



中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.16—2014

化学农药环境安全评价试验准则 第 16 部分：土壤微生物毒性试验

Test guidelines on environmental safety assessment for chemical pesticides—
Part 16: Soil microorganism 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 16 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：程燕、范继巧、王娜、韩志华、赵玉艳、王彦华、李少男、蔡道基。

化学农药环境安全评价试验准则

第 16 部分:土壤微生物毒性试验

1 范围

GB/T 31270 的本部分规定了 CO₂吸收法和氮转化法测定化学农药对土壤微生物毒性的材料、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土壤微生物毒性试验,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

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 2.2.1]

2.2

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]

2.3

制剂 formulation product

由农药原药(或母药)和助剂组成、使用状态稳定的产品。

[NY/T 1667.2—2008,定义 2.4]

2.4

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 2.1]

2.5

供试物 test substance

试验中需要测试的物质。

2.6

影响率 effect ratio

供试物对土壤微生物呼吸强度的影响程度,包括抑制率和促进率。供试物处理土壤呼吸强度低于对照土壤时,表现为抑制,供试物处理土壤呼吸强度高于对照土壤时,表现为促进。

2.7

氮转化 nitrogen transformation

微生物通过氨化和硝化作用,将含氮有机物最终降解为无机终产物硝酸盐的过程。

3 试验概述

3.1 方法概述

土壤微生物毒性试验包括 CO₂吸收法和氮转化法,根据农药登记管理法规及其他规定选择相关方法进行试验。

3.2 CO₂吸收法

在标本瓶内放置两只小烧杯,其中一只盛放土壤,另一只盛放碱液(如 NaOH 溶液),用于吸收土壤微生物呼吸所释放的 CO₂。以模拟农药常用量、10 倍常用量、100 倍常用量时土壤表层 10 cm 土壤中的农药含量设 3 种不同处理浓度,将标本瓶密闭并置于 25 °C±1 °C、黑暗条件下培养,并保持土壤含水量为最大田间持水量的 40%~60%,于试验开始后的第 1 天、第 2 天、第 4 天、第 7 天、第 11 天、第 15 天更换出密闭瓶中的碱液,测定吸收的 CO₂量。评价供试物对土壤微生物活性的影响。

3.3 氮转化法

过筛的土壤与适量有机底物混合后用供试物处理,同时设置一组不加供试物的对照。试验至少需设置 2 个测试浓度,可参考供试物田间最大施用量设置。将土壤置于黑暗、20 °C±2 °C 的条件下培养,并保持土壤含水量为最大田间持水量的 40%~60%,在培养 0 d、7 d、14 d 和 28 d 后,从处理组和对照组中取出一定量的土壤样品,用合适的溶剂浸提并测定提取液中硝酸盐的含量。比较处理组与对照组的硝酸盐形成率,计算处理组相对于对照组的百分比差异。试验至少持续 28 d,如果第 28 天处理组与对照组的差异不小于 25%,则试验需延长,最长至 100 d。

4 试验方法

4.1 材料和条件

4.1.1 供试物

农药制剂、原药或纯品。

4.1.2 试验土壤

4.1.2.1 CO₂吸收法

选用 3 种具有代表性的、理化性质各异的土壤,试验前先去除土壤中的粗大物块(如石块、植物残体等),然后过 0.85 mm 筛。

4.1.2.2 氮转化法

试验只需一种土壤,对土壤的要求参见附录 A,土壤在用于试验前要先进行处理,先去除土壤中的粗大物块(如石块、植物残体等),然后过筛,使土壤颗粒不大于 2 mm。

两种方法采用的土壤最好都为新鲜土壤,如果需要在实验室储存,则应置于 4 °C±2 °C 黑暗处保存,最长保存 3 个月(土壤的采集、贮存方法参见附录 B)。经过储存的土壤,在试验前需进行预培养

2 d~28 d。预培养期间土壤的培养条件应与试验条件一致。此外,氮转化法所用的土壤在试验前还需补充适当的有机底物,例如,苜蓿-青草-青贮谷粉(主要组成部分:紫花苜蓿 *Medicago sativa*),C/N 比在 12/1~16/1 之间。建议苜蓿粉与土壤的比率为每千克土壤(干重)用苜蓿粉 5 g。

4.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备如下:

- 搅拌器;
- 培养箱;
- 振荡器;
- 离心机;
- 滴定仪;
- 硝酸盐测定仪;
- 标本瓶及其他玻璃器皿等。

4.1.4 试验条件

4.1.4.1 CO₂吸收法

土壤样品的培养条件为 25 °C±1 °C,黑暗。试验过程中,保持土壤样品含水量在田间最大持水量的 40%~60%之间,变化范围为±5%。如有需要,可添加蒸馏水和去离子水进行调节。

4.1.4.2 氮转化法

土壤样品的培养条件为 20 °C±2 °C,黑暗。试验过程中,保持土壤样品含水量在田间最大持水量的 40%~60%之间,变化范围为±5%。如有需要,可添加蒸馏水和去离子水进行调节。

4.2 试验操作

4.2.1 CO₂吸收法

4.2.1.1 处理与对照的设置

每种土壤设 3 种不同浓度处理,以模拟农药常用量(推荐的最大用量)、10 倍量、100 倍量时土壤表层 10 cm 土壤中的农药含量(计算时假设土壤容重为 1.5 g·cm³),同时设置一组空白对照,每组至少设置 3 个重复。

4.2.1.2 受试物质的制备

水溶性供试物一般用水溶解制备,避免使用水以外的其他液体,如丙酮、三氯甲烷等有机溶剂,以防止破坏微生物菌群。对于难溶物质,可先用合适的溶剂溶解或悬浮,然后包埋石英砂(粒径:0.1 mm~0.5 mm)等惰性固体,最后等溶剂完全挥发后再将石英砂与土壤混合。为使供试物在土壤中达到一个最佳的分布状态,建议每千克干重土壤中加入砂的比例为 10 g/kg。对照组的土壤样品用等量的水或砂进行处理。混合时,应确保处理组中的供试物在土壤样品中均匀分布,同时要避免土壤压紧或结块。

4.2.1.3 土壤样品的培养

将混合后的土壤装于小烧杯中,与另一个装有标准碱液的小烧杯一起置于密闭瓶中,于 25 °C±1 °C、黑暗条件下培养。试验过程中,保持土壤样品含水量在田间最大持水量的 40%~60%之间,变化范围为±5%。如有需要,可添加蒸馏水和去离子水进行调节。

4.2.1.4 样品的采集与分析

试验开始后的第1天、第2天、第4天、第7天、第11天、第15天时更换出密闭瓶中的碱液,用滴定法间接测定吸收的CO₂量。

4.2.2 氮转化法

4.2.2.1 处理与对照的设置

试验至少需设置2个测试浓度,低浓度应至少能反映实际条件下能到达土壤的最大量(计算时假定供试物与5 cm的土壤均匀混合,且土壤容重为1.5 g·cm³),而高浓度应是低浓度的倍数。对于直接施用至土壤的农药,应将试验浓度设置为最大预测环境浓度以及5倍的该浓度。对于在1个季节中多次施入土壤的农药,其较低试验浓度应为最大施用次数与最大预测环境浓度的乘积。但是,试验浓度的上限不应超过最大单次施用量的10倍。试验同时还需设置一组空白对照,每组至少设置3个重复。

4.2.2.2 受试物质的制备

水溶性供试物一般用水溶解制备,避免使用水以外的其他液体,如丙酮、三氯甲烷等有机溶剂,以防止破坏微生物菌群。对于难溶物质,可先用合适的溶剂溶解或悬浮,然后包埋石英砂(粒径:0.1 mm~0.5 mm)等惰性固体,最后等溶剂完全挥发后再将石英砂与土壤混合。为使供试物在土壤中达到一个最佳的分布状态,建议每千克干重土壤中加入砂的比例为10 g/kg。对照组的土壤样品用等量的水或砂进行处理。混合时,应确保处理组中的供试物在土壤样品中均匀分布,同时要避免土壤压紧或结块。

4.2.2.3 土壤样品的培养

可以采用两种方式培养土壤样品:

——每一个处理组及对照组的土壤各作为一个整体样品;

——将每一个处理组及对照组的土壤分装成一系列单独且等份的子样品。

当土壤以整体形式进行培养时,每个处理组及对照组均需准备大量的土壤样品,试验过程中根据需要取样分析。每个处理组和对照组最初制备的土壤量取决于取样量、样品分析的重复次数及最大取样次数。整体培养的土壤在再次取样前应充分混合。当土壤以系列分装独立的子样品形式进行培养时,每个处理组和对照组的土壤根据需要来分装和使用。所有测试中使用的容器应具有足够的上部空间,以避免产生厌氧状态。

将样品置于20℃±2℃、黑暗条件下培养。试验过程中,保持土壤样品含水量在田间最大持水量的40%~60%之间,变化范围为±5%。如有需要,可添加蒸馏水和去离子水进行调节。

4.2.2.4 样品的采集与分析

试验至少持续28 d,如果第28天时处理组与对照组的差异不小于25%,则试验需延长,直至该差异等于或小于25%,但最长不超过100 d。在试验0 d、7 d、14 d和28 d取样分析。如需延长试验,则应在28 d后每隔14 d测定一次。每次取样时,均需测定每个处理组和对照组样品的硝酸盐含量。用合适的提取剂(如0.1 mol/L的氯化钾溶液)与土壤样品混合振荡,提取硝酸盐,建议每千克干重土壤中加入氯化钾溶液的比例是5 mL/g。为优化提取效果,容器中所装的土壤和提取剂不应超过容器体积的一半。混合物在15.7 rad/s的转速下振荡60 min。将混合物离心或过滤后取液相分析其硝酸盐含量。

4.3 数据处理

4.3.1 CO₂吸收法

记录每个平行滴定时消耗的酸的体积,求出所有平行的平均值,用统计学方法计算土壤样品释放出

的 CO₂ 量以及处理组相对于对照的影响率。

4.3.2 氮转化法

记录每个平行土壤样品形成的硝酸盐量,求出所有平行的平均值,用统计学方法计算氮转化率。形成的硝酸盐量以每天每千克干重土壤产生硝酸盐的毫克数表示,单位为 mg/(kg·d)。比较每个处理组和对照组中土壤样品的硝酸盐形成速率,并计算出处理组偏离对照组的百分率。

4.4 质量控制

质量控制条件包括:

- 各处理土壤中,供试物的加入量、供试物在土壤中的均匀度要保持一致(两种方法均适用);
- 培养期间,各标本瓶要保持密闭(适用于 CO₂ 吸收法);
- 滴定操作时,对滴定终点的判断要准确一致(适用于 CO₂ 吸收法);
- 对照组重复之间的差异应小于±15%(适用于氮转化法)。

5 试验报告

试验报告应包括以下内容:

- a) 完整的试验土壤信息(两种方法均适用)

完整的试验土壤信息包括:

 - 取样点的地理位置和背景信息;
 - 取样深度(cm);
 - 土壤理化性质(颗粒组成、pH、有机碳含量、氮含量、初始硝酸盐浓度、阳离子交换量、微生物生物量等);
 - 土壤采集和保存情况;
 - 土壤预培养的细节。
- b) 供试物信息(两种方法均适用)

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。
- c) 底物(适用于氮转化法)

底物信息包括:

 - 来源;
 - 组成;
 - 碳、氮含量。
- d) 试验条件

试验条件包括:

 - 试验设置浓度及组数;
 - 向土壤中施入供试物的详细步骤;
 - 培养温度;
 - 稀释水;
 - 试验期间各处理土壤中加水的频率和方法;
 - 试验开始时和试验过程中的土壤湿度;
 - 土壤的培养方式;
 - 取样次数;
 - 土壤 CO₂ 释放量测定方法(适用于 CO₂ 吸收法);

- 从土壤中浸提硝酸盐的方法(适用于氮转化法);
- 用于分析测定硝酸盐含量的方法和仪器(适用于氮转化法)。

e) 结果

结果包括:

- 数据分析方法、土壤 CO₂ 释放量随时间变化的曲线图、农药对土壤微生物呼吸强度的影响率(适用于 CO₂ 吸收法);
- 各组各平行的硝酸盐含量,处理组和对照组之间的差异(适用于氮转化法);
- 有助于解释结果的全部信息和观察资料;
- 对土壤微生物的毒性等级划分参见附录 C。

附录 A
(资料性附录)
氮转化法对土壤的要求

氮转化法对土壤的要求参见表 A.1。

表 A.1 氮转化法试验土壤应具备的特征

要素	特征值
砂粒含量	50%~75%
pH	5.5~7.5
有机碳含量	0.5%~1.5%
微生物生物量	碳含量 \geq 土壤总有机碳含量的 1%

附录 B

(资料性附录)

试验土壤的采集与贮存

B.1 土壤的采集

选择的土壤采集点应能长期使用,需了解土壤采集点的详细背景信息,包括:地点,植被覆盖情况,农药、肥料等的施用情况。要求采样地点在采样前至少一年内未施用过农药,至少6个月内未施用过有机肥。如果在必需的情况下施用了无机肥,则应在施肥至少3个月后才能采集土壤。

应避免在长时间干旱或水涝期间(超过30 d)采样,或在此期后立即采样。在耕地,采样的深度为0 cm~20 cm;在长期没有耕作(至少一个生长季节)的草场牧地或其他类型的土壤中采样时,最大深度可略超过20 cm。

运输土壤样品时应使用合适的容器,并保持适宜的温度以确保土壤的性质不会发生显著的改变。

B.2 土壤的贮存

土壤风干后应置于 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 黑暗处保存,最长可保存3个月。土壤在储存期间应保持有氧条件。如果采样地区每年至少有3个月冰冻期,则采集的土壤可在 $-22^{\circ}\text{C}\sim -18^{\circ}\text{C}$ 条件下储存6个月。用于氮转化试验的土壤,在每次试验前应测定土壤微生物的生物量,其碳含量应至少占土壤有机碳含量的1%。

附 录 C
(资料性附录)

农药对土壤微生物毒性的毒性等级划分

C.1 CO₂吸收法

CO₂吸收法中,农药对土壤微生物的毒性分成三个等级:土壤中农药加量为常量,在15 d内对土壤微生物呼吸强度抑制达50%则划分为高毒;土壤中农药加量为常量10倍,能达到上述抑制水平的,划分为中毒;土壤中农药加量为常量100倍,能达到上述抑制水平的,划分为低毒;若三种处理均达不到上述抑制水平,则同样划分为低毒。

C.2 氮转化法

在试验28 d后的任何时间所取样品,若测定其低浓度处理组和对照组的硝酸盐形成速率的差异不大于25%,则可认为该农药对土壤中的氮转化没有长期影响。

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] OECD(2000).Guideline 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- [4] 蔡道基.农药环境毒理学研究.北京:中国环境科学出版社,1999.
-