

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—2015

化学农药 家蚕慢性毒性试验准则

Chemical pesticide—Guideline for Silkworm chronic 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。

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。

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。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位：农业部农药检定所、山东农业大学

本标准主要起草人：

化学农药 家蚕慢性毒性试验准则

1 范围

本标准规定了化学农药对家蚕慢性毒性试验的材料、条件、操作、质量控制、数据处理、试验报告等的基本要求。

本标准适用于为化学农药登记而进行的家蚕慢性毒性试验，其他类型的农药可参照使用。

本标准不适用于易挥发、在常用有机溶剂和水中难溶解的化学农药。

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/T 1797-2008 生丝

GB/T 31270.11-2014 化学农药环境安全评价试验准则 第 11 部分：家蚕急性毒性试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

半致死浓度 median lethal concentration

在急性饲喂毒性试验中，引起 50% 供试生物死亡时桑叶中的供试物浓度，用 LC_{50} 表示。

注：单位为 mg a. i./kg 桑叶。

3.2

最低可见效应浓度 lowest observed effect concentration

在一定暴露期内，与对照相比，对家蚕产生显著影响 ($p < 0.05$) 的最低供试物浓度，用 $LOEC$ 表示。高于 $LOEC$ 的所有试验浓度都应能观察到与在 $LOEC$ 相同或更严重的毒性影响，否则应就所选 $LOEC$ 进行说明。

注：单位为 mg a. i./kg 桑叶。

3.3

无可见效应浓度 no-observed effect concentration

在一定暴露期内，与对照组相比对家蚕无明显影响的供试物浓度，即仅低于 $LOEC$ 的供试物浓度，用 $NOEC$ 表示。

注：单位为 mg a. i./kg 桑叶。

3.4

供试物 test substance

试验中需要测试的物质。

3.5

结茧率 percentage of cocooning

结茧家蚕数占饲养家蚕总数的百分率（结茧以形成茧层为准，只吐浮丝或结平板茧个体不作结茧蚕统计）。

3.6

茧层量 cocoon shell weight

指家蚕所结茧的重量。

3.7

全茧量 total cocoon weight

茧层量与蛹重的总和。

3.8

茧层率 percentage of cocoon shell

茧层量占全茧量的百分率。

3.9

化蛹率 percentage of pupation

化蛹家蚕数占结茧家蚕数的百分率。

3.10

死笼率 percentage of dead worm cocoon

死笼茧占结茧总数的百分率，凡茧内的死蚕、死蛹、病蚕、病蛹、半蜕皮蛹（包住胸部或尾部 2 个以上环节）、不蜕皮蛹、尾部 3 个环节呈黑色的蛹和虽然健康但未化蛹的毛脚蚕，均记为死笼茧。

4 试验概述

将不同浓度的药液喷于桑叶上以供蚕食用。以二龄起蚕饲喂处理桑叶，48h 后转至干净培养装置中并饲喂无毒桑叶至熟蚕期，测定和观察农药对家蚕产茧量及部分生物学指标的影响，并确定对家蚕茧层量和生丝品质影响的无可见效应浓度（*NOEC*）和最低可见效应浓度（*LOEC*）。

5 试验方法

5.1 材料和条件

5.1.1 供试生物

试验用家蚕(*Bombyx mori*)品系采用春蕾×镇珠、菁松×皓月、秋丰×白玉,或其他有代表性的品系。以二龄起蚕为供试生物。

5.1.2 供试物

农药原药或制剂。难溶于水的可用少量对家蚕毒性小的有机溶剂、乳化剂或分散剂等助溶,助溶剂用量不应超过 0.1 mL (g) /L。

5.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备如下:

- 喷雾塔(需喷雾均匀,可定量计算);
- 人工气候室;
- 通风式昆虫毒性试验培养装置;
- 通风泵;
- 电子天平;
- 移液器等。

5.1.4 试验条件

1-2 龄家蚕的饲养温度为 26℃-28℃,随着龄期的增长,每一龄期的最适温度范围降低 1℃,直到上蔕结茧。家蚕饲养的相对湿度为:1-2 龄小蚕 80%~85%,大龄蚕湿度降低,但不应低于 70%。簇中温度 24℃,湿度 75%。光照周期为 16 h :8 h(光照:黑暗),光强不超过 3000lux。

5.2 试验操作

5.2.1 预试验

按正式试验的条件,以较大的间距设置 4~5 个浓度组,通过预试验求出供试物对家蚕茧层量与对照有显著差异的最低浓度和茧层量与对照无显著差异的最高浓度。处理组浓度设置可参照家蚕急性毒性试验得出的 LC_{50} 值进行设置,如 $1/40 LC_{50}$ 、 $1/10 LC_{50}$ 、 $1/5 LC_{50}$ 、 $1/2 LC_{50}$ 等。

可按照 GB/T 31270.11-2014《化学农药环境安全性试验准则》第 11 部分的家蚕急性毒性中规定的试验方法获得 LC_{50} 值(单位为 mg a. i./L),也可按照附录 A 中规定的方法获得 LC_{50} 值(单位为 mg a. i./kg 桑叶)。当使用按照 GB/T 31270.11-2014 方法得出的 LC_{50} (单位为 mg a. i./L) 时,须用桑叶浸渍修正系数对 LC_{50} 进行修正后,方可用于本标准中试验浓度设定。修正系数默认值为 0.46 L/kg 桑叶。

5.2.2 正式试验

5.2.2.1 浓度组设置

根据预试验确定的浓度范围按一定比例间距(几何级差应控制在 2.2 以内)设置 5 个~7 个浓度组,并设空白对照,供试物使用溶剂助溶时,还需设溶剂对照。对照组和每浓度处理组均设 3 个重复,每重复 20 头二龄起蚕。

5.2.2.2 染毒

采用饲喂毒叶法染毒，即试验开始前选取桑树顶端新鲜有光泽的嫩叶，同次试验选取桑叶的大小和重量应尽量接近，每片叶重范围为2.0g~3.0g。在实验室采用喷雾塔将试验药液喷于桑叶的背面。喷药前用万分之一的电子天平分别称量桑叶的重量，喷药后立即再次称量桑叶重量，以测定每片桑叶上喷施供试物的准确量。随后，风干5~10min。在转入培养装置前将每片叶子的叶柄插入灌满琼脂的离心管中以减缓叶片萎蔫速度。

喷药及桑叶处理程序完成后，选择健康、大小一致的二龄起蚕，随机小心移入培养装置中的桑叶上。取食染毒桑叶48h后，将其转移至干净培养装置中并饲喂无毒桑叶至熟蚕期。待家蚕发育成熟后，及时捉蚕上蔕，整个试验饲养至结茧、化蛹为止。

5.2.2.3 观察与记录

试验过程中，观察并记录家蚕各龄期的发育历期、眠蚕体重及其他家蚕异常行为。上蔕后第8天采茧剖茧测定全茧量，茧层量、蛹重，并按照GB/T 1797-2008《生丝》检验生丝品质，统计良蛹数量，计算茧层率、死笼率和化蛹率。

5.3 数据处理

以茧层量和生丝品质为主要评价指标，采用方差分析对各个浓度处理组与对照组间的差异进行显著性分析，最终获得供试物对家蚕茧层量和生丝品质影响的 *NOEC* 和 *LOEC*，并获得供试物对家蚕的发育历期、眠蚕体重、蛹重、茧层率、结茧率、化蛹率、死笼率等生物学指标影响情况。

5.4 质量控制

质量控制条件包括：

——试验结束时，对照组死亡率不超过 10%；

——试验中所设置的浓度中应至少包括与对照组有显著差异和无显著差异的浓度各 1 个。

6 试验报告

试验报告应包括下列内容：

——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。

——供试生物名称、来源、大小及饲养情况；

——试验条件，包括：试验温度、试验方法等；

——试验浓度，对茧层量和生丝品质影响的 *NOEC*、*LOEC*，并给出所采用的统计分析方法；

——对照组家蚕是否出现死亡及异常反应；

——观察到的供试物对家蚕慢性毒性效应，如受试家蚕的发育历期缩短或延长、结茧率是否

降低等。

附录 A

（资料性附录）

农药家蚕急性毒性试验——喷雾法

1 预试验

按正式试验的条件，以较大的间距设置4个~5个浓度组，通过预试验求出供试物对家蚕的最高全存活浓度和最低全致死浓度。

2 正式试验

根据预试验确定的浓度范围按一定比例间距（几何级差应控制在2.2以内）设置5个~7个浓度组，并设空白对照，供试物使用溶剂助溶时，还需设溶剂对照。对照组和每浓度处理组均设3个重复，每个重复20头二龄起蚕。

染毒方法采用饲喂毒叶法，即试验开始前选取桑树顶端新鲜有光泽的嫩叶，同次试验选取的桑叶的大小和重量应尽量接近，每片叶子约在2.0~3.0g。采用实验室喷雾塔将试验药液喷于桑叶的背面。喷药前用万分之一电子天平分别称量桑叶的重量，喷药后立即再次称量桑叶重量，以测定每片桑叶上喷施供试物的准确量。随后，风干5~10min。在转入培养装置前将每片叶子的叶柄插入灌满琼脂的离心管（1.5 mL）中以减缓叶片萎蔫速度。

喷药及桑叶处理程序完成后，选择健康、大小一致的二龄起蚕，随机地小心移入培养装置中的桑叶上。

3 症状观察与数据记录

于药剂处理后24h、48h、72h和96h观察并记录家蚕中毒症状及死亡数。

4 数据处理

计算供试物对家蚕24h、48h、72h 和96h的 LC_{50} （mg a.i./kg_{桑叶}）及其95%置信限。

参 考 文 献

- [1] Xingyou Sun, Harold Van Der Valk, Hui Jing, Xiaojun Wang, Shankui Yua, Yan Zhang, Ivo Roessink, Xiwu Gao, Development of a standard acute dietary toxicity test for the silkworm(*Bombyx mori* L.)*Crop Protection* 42(2012)260-267.
 - [2] 蔡道基主编. 农药环境毒理学研究. 中国环境科学出版社. 1999.
 - [3] 华德公主编. 山东蚕桑. 中国农业出版社. 2002.
 - [4] 张香萍主编. 栽桑养蚕新技术. 中原农民出版社. 2008.
 - [5] NY/T 1154.9—2008 《农药室内生物测定试验准则》 杀虫剂 第9部分 喷雾法
-