



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.15—2014

---

## 化学农药环境安全评价试验准则 第 15 部分：蚯蚓急性毒性试验

Test guidelines on environmental safety assessment for chemical  
pesticides—Part 15: Earthworm acute toxicity test

2014-10-10 发布

2015-03-11 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

GB/T 31270《化学农药环境安全评价试验准则》分为 21 个部分：

- 第 1 部分：土壤降解试验；
- 第 2 部分：水解试验；
- 第 3 部分：光解试验；
- 第 4 部分：土壤吸附/解吸试验；
- 第 5 部分：土壤淋溶试验；
- 第 6 部分：挥发性试验；
- 第 7 部分：生物富集试验；
- 第 8 部分：水-沉积物系统降解试验；
- 第 9 部分：鸟类急性毒性试验；
- 第 10 部分：蜜蜂急性毒性试验；
- 第 11 部分：家蚕急性毒性试验；
- 第 12 部分：鱼类急性毒性试验；
- 第 13 部分：溞类急性活动抑制试验；
- 第 14 部分：藻类生长抑制试验；
- 第 15 部分：蚯蚓急性毒性试验；
- 第 16 部分：土壤微生物毒性试验；
- 第 17 部分：天敌赤眼蜂急性毒性试验；
- 第 18 部分：天敌两栖类急性毒性试验；
- 第 19 部分：非靶标植物影响试验；
- 第 20 部分：家畜短期饲喂毒性试验；
- 第 21 部分：大型甲壳类生物毒性试验。

本部分是 GB/T 31270 的第 15 部分。

本部分按照 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。

本部分由中华人民共和国农业部提出并归口。

本部分负责起草单位：农业部农药检定所、环保部南京环境科学研究所。

本部分主要起草人：卜元卿、徐晖、金怡、程燕、杨海荣、魏方林、慕卫。

# 化学农药环境安全评价试验准则

## 第 15 部分：蚯蚓急性毒性试验

### 1 范围

GB/T 31270 的本部分规定了蚯蚓急性毒性试验的材料、条件、操作、质量控制、数据处理、试验报告等的基本要求。

本部分适用于为化学农药登记而进行的蚯蚓急性毒性试验,其他类型的农药可参照使用。

本部分不适用于易挥发和难溶解的化学农药。

### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 2.1

##### **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。

#### 2.2

##### **成蚓 adult worm**

身体前端呈现出生殖带的蚯蚓。

#### 2.3

##### **半致死浓度 median lethal concentration**

在急性毒性试验中,引起 50% 供试生物死亡时的供试物浓度,用  $LC_{50}$  表示。

注:单位为 mg a. i. /kg 干土。

#### 2.4

##### **供试物 test substance**

试验中需要测试的物质。

#### 2.5

##### **化学农药 chemical pesticide**

利用化学物质人工合成的农药。其中有些以天然产品中的活性物质为母体,进行仿制、结构改造,创新而成,为仿生合成农药。

同义词:有机合成农药 synthetic organic pesticide。

[NY/T 1667.1—2008,定义 2.3.1]

#### 2.6

##### **原药 technical material**

在制造过程中得到的有效成分及杂质组成的最终产品,不能含有可见的外来物质和任何添加物,必要时可加入少量的稳定剂。

[NY/T 1667.2—2008,定义 2.5.1]

#### 2.7

##### **制剂 formulation product**

由农药原药(或母药)和助剂制成使用状态稳定的产品。

[NY/T 1667.2—2008, 定义 2.4]

## 2.8

**有效成分 active ingredient; a. i.**

农药产品中具有生物活性的特定化学结构成分。

[NY/T 1667.2—2008, 定义 3.1]

## 2.9

**参比物质 reference substances**

在测试中为证实或否定供试物的某种特性或判断测试系统有效性而使用的化学物质或混合物。

## 3 试验概述

在适量人工土壤加入农药溶液并充分拌匀,每个处理放入 10 条蚯蚓,在适宜条件下培养两周。在第 7 d 和第 14 d 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。

## 4 试验方法

### 4.1 材料和条件

#### 4.1.1 供试生物

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。

#### 4.1.2 供试土壤

人工土壤(配方参见附录 A)。

#### 4.1.3 供试物

供试物应使用农药制剂、原药或纯品。难溶于水的可用少量对蚯蚓毒性小的有机溶剂助溶,有机溶剂用量一般不得超过 0.1 mL(g)/L。

#### 4.1.4 主要仪器设备

主要仪器设备如下:

- 培养箱;
- 标本瓶;
- 容量瓶等。

#### 4.1.5 试验条件

试验温度为  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 70%~90%,光照强度 400 lx~800 lx。

### 4.2 试验操作

#### 4.2.1 预试验

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

#### 4.2.2 正式试验

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,并设一个空白对照组,使用助溶剂的还应增设溶剂对照组,并设一组不加农药的空白对照,每个浓度组均设 3 个重复。在标本瓶中放 500 g 土(标本瓶中土壤厚度不低于 8 cm),加入农药溶液后充分拌匀(如用有机溶剂助溶时,需将有机溶剂挥发净),加适量蒸馏水调节土壤含水量,占土壤干重的 30%~35%。每个处理放入蚯蚓 10 条,用纱布扎好瓶口,将标本瓶置于 20℃±2℃、湿度 70%~90%、光照强度 400 lx~800 lx 的培养箱中。试验历时两周,于第 7 d 和第 14 d 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),及时清除死蚯蚓。根据蚯蚓 7 d 和 14 d 的死亡率,求出农药对蚯蚓的毒性  $LC_{50}$  值及 95% 置信限。

#### 4.2.3 限度试验

设置上限浓度 100 mg a. i. /kg 干土,若未见蚯蚓死亡,则无需继续进行试验。

#### 4.2.4 参比物质试验

为检验实验室的设备、条件、方法、供试生物、供试土壤的质量是否合乎要求,应设置参比物质作方法学上的可靠性检验。参比物质为分析纯氯乙酰胺。

### 4.3 数据处理

#### 4.3.1 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(7 d、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。

#### 4.3.2 寇氏法

用寇氏法可求出蚯蚓在 7 d 和 14 d 的  $LC_{50}$  值及 95% 置信限。

$LC_{50}$  的计算见式(1):

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

式中:

$X_m$  ——最高浓度的对数;

$i$  ——相邻浓度比值的对数;

$\sum P$  ——各组死亡率的总和(以小数表示)。

95% 置信限的计算见式(2):

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

标准误的计算见式(3):

$$S \log LC_{50} = i \sqrt{\frac{pq}{n}} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

$p$  ——1 个组的死亡率;

$q$  —— $1-p$ ;

$n$  ——各浓度组蚯蚓的数量。

#### 4.3.3 直线内插法

采用线性刻度坐标,绘制死亡百分率对试验物质浓度的曲线,求出 50% 死亡时的  $LC_{50}$  值。

#### 4.3.4 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。

#### 4.4 质量控制

质量控制的条件包括:

- 空白对照组死亡率不超过 10%;
- 参比物质试验中氯乙酰胺对蚯蚓 14 d  $LC_{50}$  应在 20 mg a. i./kg 干土~80 mg a. i./kg 干土之间。

### 5 试验报告

试验报告至少应包括下列内容:

- 供试物的信息,包括供试农药的通用名、化学名称、结构式、CAS 号、纯度、基本理化性质、来源等;
- 供试生物的名称、来源、大小及健康情况;
- 试验条件,包括试验温度、光照等;
- 供试土壤中的供试物浓度及试验开始后 7 d 及 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;
- 对蚯蚓的毒性等级划分参见附录 B。

附 录 A  
(资料性附录)  
人工土壤成分及配比

人工土壤成分及配比参见表 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 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ 颗粒含量大于 50%
碳酸钙	2	调节人工土壤 pH 至 6.0 $\pm$ 0.5

附 录 B  
(资料性附录)  
农药对蚯蚓毒性等级划分

按农药对蚯蚓半致死浓度  $LC_{50}$ , 将农药对蚯蚓的急性毒性分为四级, 见表 B.1。

表 B.1 农药对蚯蚓的毒性等级划分

毒性等级	$LC_{50}$ (14 d) / (mg a. i. /kg 干土)
剧毒	$LC_{50} \leq 0.1$
高毒	$0.1 < LC_{50} \leq 1.0$
中毒	$1.0 < LC_{50} \leq 10$
低毒	$LC_{50} > 10$



参 考 文 献

- [1] NY/T 1667.1—2008 农药登记管理术语 第1部分:基本术语
- [2] NY/T 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] USEPA (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.
-