

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ □□□□-202□

水质 急性毒性的测定 斑马鱼法

Water quality—Determination of the acute toxicity—Zebrafish (*Danio rerio*) method

(征求意见稿)

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言	ii
1 适用范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	2
5 干扰和消除	2
6 试剂和材料	3
7 仪器和设备	4
8 样品采集、保存及处理	5
9 测试步骤	6
10 结果计算与表示	9
11 有效性、敏感性及其精密度	9
12 质量保证和质量控制	10
13 测试报告	10
附录 A（资料性附录）斑马鱼全长测量	11
附录 B（规范性附录）稀释用水水质参数及浓度限值	12
附录 C（资料性附录）重铬酸钾对受试生物（斑马鱼， <i>Danio rerio</i> ）的急性毒性测试	13
附录 D（资料性附录）寇氏（Karber）法计算 LC_{50} 示例	15
附录 E（资料性附录）废水对斑马鱼（ <i>Danio rerio</i> ）急性毒性的 LID 测定示例	18

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》《中华人民共和国长江保护法》和《中华人民共和国黄河保护法》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规定水质斑马鱼急性毒性的测定方法，制定本标准。

本标准规定了地表水、地下水、生活污水与工业废水对斑马鱼急性毒性的测定方法。

本标准的附录 A、附录 C～附录 E 为资料性附录，附录 B 为规范性附录。

本标准与《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》（GB/T 13267-91）相比，主要差异如下：

- 名称修改为《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》；
- 修改了方法适用范围、方法原理；
- 增加了术语定义部分；
- 完善了标准稀释水和其他稀释用水的要求；
- 增加了样品采集、保存和前处理方法；
- 增加了针对性的水质生物毒性测定 LID 法；
- 细化了样品测定和结果表示等内容；
- 增加了质量保证和质量控制等条款。

自本标准实施之日起，原国家环境保护局 1991 年 9 月 14 日批准发布的《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》（GB/T 13267-91）在相应的环境质量标准和污染物排放（控制）标准实施中停止执行。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位为生态环境部南京环境科学研究所、中国环境科学研究院、南京大学。

本标准验证单位：中国环境监测总站、沈阳沈化院测试技术有限公司、中国科学院广东微生物研究所、浙江省生态环境监测中心、贵州健安德科技有限公司、江苏省常州环境监测中心。

本标准生态环境部 202□年□□月□□日批准。

本标准自 202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 急性毒性的测定 斑马鱼法

警告：测试中使用的部分试剂、参考物质及废水样品可能具有较高的毒性，测试操作时应佩戴防护器具，避免吸入呼吸道或接触皮肤和衣物。

1 适用范围

本标准规定了测定水质急性毒性的斑马鱼法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水的鱼类（斑马鱼）急性毒性最低无效应稀释倍数（LID）和半数致死浓度（LC₅₀）的测定。

本标准不适用于海水的测定。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。其他文件被新文件废止、修改、修订的，新文件适用于本标准。

GB 13195 水质 水温的测定 温度计或颠倒温度计测定法

GB/T 13580.3 大气降水电导率的测定方法

GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境监测技术规范

HJ 164 地下水环境监测技术规范

HJ 493 水质 样品的保存和管理技术规定

HJ 501 水质 总有机碳的测定 燃烧氧化—非分散红外吸收法

HJ 506 水质 溶解氧的测定 电化学探头法

HJ 828 水质 化学需氧量的测定 重铬酸盐法

HJ 1019 地块土壤和地下水中 挥发性有机物采样技术导则

HJ 1147 水质 pH值的测定 电极法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

试样 test solution

样品经稀释水稀释配成的可供测试的溶液。

注：样品直接用于测试时，试样即为样品。

3.2

稀释倍数 dilution level (D)

试样中样品的体积分数的倒数。

注：例如，样品未稀释，则稀释倍数 $D=1$ ；1000 ml 试样中有 250 ml 样品（体积分数为 25%），则稀释倍数 $D=4$ 。

3.3

最低无效应稀释倍数 lowest ineffective dilution (LID)

在规定条件的测试周期内，不会导致受试生物产生抑制或死亡等可见不良效应的最低稀释倍数。

注：本标准 LID 为至少 90% 受试生物存活的最低稀释倍数。

3.4

半致死浓度 median lethal concentration (LC_{50})

在规定条件的测试周期内，导致 50% 受试生物死亡的试样浓度。

注：本标准试样浓度指试样中样品的体积分数（%）。

3.5

静态法 static test

测试周期内，不更换试样的测试方式。

3.6

半静态法 semi-static renewal test

测试周期内，为保证一定的暴露浓度而有计划定期更换试样的测试方式。

3.7

参比（毒）物 reference toxicants; reference materials

为判断测试系统有效性而使用的化学物质。可用于不同实验室之间，同一实验室内不同时间或不同人员之间测定结果的可比性评价。

注：本标准简称参比物，选用重铬酸钾为参比物。

4 方法原理

在规定的测试条件下，将受试生物（斑马鱼，*Danio rerio*）置于不同稀释倍数的试样中，在 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下暴露 96 h，根据受试生物的存活数量或死亡数量计算 LID 值或 LC_{50} ，以表征样品的急性毒性。

5 干扰和消除

样品不作预处理，以测定其对受试生物的综合毒性。但当仅考虑化学性致死时，可通过静置消除样品中悬浮颗粒物堵塞鱼鳃导致的物理性干扰，静置时间 $\leq 2\text{ h}$ 。

6 试剂和材料

6.1 受试生物

6.1.1 符合 GB/T 39649 种质鉴定要求的斑马鱼 (*Danio rerio*)，处于性成熟前期，体长 1 cm~2 cm。

6.1.2 测试前，受试生物应至少在测试实验室饲养 9 d，其中前 2 d 适应期，后至少 7 d 驯养期，及时挑出生长不正常的鱼或死亡鱼。饲养/驯养用水要求见 6.2.15，饲养环境条件如下：

- a) 水温：22 °C~24 °C；
- b) pH 值：6.0~8.5；
- c) 水质硬度：40 mg/L~250 mg/L（以 CaCO₃ 计）；
- d) 光暗比：16 h : 8 h~12 h : 12 h；
- e) 光照度：540 lx~1000 lx；
- f) 溶解氧：≥7.1 mg/L（溶解氧饱和度≥80%）；
- g) 喂食：每天饲喂 2 次丰年虫幼虫活体，投喂量以 5 min~10 min 吃完为宜，直到测试前 24 h。

6.1.3 测试前 7 d，观测并记录死亡率，并按下列标准处理：

- a) 7 d 内死亡率>10%，该批鱼不能使用；
- b) 7 d 内死亡率在 5%~10%之间，继续驯养 7 d；
- c) 7 d 内死亡率<5%，可用于测试。

6.1.4 测试前，随机抽取同一批次的 10 尾鱼测量湿重和体长（全长）。将抽取的每尾鱼分别放入装有饲养水的预称重小烧杯中称量，通过差减法确定受试生物的体重及平均体重；利用游标卡尺（7.6）测量吻尖到尾鳍末端的直线长度，全长测量方法见附录 A。

注：用于测量湿重和体长的鱼不纳入测试。

6.2 试剂

除非另有说明，测试时均使用符合国家标准的分析纯试剂，贮备液配制用水为纯水（电导率 $\kappa \leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$ ）。

6.2.1 氢氧化钠（NaOH）。

6.2.2 氯化钙（CaCl₂·2H₂O）。

6.2.3 硫酸镁（MgSO₄·7H₂O）。

6.2.4 碳酸氢钠（NaHCO₃）。

6.2.5 氯化钾（KCl）。

6.2.6 重铬酸钾（K₂Cr₂O₇）。

6.2.7 浓盐酸： $\rho=1.19 \text{ g/ml}$ ， $w=37\%$ 。

6.2.8 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ 。

量取 8.3 ml 盐酸（6.2.7），用水定容至 1000 ml。

6.2.9 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=0.1 \text{ mol/L}$ 。

称取 4 g 氢氧化钠（6.2.1），溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

6.2.10 氯化钙储备液： $\rho(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=11.76 \text{ g/L}$ 。

称取11.76 g氯化钙（6.2.2），溶于少量水中，用水定容至1000 ml。室温条件下可保存6个月。

6.2.11 硫酸镁储备液： $\rho(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})=4.93 \text{ g/L}$ 。

称取4.93 g硫酸镁（6.2.3），溶于少量水中，用水定容至1000 ml。室温条件下可保存6个月。

6.2.12 碳酸氢钠储备液： $\rho(\text{NaHCO}_3)=2.59 \text{ g/L}$ 。

称取2.59 g碳酸氢钠（6.2.4），溶于少量水中，用水定容至1000 ml。室温条件下可保存6个月。

6.2.13 氯化钾储备液： $\rho(\text{KCl})=0.23 \text{ g/L}$ 。

称取 0.23 g 氯化钾（6），溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。室温条件下可保存 6 个月。

6.2.14 标准稀释水

a) 以 1 L 计，将氯化钙储备液（6.2.10）、硫酸镁储备液（6.2.11）、碳酸氢钠储备液（6.2.12）和氯化钾储备液（6.2.13）四种储备液各 25 ml 混合，用水定容至 1000 ml。

b) 新配制的稀释水曝气至溶解氧浓度不低于 7.71 mg/L（溶解氧饱和度不低于 90%），必要时，用氢氧化钠溶液（6.2.9）或盐酸溶液（6.2.8）调节 pH 值，pH 值应保持在 7.8 ± 0.2 范围内，临用现配。

6.2.15 其他稀释水

在驯养和测试过程中鱼类没有表现出胁迫迹象的水也可作为稀释水，如脱氯过滤的自来水。稀释水的pH值应在6.0~8.5之间，水质硬度在40 mg/L~250 mg/L（以 CaCO_3 计）之间。应对稀释水中的污染物进行检测，污染物限量要求见附录B。

6.2.16 高纯空气：成分比例与自然空气相近，总烃含量 $<0.5 \text{ ppm}$ 。

7 仪器和设备

7.1 采水器：不锈钢材质。

7.2 筛网：不锈钢材质，孔径 2 mm~4 mm（12 目~5 目）。

7.3 采样瓶/袋：聚乙烯（或聚丙烯、聚四氟乙烯）塑料瓶/袋，容积 $\geq 5 \text{ L}$ 。

7.4 冷藏箱：可移动，具有 6 °C 及以下冷藏功能。

7.5 冰箱或冷库：具有 6 °C 及以下冷藏功能和-18 °C 及以下冷冻功能。

7.6 游标卡尺：测量范围 0~500 mm，最小分度为 0.1 mm。

7.7 天平：实际分度值 0.1 mg。

7.8 温度计：测量范围 0 °C~40 °C，最小分度为 0.1 °C。

7.9 pH 计：测量范围 0~14，最小分度为 0.1 pH 单位。

7.10 硬度计：测量范围 50 mg/L~500 mg/L（以 CaCO_3 计），最小分度为 1 mg/L。

7.11 便携式溶解氧测定仪：测量范围 0 mg/L~20 mg/L，最小分度为 0.1 mg/L。

7.12 电导率测定仪：测量范围 0 mS/cm~200 mS/cm，最小分度为 1 $\mu\text{S/cm}$ 。

7.13 恒温水浴槽或恒温光照培养箱：温控范围 15 °C~30 °C，温度控制偏差 $\leq 0.5 \text{ °C}$ 。

- 7.14 照度计：测量范围 200 lx~2000 lx，最小分度为 1 lx。
- 7.15 测试容器：玻璃容器（如玻璃烧杯），1 L~5 L；若样品有异味或疑似具有挥发性污染物时，应采用加盖的玻璃容器。
- 7.16 计泡器
- 7.17 总有机碳（TOC）分析仪。
- 7.18 实验室常用玻璃器皿：移液管、烧杯、容量瓶、量筒等。

8 样品采集、保存及处理

8.1 样品的采集

8.1.1 地表水、地下水、生活污水和工业废水样品的采样频次、采样时间以及采样位置分别按照 HJ 91.2、HJ 164、HJ 1019、HJ 91.1 相关章节执行。其中，地表水和地下水一般采集瞬时样品。生活污水和工业废水根据水质的稳定性，采集瞬时样品或者混合样品。连续排放的生活污水和工业废水采集混合样品时，每 6 h 采集 1 份样品，24 h 内采集 4 份等体积的样品混合为 1 个样品。间歇排放的生活污水和工业废水采集混合样品时，生产周期在 8 h 以内的，采样时间间隔应 ≥ 2 h；生产周期 > 8 h，采样时间间隔应 ≥ 4 h，每个生产周期内采样频次 ≥ 3 次；可将 24 h 内或 1 个生产周期内采集的样品等体积混合为 1 个样品。采集的样品混合前应及时于 6℃及以下避光保存。

8.1.2 用采水器（7.1）采集样品后，若样品中有较大的悬浮物或漂浮物，可使用孔径 2 mm~4 mm（12 目~5 目）的筛网（7.2）去除。样品沿采样瓶（7.3）内壁缓慢倒入，注意避免冲击产生气泡；样品应在样品瓶中过量溢出，形成凸面，拧紧瓶盖，颠倒样品瓶，观察数秒，确保瓶内无气泡，如有气泡应重新采样。

8.1.3 宜采集不少于 10 L 的样品。宜在采样时测定 pH、溶解氧、电导率等水质参数。

8.2 样品的运输与保存

8.2.1 样品采集后，应立即置于冷藏箱（7.4）中，在 6℃及以下冷藏避光运输和保存，并在 24 h 以内开展测试；若不能在 24 h 内进行测试，所采样品运送回实验室后应立即置于冰箱或冷库（7.5）中，在-18℃及以下冷冻保存，保存前将样品充分混匀，每 2.5 L 容器分装 2 L 样品，保存期不超过 60 d。

8.2.2 样品到实验室后，混合均匀，采用 TOC 分析仪（7.17）测定 TOC 或采用滴定法测定化学需氧量（COD），以便后续质量控制，判断水质是否发生变化。

8.3 样品预处理

8.3.1 温度

冷冻保存的样品应在 ≤ 24 ℃条件下水浴解冻。测试开始前，将样品放置于 22℃~24℃条件下，待温度达到 22℃~24℃后用于测试。

8.3.2 pH 值

8.3.2.1 通常不调节样品 pH 值。

8.3.2.2 若需排除 pH 的影响，当样品的 pH>8.5 或<6.0 时，可使用盐酸溶液（6.2.8）或氢氧化钠溶液（6.2.9）调节样品 pH 值至 7.0，酸碱调节溶液的使用量应≤样品体积的 5%，以降低对样品浓度的影响。

8.3.3 溶解氧

8.3.3.1 通常不调节样品溶解氧浓度。

8.3.3.2 若需排除溶解氧的影响，当样品的溶解氧浓度<4 mg/L 时，可采用曝气的方式充氧≤20 min，使样品溶解氧含量小于溶解氧饱和度。如果样品含有挥发性污染物，宜采用 9.1.4 方式充氧。

9 测试步骤

9.1 测试环境条件

9.1.1 光照

光照强度应在 540 lx~1000 lx 之间，光照周期光暗比为 16 h : 8 h~12 h : 12 h 之间。

9.1.2 温度

测试过程中试样温度应保持在 23 °C ± 1 °C 之间。

9.1.3 pH 值

测试过程中不调节 pH。排除 pH 影响的急性毒性，试样 pH 值应在 6.0~8.5 之间。

9.1.4 溶解氧

排除溶解氧影响的急性毒性，测试过程中溶解氧浓度宜≥4 mg/L（溶解氧饱和度≥46.7%）。可采用高纯空气适度充氧，以计泡器（7.1.16）计的充氧速度≤100 个泡/min，以维持测试所需的溶氧浓度，并确保其对试样中挥发性污染物的影响降至最低。

9.1.5 生物承载量

单位水体生物承载量≤0.8 g/L（以湿重计，如鱼的平均体重为 0.08 g，则每 1 L 试样中不超过 10 尾鱼）。

9.1.6 饲喂

测试过程中不投喂饵料。

9.1.7 试样的稳定性

9.1.7.1 测定 96 h LC₅₀ 时，测试周期内试样的 COD 或 TOC 变化≤20%，可采用不换水的

静态法测试；否则，应采用半静态法测试。

9.1.7.2 采用半静态法测试时，换水周期 t （一般以 h 计）根据试样维持稳定的最长时间确定。换水方法如下：准备相同规格的 AB 两组测试容器（7.15），在第一个换水周期，将新配制的试样加入 A 组测试容器，试样体积应符合生物承载量（9.1.5）要求，A 组全部容器完成加入受试生物的时刻为 t_0 。在 t_0+t 前 1 h，将新配制的试样加入 B 组测试容器，试样浓度、体积及容器编号与 A 组一致。用捞网小心的将受试生物从 A 组测试容器中捞取到对应浓度和容器编号的 B 组测试容器中，B 组全部容器加入受试生物的时刻为 t_0+t ，误差宜不超过 30 min。移除受试生物的测试容器应及时清洗，若有后续换水周期，AB 两组测试容器将交替使用。

9.2 LID 测试

采用逐级稀释法，将两个等比级数（ $D=2、4、8、16、32$ 等，以及 $D=1.5、3、6、12、24$ 等）组合在一起。取一定量的样品加入稀释水（6.2.14 或 6.2.15），配制 1.5 倍和 2 倍的试样，然后逐级稀释，每个浓度组投放 10 尾受试生物。根据试样的稳定性采用静态法或者半静态法，测试环境条件见 9.1，测试周期为 96 h，不设平行。样品的稀释系列参照表 1。

表 1 样品的稀释系列（以 1 L 试样计）

稀释倍数 D	$V_{\text{样品}}/V_{\text{试样}} (\%)$	试样的组成 (ml)	
		样品	稀释水
空白	0	—	1000
1	100	1000	—
1.5	66.7	667	333
2	50.0	500	500
3	33.3	333	667
4	25.0	250	750
6	16.7	167	833
8	12.5	125	875
12	8.3	83	917
16	6.2	62	938
24	4.2	42	958
32	3.1	31	969
.....			

9.3 LC₅₀ 测试

9.3.1 预试验

9.3.1.1 宜通过静态法预试验确定正式试验的浓度范围。以逐级稀释倍数（即等比数列的公比）为 10 选择 3 个连续浓度的试样，每一浓度投放 5 尾受试生物，不设平行，测试环境条件见 9.1，测试周期为 96 h，以确定受试生物死亡率 100%（或最大死亡率）~0%所对应的试样浓度范围（体积分数）。

9.3.1.2 同时设置一个不加受试生物的最高试样浓度的平行处理，分别于 0 h、24 h、48 h 以及 96 h 测定 COD 或 TOC，以确定试样稳定性。如果 96 h 内 COD 或 TOC 的变化 $\leq 20\%$ ，则正式试验或限度试验采用不换水的静态法。否则，宜采用半静态法。

9.3.2 限度试验

如果预试验结果显示样品暴露未致受试生物死亡，设置样品 1 个浓度组开展限度试验，投放 10 尾受试生物，不设平行，测试环境条件见 9.1，测试周期为 96 h。若测试结束时受试生物死亡率 $\leq 10\%$ ，测试停止。若测试期间观测到受试生物死亡率 $> 10\%$ ，应进一步开展正式试验。

9.3.3 正式试验

根据预试验结果确定的受试生物死亡率 100%（或最大死亡率） $\sim 0\%$ 对应的试样浓度范围，在此范围内按一定逐级稀释倍数（一般 ≤ 2 ）稀释，应至少选择 5 个等比系列浓度的试样进行正式试验。系列浓度中，宜包括受试生物死亡率 $\leq 37\%$ 和 $\geq 63\%$ 的 2 个浓度组。正式试验每个浓度组投放 10 尾受试生物，不设平行，测试环境条件见 9.1，测试周期为 96 h。

9.4 对照试验

9.4.1 空白试验（阴性对照）

- a) 空白试验以稀释水（6.2.14 或 6.2.15）为试样开展。
- b) LID 法以及 LC_{50} 法均应同步开展空白试验。
- c) 空白试验不设平行，投放的受试生物数量与浓度组保持一致。

9.4.2 参比物试验（阳性对照）

采用重铬酸钾（6.2.6）为参比物，每批次受试生物应至少开展一次参比物试验，以确认受试生物的敏感性。试验方法参见附录 C。

9.5 观测和记录

9.5.1 环境条件测定和记录

9.5.1.1 测试开始 0 h 及 96 h，用照度计（7.14）测定并记录试验容器（7.15）液面相同高度的光照强度。

9.5.1.2 测试开始 0 h、24 h、48 h、72 h 及 96 h，用温度计（7.8）、pH 计（7.9）和溶解氧测定仪（7.11）测量并记录阴性对照和各浓度组的温度、pH 值和溶解氧浓度。对于半静态测试，应在换水前后分别测定试样的水质参数。

9.5.2 受试生物观测和记录

9.5.2.1 测试开始 0 h、24 h、48 h、72 h 及 96 h，观测并记录每个容器中受试生物的死亡情况和中毒症状（如侧翻、浮在水面、异常打转或盘旋等），出现死亡受试生物时应及时清理。

9.5.2.2 测试结束时，将存活受试生物时置于冰水混合物液（冰的体积不少于 50%）中 30

min 以上进行灭活处理。

10 结果计算与表示

10.1 LID 的确定

至少有 90%受试生物正常存活时的最低稀释倍数，即为最低无效应稀释倍数 LID。LID 的确定示例见附录 E。

10.2 LC₅₀ 的估算

10.2.1 LC₅₀ 可参照附录 D 方法计算，也可采用概率单位法、直线内插法等其他方法计算，结果保留至小数点后 1 位。

10.2.2 如果数据不充分，无法计算 LC₅₀ 或不需要计算 LC₅₀ 时，应报告最大死亡率对应的最低浓度和无死亡的最高浓度（以稀释百分比浓度表示）。

11 有效性、敏感性及精密度

11.1 有效性及敏感性

11.1.1 6 家实验室分别测定阴性对照（9.4.1），重复 6 次，死亡率均为 0%，满足 ≤10% 的要求。

11.1.2 6 家实验室分别测定参比物重铬酸钾的鱼类急性毒性，24 h LC₅₀ 测试结果在 250 mg/L~304 mg/L 之间，均在 200 mg/L~400 mg/L 范围内，符合质控要求。

11.2 精密度

11.2.1 6 家实验室分别对生活污水、地表水、地下水，进行了斑马鱼急性毒性的测定，每个样品测定 6 次。LID 均为 1，96 h LC₅₀ 均大于 100%。各浓度组斑马鱼存活率实验室内相对标准偏差分别为 0.0%、0.0%、0.0%，实验室间相对标准偏差分别为 0.0%、0.0%、0.0%，重复性限为 0.0%、0.0%、0.0%，再现性限为 0.0%、0.0%、0.0%。

11.2.2 6 家实验室对工业废水（农药废水）进行了斑马鱼急性毒性的测定，分别测定 6 次。LID 值为 3~4，96 h LC₅₀ 为 41.2%~61.1%。当稀释倍数（D）为 1、2、3、4、5 时，各浓度组斑马鱼存活率实验室内相对标准偏差分别为 0.0%、10.8%~15.5%、5.57~9.57%、0.0%、0.0%，实验室间相对标准偏差分别为 0.0%、8.95%、6.36%、0%、0%，重复性限为 0.0%、16.5%、19.6%、0.0%、0.0%，再现性限为 0.0%、19.1%、23.7%、0.0%、0.0%。

11.2.3 6 家实验室对加标浓度分别为 200 mg/L、800 mg/L 以及 3200 mg/L 的重铬酸钾溶液，作为模拟样品分别进行了 6 次 96 h 最低无效应稀释倍数 LID 的测定，LID 值分别为 2~3、8~10、32~48，实验室内相对标准偏差为 0%~18.8%、0%~9.79%、0%~22.1%，实验室间相对标准偏差为 4.37%、1.64%和 6.44%。

11.3 正确度

6家实验室对加标浓度分别为 200 mg/L、800 mg/L 以及 3200 mg/L 的重铬酸钾溶液，作为模拟样品分别进行了 6 次 96 h 最低无效应稀释倍数 LID 的测定，LID 平均值分别为 2.08、8.44、33.8，相对误差 ($\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$) 分别为 4.00%±0%、1.75%±1.36%、2.28%±4.47%。

12 质量保证和质量控制

12.1 空白试验和参比物结果及测试条件应符合下列要求，结果方为有效。否则，应查明原因后重新进行测试。

12.2 测试结束时，阴性对照中受试生物死亡率≤10%，若每组受试生物不到 10 尾，则阴性对照受试生物死亡数应≤1。

12.3 在相同的测试条件下，参比物重铬酸钾的 24 h LC₅₀ 应在 200 mg/L~400 mg/L 范围内，每批次受试生物应至少开展一次参比物试验。

12.4 测试环境条件应符合 9.1 要求。

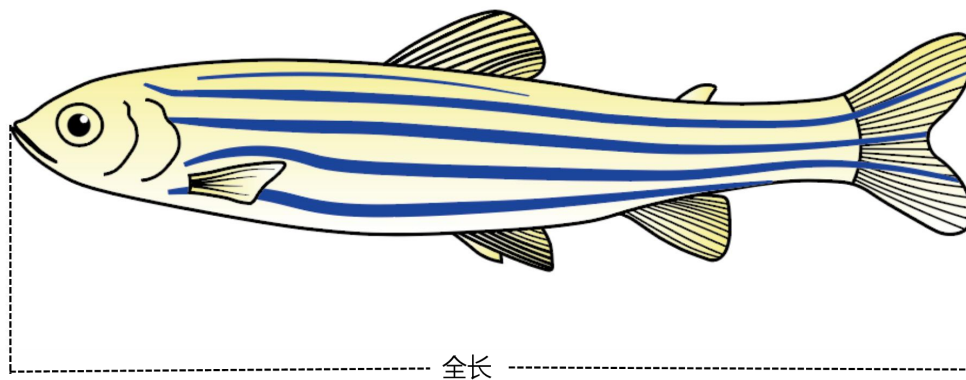
13 测试报告

测试报告应至少包括以下内容：

- a) 样品的类型、来源、主要污染物组分（适用时）、保存方法及保存时间；
- b) 测试前样品的 pH 值、溶解氧浓度及静置条件、调 pH 等前处理方法；
- c) 受试生物的名称、来源、品系、龄期、体长（体重）及驯养情况；标准稀释水或其他稀释水的 pH 值和硬度；
- d) 测试环境条件，包括使用的稀释水、光照强度、pH 值、温度、溶解氧、生物承载量、换水周期等信息；
- e) 质量保证和质量控制要求的符合性；
- f) 测试结果 LID 或 96 h LC₅₀ 及其计算方法，95%置信区间等；
- g) 测试期间受试生物的任何异常行为，如侧翻、浮在水面、异常打转或盘旋等。

附录 A
(资料性附录)
斑马鱼全长测量

鱼体全长指从吻尖到尾鳍的直线长度，见图1。用游标卡尺（7.6）测量。



图A.1 鱼体全长示意图

附 录 B
(规范性附录)
稀释用水水质参数及浓度限值

稀释用水的水质参数及浓度限值见表 B.1。

表 B.1 稀释用水水质参数及浓度限值

序号	参数指标	浓度限值
1	颗粒物	5 mg/L
2	总有机碳 (TOC)	2 mg/L
3	非离子态氨 (NH ₃)	1 mg/L
4	硝酸盐 (NO ₃ ⁻)	8.85 mg/L
5	余氯	10 µg/L
6	总有机磷	50 ng/L
7	总有机氯和多氯联苯	50 ng/L
8	砷 (As)	1 µg/L
9	铬 (Cr)	1 µg/L
10	钴 (Co)	1 µg/L
11	铜 (Cu)	1 µg/L
12	铁 (Fe)	1 µg/L
13	铅 (Pb)	1 µg/L
14	镍 (Ni)	1 µg/L
15	锌 (Zn)	1 µg/L
16	镉 (Cd)	100 ng/L
17	汞 (Hg)	100 ng/L
18	银 (Ag)	100 ng/L
19	化学需氧量 (COD)	5 mg/L

附录 C (资料性附录)

重铬酸钾对受试生物（斑马鱼，*Danio rerio*）的急性毒性测试

C.1 目的

用于验证受试生物（斑马鱼，*Danio rerio*）的敏感性和测试条件的可靠性。从每批次购买的受试生物或每批次实验室自行繁殖的受试生物随机抽取一定数量的斑马鱼，暴露于含不同浓度的重铬酸钾溶液中，以 24 h 为测试周期，观测并记录受试生物的死亡率，以确定受试生物死亡 50% 时的参比物浓度，即半致死浓度，以 24 h LC₅₀ 表示。

C.2 试剂

重铬酸钾（K₂Cr₂O₇），分析纯及以上。

C.3 测试方法

C.3.1 试样制备

称取适量重铬酸钾（6.2.6）直接加入稀释水（6.2.14 或 6.2.15）中，机械搅拌 10 min，配制得到 0.1 g/L～1 g/L 的重铬酸钾贮备液。不同浓度的试样溶液以稀释水稀释重铬酸钾贮备液得到。

C.3.2 测试条件

表 C.1 主要测试条件参数

参数	参数设定值或范围
受试生物	斑马鱼，体长 1 cm～2 cm
光周期	光暗比为 16 h : 8 h～12 h : 12 h
照度	540 lx～1000 lx
pH 值	6.0～8.5
温度	23 °C ± 1 °C
溶解氧	>4 mg/L（溶解氧饱和度>46.7%），不曝气
饲喂	不饲喂
试样浓度	0、100 mg/L、150 mg/L、225 mg/L、338 mg/L、506 mg/L
正式试验	采用静态法，每个浓度组与阴性对照组各 10 尾鱼，不设平行
单位水体生物承载量	≤0.8 g/L（以湿重计）
测试周期	24 h

C.4 有效性标准

按照附录 D 推荐的 LC₅₀ 计算方法，得到参比物重铬酸钾的 24 h LC₅₀ 值在 200 mg/L～

400 mg/L 之间，说明该批次受试生物敏感性和测试条件的可靠性符合要求。

附 录 D
(资料性附录)

寇氏 (Karber) 法计算 LC_{50} 示例

以下为寇氏 (Karber) 法计算废水鱼类急性半致死浓度 LC_{50} 的计算示例。

D.1 LC_{50} 计算

寇氏 (Karber) 法计算 LC_{50} 应满足下列条件:

- a) 每个浓度组的受试生物数量应相同;
- b) 各浓度组试样浓度按等比级数分组;
- c) 最高浓度组的死亡率宜为100%或与之接近, 最低浓度组的死亡率应为0%或与之接近。

各浓度组受试生物死亡率按照公式 (D.1) 计算:

$$R_{mi} = \frac{n_{mi}}{n} \quad (D.1)$$

式中: R_{mi} ——第 i 浓度组的受试生物死亡率;

n_{mi} ——第 i 浓度组受试生物死亡数量;

n ——每个浓度组受试生物的数量。

$\log LC_{50}$ 按照公式 (D.2) 计算:

$$\log LC_{50} = \log \varphi_m - \log q \times \left(\sum_{i=0}^j R_{mi} - 0.5 \right) \quad (D.2)$$

式中: LC_{50} ——半数致死浓度 (以体积分数表示), %;

φ_m ——100%致死率的最低浓度 (以体积分数表示), %;

q ——逐级稀释倍数 (等比数列的公比);

j ——从 0 致死率最高浓度到 100%致死率最低浓度, 试样浓度组数量;

R_{mi} ——第 i 浓度组死亡率;

0.5——50%的死亡率。

LC_{50} 按照公式 (D.3) 计算:

$$LC_{50} = 10^{\log LC_{50}} \quad (D.3)$$

式中: LC_{50} ——半数致死浓度 (以体积分数表示), %;

10——指数函数的底数。

$\log LC_{50}$ 标准误差按照公式 (D.4) 计算:

$$SE_{\log LC_{50}} = \frac{\log q}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^j (n_{mi} \times (n - n_{mi})) / (n - 1)} \quad (D.4)$$

式中: $SE_{\log LC_{50}}$ —— $\log LC_{50}$ 的标准误差;

q ——逐级稀释倍数 (等比数列的公比);

n_{mi} ——第 i 浓度组受试生物死亡数量;

n ——每个浓度组受试生物的数量。

95%置信区间 (95% CI) 按照公式 (D.5) 计算:

$$95\%CI=10^{(\log LC_{50} \pm 1.96 \times SE_{\log LC_{50}})} \quad (D.5)$$

式中：95%CI——95%置信区间；

10——指数函数的底数；

LC₅₀——半数致死浓度，%；

1.96——标准正态分布（双侧分布）97.5%分位点的近似值，也称作标准正态偏差或 Z 分数；

SE_{logLD₅₀}——logLC₅₀ 估计的标准误差。

D.2 LC₅₀ 计算示例

某工业废水对斑马鱼 96 h 急性毒性测试数据如表 D.1 所示，求 96 h LC₅₀ 及 95%CI。

表 D.1 某工业废水对斑马鱼 96 h 急性毒性测试结果

序号	浓度 (%)	各组受试生物死亡数 n_{mi}	各组受试生物存活数 $n - n_{mi}$	$n_{mi} \times (n - n_{mi})$	各组的死亡率 R_{mi}
1	0 (CK)	0	10	0	0
2	6.25	1	9	9	0.10
3	12.5	2	8	16	0.20
4	25.0	4	6	24	0.40
5	50.0	7	3	21	0.70
6	100	10	0	0	1.00
Σ		24		70	2.4

以表 D.1 中的数据为例，导致受试生物 100%致死的最低浓度（体积分数）为 100%，则 $\log \varphi_m = \log 100 = 2$ 。

样品的逐级稀释倍数 q 为 2，则 $\log q = \log 2 = 0.301$ 。

累计致死率 ΣR_{mi} 为 2.4

$\Sigma(n_{mi} \times (n - n_{mi}))$ 为 70。

Log LC₅₀ 值计算如下：

$$\log LC_{50} = \log \varphi_m - \log q \times \left(\sum_{i=0}^j R_{mi} - 0.5 \right) = 2 - 0.301 \times (2.4 - 0.5) = 1.428$$

LC₅₀ 计算如下：

$$LC_{50} = 10^{\log LC_{50}} = 10^{1.428} = 26.8 \text{ (‰)}$$

LC₅₀ 的标准误差计算如下：

$$SE_{\log LC_{50}} = \frac{\log q}{n} \times \sqrt{\sum_{i=1}^j (n_{mi} \times (n - n_{mi}))} \Big/ (n - 1) = \frac{0.301}{10} \times \sqrt{70/9} = 0.0839$$

LC₅₀ 标准误差的 1.96 倍为:

$$1.96 \times SE_{\log LC_{50}} = 1.96 \times 0.0839 = 0.164$$

则 95%置信区间为:

$$95\%CI = 10^{(\log LC_{50} \pm 1.96 \times SE_{\log LC_{50}})}$$

$$95\%CI \text{ 下限} = 10^{(1.428 - 0.164)} = 10^{1.264} = 18.4 \text{ (\%)}$$

$$95\%CI \text{ 上限} = 10^{(1.428 + 0.164)} = 10^{1.592} = 39.1 \text{ (\%)}$$

则 LC₅₀ 的 95%CI 为 18.4%~39.1%。

附录 E
(资料性附录)

废水对斑马鱼 (*Danio rerio*) 急性毒性的 LID 测定示例

当用逐级稀释的方法检测废水时,最低无效应稀释倍数 (LID) 为受试生物存活率 $\geq 90\%$ 时样品的最低稀释倍数 (D)。

以表 E.1 的测试结果为例,稀释倍数为 16 时,受试生物存活率为 100%,稀释倍数为 8 时,受试生物存活率为 80%,即 $LID = 16$ 。

表 E.1 LID 测试结果

稀释倍数 (D)	受试生物数量 (存活数量, 尾)	存活率 (%)
1	10 (0)	0
2	10 (2)	20
4	10 (5)	50
8	10 (8)	80
16	10 (10)	100