将供试物溶液与试验人工土壤均匀混合。在更精细的染毒试验中，也可直接将供试物施于土壤表面，或与常规的农业实际操作一致（例如：喷洒液体制剂，或使用一些特殊的剂型如颗粒剂和种衣剂时）。如供试物或参比物染毒过程中使用有机溶剂时，有机溶剂应对蚯蚓低毒，且在试验设计中应以最大溶剂使用量设溶剂对照组。

##### 5.2.1.1 均匀混合法

使用均匀混合法染毒时，根据供试物理化特性可按下列三种情况进行：

——供试物易溶于水：试验开始前，按设计浓度需要，将供试物配置适量的供试物水溶液，使其可以满足一个处理浓度所有重复的使用量。将适量各浓度药液和试验人工土壤混合均匀后，补充去离子水以使土壤最终含水量满足要求，放入试验容器中。

——供试物难溶于水：将供试物用少量的适宜有机溶剂（如丙酮）溶解，均匀喷洒到或混入适量细石英砂中（石英砂使用量应计入人工土壤配置数量），并置于通风橱中几分钟，使有机溶剂蒸发。将处理过的石英砂与预先湿润的其他人工土壤配料混合均匀，补充去离子水量以使土壤最终含水量满足要求，混合均匀后放入试验容器中。

——供试物不溶于水也不溶于有机溶剂：用 10g 细石英砂和供试物制成均匀混合物（石英砂使用量应计入人工土壤配置数量）。然后将该混合物均匀混入预先湿润的其他人工土壤配料中，补充去离子水以使土壤最终含水量满足要求，混合均匀后放入试验容器中。

### 5.2.1.2 土壤表面喷雾法

使用土壤表面喷雾法染毒时，应先将试验用蚯蚓放入试验容器中配置好的湿人工土壤表面，待试验蚯蚓钻入土中后，进行土壤表面喷雾染毒。15 分钟后还未钻入土中的蚯蚓应视为非健康蚯蚓，应与更换。

土壤表面喷雾法染毒时应避免蚯蚓与供试物或参比物直接皮肤接触，加入蚯蚓半小时内或当蚯蚓还在土壤表面时不能加入供试物，以避免。供试物或参比物应使用精细的喷头均匀喷洒在土壤表面，并尽可能避免喷洒到试验容器壁上。加入供试物时，室内温度应保持在  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，药液喷施量应控制在  $600\mu\text{L}/\text{m}^2 \sim 800\mu\text{L}/\text{m}^2$ 。药液喷施量应用适宜的方法进行校准。染毒后，试验容器在一小时内不应盖上盖子，以便所用的溶剂蒸发，但应采取有效措施蚯蚓爬出逃逸。

### 5.2.2 预试验

正式试验之前，一般需进行预试验，以明确正式试验所要求的合适试验浓度范围。通常按几何级数设置 5 种不同浓度组，如 0.1、1、10、100 和  $1000\text{mg a.i.}/\text{kg}_{\text{干土}}$ （人工土壤，干重），也可根据蚯蚓急性毒性试验结果进行预试验设计。预实验可不设重复试验组，两周后检查蚯蚓死亡率，根据预实验结果进行正式试验浓度设计。

### 5.2.3 正式试验

参考预实验结果，正式试验浓度设计可按下列三种方法进行：

a) 测定 NOEC 时，按照等比数列设置至少 5 个浓度。每个处理组 4 个重复，同时设置 8 个空白对照组。浓度公比应不超过 2。

b) 测定  $\text{EC}_x$ （如  $\text{EC}_{10}$  和  $\text{EC}_{50}$ ）时，处理组浓度设置数量应满足能产生在统计学上具有显著性差异的 4 种结果。每个浓度处理组  $\geq 2$  个重复，同时设 6 个对照组。浓度间距公比可变化，一般间距公比  $\leq 1.8$ ，当  $\text{EC}_x$  不在期望的浓度范围内，则浓度间距公比可  $\geq 1.8$ 。

c) 同时测定  $\text{EC}_x$  和 NOEC 时，应按几何级数设置至少 8 个浓度处理组。每个浓度处理组设置 4 个重复，同时设置 8 个空白对照组，浓度间距公比  $\leq 1.8$ 。

试验人工土壤中蚯蚓生物量应控制在每 500g~600g 干土放入 10 条蚯蚓（1 条蚯蚓/50g~60g 土壤），若采用更多的试验土壤量，则应按上述要求增加相应蚯蚓数量。试验蚯蚓经试验前在人工土壤中驯养 24 小时后，并经冲洗干净、称重，然后放于试验人工土壤表面，由其自行转入土中。试验用容器应用具孔的塑料板盖好以防试验土壤失水变干。试验期间，推荐采用燕麦片或牛马粪便作为蚯蚓饲料。使用牛马粪便作为饲料时，应明确粪源动物未使用过生长促进剂或杀线虫剂等兽药，以避免对蚯蚓造成不利影响。试验开始一天后提供饲料，每个容器投放约 5g 饲料于土壤表面，用去离子水湿润（每个容器约 5~6mL），每 7d 喂食一次，若饲料未被完全摄食，再

次喂食需扣除这部分饲料量。当试验进行 4 周后，移去成年蚯蚓，只需添加一次饲料，余下 4 周试验期内不再喂食。

#### 5.2.4 观测方法

试验开始后第 28 天观察并记录存活成蚓数。任何非正常的行为（如不再具备钻入土中的能力或躺着不动等）或形态上的变化（如伤口）应同时记录。然后，并计数称重。观察记录存活成蚓时，可将试验土壤倒置一个干净的托盘中，移除所有成蚓用去离子水清洗，然后吸去多余水分称重。因成蚓死亡后易分解，所有未见成蚓均可记录为死亡成蚓。

试验土壤从容器中倒出并挑出成蚓后，应重新放回容器中（确保蚓茧同时放回容器），按相同条件下继续培养 4 周，4 周内仅开始投放一次饲料。

试验开始后第 56 天，观察记录每个试验容器中的幼蚓数量和蚓茧数量。计数幼蚓数时，可将装有试验土壤的容器放入 60℃ 水浴中，约 20min 后幼蚓因为不耐升高的土壤温度将爬出土壤表面，此时可快速移走每条可见的幼蚓并计数，直到没有蚯蚓出现为止。

#### 5.2.5 限度试验

设置 100 mg a.i./kg 干土 为上限浓度，进行限度试验。当限度试验证明供试物对蚯蚓繁殖活性影响的 NOEC 比限度试验浓度高，可判定供试物对蚯蚓繁殖无影响，则无需继续进行试验。限度试验中，空白对照组和每个处理组均采用 8 个重复组。

### 6 数据处理与分析

采用适宜的统计学软件分析蚯蚓的死亡数据，计算  $LC_{50}$ 、 $EC_x$  和置信限。估算 NOEC 可采用多重  $t$  检定（multiple  $t$ -tests）的一些统计学方法，如 William' test ( $\alpha=0.05$ ，单边) 或 Dunnett's test，比较处理组和重复组之间的显著性差异。

### 7 质量控制

质量控制条件包括：

——在试验结束时每个重复（包含 10 条成蚓）应当产生  $\geq 30$  条幼蚓；

——繁殖的在变异系数应当  $\leq 30\%$ ；

——在实验开始四周后成蚓死亡率应当  $\leq 10\%$ ；

——在 20℃  $\pm$  2℃ 条件下，参比物 LOEC 应在 1mg/kg 干土 ~5mg/kg 干土。

### 8 试验报告

试验报告应包括下列内容：

#### a) 供试物的信息

——供试物的确切描述、批次、批号和 CAS 号，纯度等；



——供试物的相关理化特性等包括（如  $\log K_{ow}$ 、水溶解度、蒸汽压、亨利常数和行为数据）等；

b) 供试生物

——使用生物、种属、学名、来源及培养条件；

——供试生物的虫龄、尺寸（重量）范围；

c) 试验条件

——试验土壤的准备细节描述；

——土壤的最大持水量；

——供试物的染毒方式描述；

——附加物质使用的详细信息；

——喷洒设备的校准详细信息；

——试验设计和程序的描述；

——测试容器的尺寸和土壤体积；

——试验条件，包括试验温度、光照强度、光周期等；

——驯养方法的描述，试验中所用食物类型及用量，饲喂日期等；

——试验开始和结束时土壤的 pH 值和含水量。

d) 结果

——最初四周试验结束时每试验容器中成蚓的死亡率（%）；

——试验开始时每试验容器中成蚓的重量；

——最初四周试验结束时成活蚯蚓体重的变化（初始体重的%）；

——试验结束时每试验容器内幼蚓数量；

——试验中蚯蚓的生理和病理症状或异常行为的详细描述；

——参比物质试验结果；

——确定  $LC_{50}$ 、NOEC 和/或  $EC_x$ （如  $EC_{50}$  和  $EC_{10}$ ）值的统计学方法；

——剂量-反应关系图；

任何偏离准则以及试验过程中的各种意外均应记录和报告。



附录 A  
(资料性附录)  
土壤最大持水量的测定

用适宜的取样工具（如螺旋钻管）收集一定数量的土壤基质样本（如 5g）。在管底放一张完全润湿的滤纸，然后将含有土壤样品的管放置在水浴锅中的支架上并使取样管逐渐淹没于水中，保持水位处于土壤样品表面约 3 个小时。因为被土壤毛细管所吸收的水不能完全保持在土壤中，所以土壤样本在取出后应该放在一个具盖容器中的一个潮湿的细石英砂床上（以防干燥）排水大约 2 个小时。然后称重土壤样本，并在 105℃ 下干燥至恒重，再称重。按以下公式计算最大持水量（WHC）：

$$WHC = (S - T - D)/D \times 100$$

其中：

S=浸满水的土壤基质质量+管的质量+滤纸的质量

T=皮重（管的质量+滤纸的质量）

D=土壤干重

附录 B  
(资料性附录)  
土壤 pH 值的测定

取适量土壤在室温下干燥至少 12 小时。加入 5 倍体积的 1mol/L 分析级 KCl 溶液或者 0.01mol/L 分析级 CaCl<sub>2</sub> 溶液制成土壤悬浮液（至少含 5g 土壤）。然后充分震荡 5min，再静置至少 2h 但不得多于 24h。然后用 pH 计测得土壤悬浮液的 pH 值，pH 计在每次使用前都要用一系列适宜的缓冲溶液（如 pH4.0 和 7.0）校准。

## 附录 C

### （资料性附录）

#### 赤子爱胜蚓/安德爱胜蚓的养殖

在  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  的人工气候室中进行繁育工作。在这个温度以及充足的食物供应下，在约 2-3 月的时间内蚯蚓即可发育成熟。

这两个物种都可以在多种动物粪便中进行养殖。推荐使用比例为 50: 50 的牛或马的粪便和泥炭组成的养殖基质。但应明确牛或马没有使用过生长促进物质，杀线虫剂或类似的兽药产品，以免对蚯蚓造成不利影响。通常自己收集的牛粪较市售牛粪对蚯蚓的影响更小。培养基质的 pH 应在 6-7 间（用  $\text{CaCO}_3$  调整），且具有低离子电导率（小于 6mg 或 0.5% 盐浓度），保持培养基质不被氨或动物尿过度污染，含水量也不宜太湿。育种箱容量应在 10-50 升。

为了获得年龄和大小（重量）一致的蚯蚓，推荐从蚓茧开始培养。一开始培养时，把新鲜基质和蚯蚓成虫一起放入育种箱，以至 14-28 天后产生新的蚓茧，从而使培养维持下去。然后移除成虫，由蚓茧产生的幼虫又可以为下阶段培养做准备。给蚯蚓持续饲喂动物粪便，并不时将其移至新的培育基质中。通常风干的磨细的牛马粪或燕麦是较合适的食物。蚓茧孵出的幼虫在 2-12 个月大的时候即可认为是成虫。

如果蚯蚓在土中穿梭，而不是尝试离开土中，且可以持续繁殖，则可以认为蚯蚓是健康的。如果蚯蚓移动缓慢，尾部发黄，则表明基质中养料枯竭。这时候建议供应新基质或者降低养殖密度。

## 附录 D

### （资料性附录）

#### 蚓茧孵出的子代数量计数方法

从土中用手直接挑蚯蚓计数很费时，推荐以下两种替代方法：

（a）把容器放到初始温度为 40℃ 的水浴中，然后升温到 60℃。大约 20min 后，幼蚓即会出现在土壤表面，易于挑出并计数。

（b）试验土壤可以使用 Van Gestel 等人的方法借助筛进行冲洗。如果加入到土壤中的泥炭和牛马粪或燕麦片都已被磨成细粉状。把网孔为 0.5mm 的两个筛子上下叠放在一起。然后把容器中的基质放到上层筛子中，用强自来水流进行冲洗，使得大部分的子代蚯蚓和蚓茧留在上层筛中。重要的一点是，在操作期间要注意保持上层筛整个表面的湿润，使得蚯蚓可以浮在其上的水膜上，从而防止蚯蚓从网孔中爬出。如果使用淋浴喷头的话，会取得更好的结果。

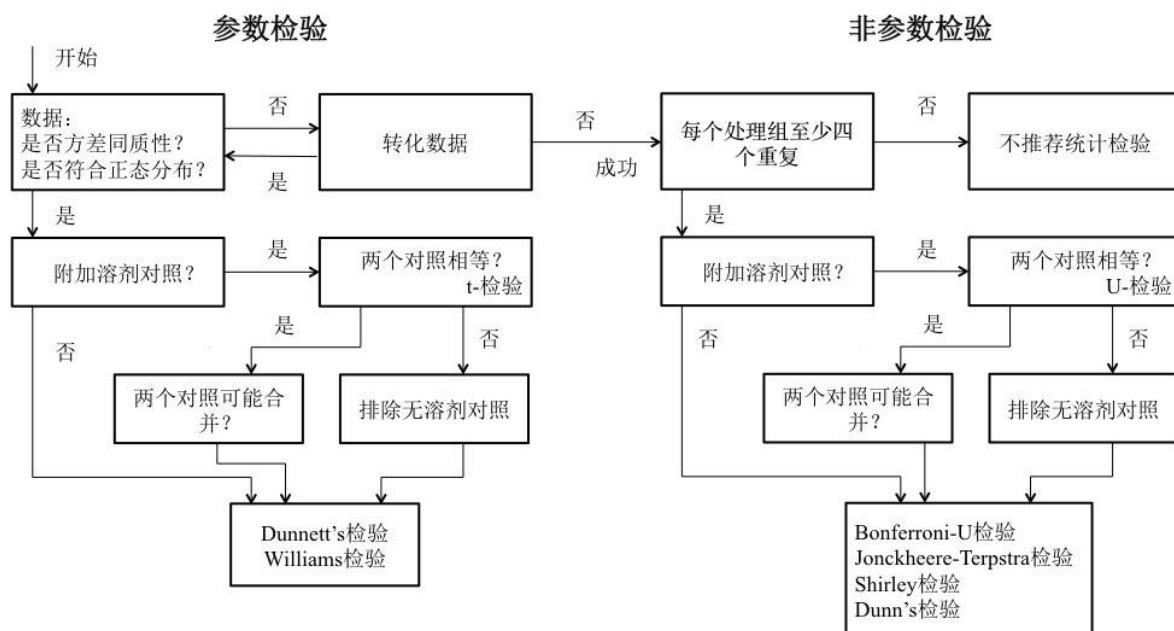
当所有的基质被冲洗掉后，可将幼虫和蚓茧冲洗到一个烧杯里。静置，使空蚓茧浮在水面上，幼虫和非空蚓茧沉到水底。然后倒掉水，把幼虫和非空蚓茧转移到含少量水的培养皿中，用针或镊子取出计数。

方法（a）更适用于分离出可能会被 0.5mm 筛子洗出去的幼蚓。当手工收集并计数幼蚓时，每个样品应重复操作两次。

## 附录 E

(资料性附录)

### 数据统计分析方法选择路径 (计算 NOEC)



## 参考文献

- [1] 农业部.农药登记资料规定. 农业部令第 10 号. 2008.
  - [2] 《化学农药环境安全评价试验准则》系列国标 (GB/T 31270.10-2014) 国家标准化管理委员会 2014.
  - [3] 蔡道基主编, 农药环境毒理学研究, 中国环境科学出版社, 1999.
  - [4] ISO (International Organization for Standardisation ) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2.ISO, Geneve
  - [5] ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality - Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
  - [6] Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.
  - [7]OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Test No. 222, arthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida* *Eisenia andrei*), Adopted 13 April, 2006.
-