

《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法（修订 GB/T 13267-91）》（征求意见稿）

编制说明

《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》编制组

2025 年 4 月

项目名称：水质 急性毒性的测定 斑马鱼法（修订GB/T 13267-91）

项目统一编号：992

项目承担单位：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

编制组主要成员：吉贵祥、顾 杰、许 静、曹 宇、郭 敏、
石利利、余若祯、刘丽颖、王一喆、史 薇

环境标准研究所技术负责人：裴淑玮

生态环境部华南环境科学研究所技术负责人：党焱、胡国成

生态环境监测司项目负责人：仇鹏

目 次

目 次	i
1 项目背景	1
1.1 任务来源	1
1.2 工作过程	1
1.2.1 标准制修订前期工作回顾	1
1.2.2 成立标准编制组	2
1.2.3 国内外相关标准和文献资料调研	2
1.2.4 补充完善实验研究、组织方法验证	2
1.2.5 标准开题论证会	2
1.2.6 开题论证会意见落实情况	3
1.2.7 标准征求意见稿技术审查会前审查与函审	3
1.2.8 标准征求意见稿技术审查会情况	3
1.2.9 标准征求意见稿技术审查会意见落实情况	4
2 标准修订的依据及必要性分析	4
2.1 修订本标准的法律依据	4
2.2 我国水环境管理目标向水生态健康管理转变的要求	4
2.3 落实《水污染防治行动计划》《新污染物治理行动方案》的要求	5
2.4 与国际标准接轨的迫切需要	5
3 国内外相关标准情况	5
3.1 主要国家、地区及国际组织相关测试方法	5
3.2 国内相关测试方法	6
3.3 与国内外相关标准的关系	7
4 标准修订的原则与技术路线	11
4.1 标准修订的原则	11
4.1.1 受试生物的选择符合中国国情	11
4.1.2 与国内外同类标准的相关性	11
4.1.3 与时俱进原则	11
4.2 标准制修订的技术路线	11
5 标准主要技术内容	12
5.1 标准结构框架	12
5.2 标准主要技术内容确定的依据	13
5.2.1 标准适用范围	13
5.2.2 规范性引用文件	13
5.2.3 术语和定义	14
5.2.4 方法原理	14
5.2.5 干扰消除	14
5.2.6 试剂和材料	15
5.2.7 仪器和设备	16
5.2.8 样品采集、保存及处理	17
5.2.9 测试步骤	20
5.2.10 结果计算与表示	22
5.2.11 有效性、敏感性及精密度	22

5.2.12	正确度	23
5.2.13	质量保证和质量控制	23
5.2.14	测试报告	23
5.2.15	附录	23
6	方法验证结果	24
6.1	实验室内验证	24
6.1.1	稀释水验证	24
6.1.2	参比物验证	24
6.1.3	实际样品验证	24
6.2	实验室间方法验证	26
6.2.1	方法验证方案	26
6.2.2	方法验证结果	27
7	与开题报告的差别说明	32
8	标准实施建议	34
9	参考文献	35

《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法(修订 GB/T 13267-91)》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

根据原国家质检总局（国质检财函〔2006〕909 号和〔2007〕971 号）文件，受原国家质检总局科技司委托，2006 年原国家环境保护总局发布《关于下达 2006 年度国家环境保护标准制修订项目计划的通知》（环办函〔2006〕371 号），下达了《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》的编制任务，项目统一编号为 992，任务承担单位为原国家环境保护总局南京环境科学研究所（现生态环境部南京环境科学研究所）。

2020 年 10 月生态环境部法规与标准司和生态环境监测司组织 2016 年及以前立项国家环境保护标准结题论证会，决定由生态环境部南京环境科学研究所继续承担该标准制修订工作，标准名称为《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》。

1.2 工作过程

1.2.1 标准制修订前期工作回顾

2007 年，原国家环境保护总局南京环境科学研究所成立《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》标准编制组，根据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（2006 年，第 41 号公告）的相关规定，通过对当时国内外相关标准和文献资料的系统调研分析，主要参考 ISO 标准《Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 1: Static method (ISO 7346-1-1996)》^[1]，同时参考了《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》（GB/T 13267-91）^[2]，对比原标准文本明确了修订内容，形成了开题报告和标准草案。2007 年 6 月，结合当时的技术方法发展及应用情况，进一步明确了试验方法及有效性确认、受试生物的选择及繁殖驯养条件等关键性内容，形成标准《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》征求意见稿及编制说明，提交原环境保护部科技标准司和环境标准研究所。

2008 年 4 月，根据国家环境保护标准制修订管理工作规定，原环境保护部就本标准公开向国务院有关部门、各省市环境保护部门、各省市环境监测站（中心）、地方有关部门、科研机构、高等院校及有关企事业单位，共计 214 家单位征求意见，共反馈 19 条书面意见。编制组对反馈意见进行了处理和汇总，修改后再次形成标准征求意见稿和编制说明，并于 2008 年 7 月修改形成了标准送审稿，提交原环境保护部科技标准司和环境标准研究所。但当时修订的标准仍与目前水质生物毒性测试要求存在较大差距。

1.2.2 成立标准编制组

2020年10月，再次接到标准编制任务后，生态环境部南京环境科学研究所立即组织项目启动研讨，成立标准方法编制组确定新的项目负责人，确定任务分工，安排实施进度。

1.2.3 国内外相关标准和文献资料调研

2020年10月底结题论证后，重新成立标准编制组。结合项目1207.18的相关要求，对国际组织与发达国家相关标准的最新版本及有关文献进行了系统调研分析，重点剖析了《Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 1: Static method (ISO 7346-1-1996)》^[1]、《Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 2: Semi-static method (ISO 7346-2-1996)》^[3]，经济与发展组织(OECD)TG 203 Acute Toxicity Test (2019)^[4]及美国环境保护署(EPA)《Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to Freshwater and marine organisms. EPA 821-R-02-012, 2002》^[5]等标准(见表1)的适用范围、主要内容、结果表征及修订内容与依据，比较分析了GB/T 13267-91标准内容与最新国际标准的差异性及不足之处，确立了标准的框架结构和主要内容。

此外，我国现有另一项标准《工业废水的试验方法 鱼类急性毒性试验》(GB/T 21814-2008)^[6]，主要参照日本发布的行业标准《Testing methods for industrial wastewater》(JIS K 0102-71:1998)^[7]制定，该标准对于鱼类饲养及预养条件、稀释水配制、样品采集和保存等方面的规定不够具体，参考性不强，本编制说明不再重复描述。

1.2.4 补充完善实验研究、组织方法验证

标准编制组进一步补充完善样品保存等相关实验，并完善了标准草案和开题报告。2022年12月~2023年4月组织了6家实验室进行方法验证工作，统一派发了工业废水、生活污水、地表水、地下水实际样品，规定了重铬酸钾模拟样品浓度。2023年5月，标准编组进行了各实验室数据的汇总和数据的数理分析工作，编写完成了方法验证报告。

1.2.5 标准开题论证会

2023年10月24日，生态环境部生态环境监测司组织召开了“水质 急性毒性的测定 斑马鱼法”等两项国家生态环境标准开题论证会，会议通过了标准的开题报告，提出了具体修改意见和建议：

- (1) 进一步明确试验方法，确定适用范围；
- (2) 细化标准中受试生物的选取、饲养、驯养、阳性对照浓度范围、质量控制等相关参数的确定依据；
- (3) 细化不同类型样品的采样方法、水质参数的测试频次，完善样品干扰和消除相关内容；
- (4) 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168-2020)，《环境保护标准出版技术指南》(HJ 565-2010)的相关要求进行标准文本和编制说明的编写。

1.2.6 开题论证会意见落实情况

- (1) 将静态法和半静态法修改为 LID 法和 LC₅₀ 法；
- (2) 组织 9 家实验室开展了不同大小斑马鱼的重铬酸钾急性毒性试验，确定了受试生物的选取依据及阳性对照浓度范围；补充了受试生物的饲养、驯养及质量控制等相关参数的确定依据；
- (3) 补充了样品采集的瞬时样品、混合样品的采样要求、水质参数的测试频次及样品干扰和消除相关内容；
- (4) 按照 HJ 565-2010 修改完善开题论证报告及标准草案。
- (5) 规范性引用文件增加 HJ/T 399、HJ 501；明确了参比物的有效性范围、精密度参数；增加附录 A 斑马鱼全长测量示意图。

1.2.7 标准征求意见稿技术审查会前审查与函审

2024 年 10 月，编制组完成了《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》标准文本（征求意见稿）和编制说明的编写，提交生态环境部环境标准研究所审查。2024 年 11 月~2025 年 2 月，生态环境部环境标准研究所组织 3 名专家进行函审，函审意见主要包括：

- (1) 补充饲养条件，特别是水环境条件的研究或文献资料；
- (2) 补充地表水采样地下水方法，特别是地下水采样要求；
- (3) 明确标准中易引起歧义的地方，如明确斑马鱼符合 GB/T 39649 要求的具体内容，说明加盖后怎么保证水中溶解氧问题；
- (4) 测试环境条件建议参考 GB/T 39649 实验鱼养殖水环境指标；
- (5) 补充说明与国内外相关标准的关系是要说清本标准哪些内容等同采用了现有国内外相关标准，哪些内容是参考，有哪些变化；

2025 年 3 月，编制单位补充相关实验，并对函审意见进行了修改，相关意见落实情况如下：

- (1) 在编制说明中补充了 ISO 7346-1~2、OECD TG 203-2019、GB/T 39649、GB/T 13267-91 和 GB/T 31270.12-2014 等标准规定的斑马鱼水环境条件（表 4）；
- (2) 标准文本中细化采样方法的描述，包括瞬时样品，混合样品以及如何采集；增加采样时过滤、测定样品规定；
- (3) 明确了标准中易引起歧义的地方，如明确了符合 GB/T 39649 种质鉴定要求的描述；
- (4) 编制说明补充了实验鱼养殖水环境指标确定的依据和来源；
- (5) 编制说明补充了 EPA-821-R-02-012 的 8.3 条款规定的样品采集方法。

修改后的标准文本和编制说明经 3 名专家审核后，均建议上会。

1.2.8 标准征求意见稿技术审查会情况

2025 年 3 月 26 日，生态环境部生态环境监测司组织征求意见稿技术审查会，会议通过了标准征求意见稿的技术审查，建议修改完善后，提请公开征求意见。意见包括：

- (1) 适用范围补充本标准不适用的情形；
- (2) 统一标准文本中相关表述，如水样/原水/试样，阴性对照/空白对照等；

(3) 将斑马鱼培养温度及暴露条件温度统一为 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;

(4) 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168-2020)和《环境保护标准编制出版技术指南》(HJ 565-2010)对标准文本和编制说明进行编辑性修改。

1.2.9 标准征求意见稿技术审查会意见落实情况

2025 年 4 月,编制组按照专家意见进一步完善了标准征求意见稿:

(1) 适用范围增加海水为不适用条款;

(2) 增加术语“试样”,标准文本将“水样/原水”统一称为样品,稀释后的样品称为试样,阴性对照/空白对照统一修改为阴性对照。

(3) 将斑马鱼培养温度及暴露条件温度统一为 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;

(4) 按照 HJ 168 和 HJ 565 要求对标准文本和编制说明进行了编辑性修改。

2 标准修订的依据及必要性分析

2.1 修订本标准的法律依据

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》《中华人民共和国黄河保护法》和《水污染防治行动计划》等法律法规,保护环境,防治污染,促进水质监测技术及污染治理技术的进步,根据《国家生态环境标准制修订工作规则》(国环法规〔2020〕4号)等文件的规定,制定本标准。

2.2 我国水环境管理目标向水生态健康管理转变的要求

随着我国工业化和城市化的加快,工业废水、生活污水的排放总量和所含污染物组分迅速增加。废水经净化处理达到一定的排放标准后即进行排放,但实际上仍可能含有微量或痕量有毒有害污染物,并具有一定毒性,对生态环境和人体健康构成威胁。长期以来,我国的水环境管理处于水质目标管理阶段,水环境质量的评价、考核和排名主要依据水化学指标,如氨氮、总磷、化学需氧量、高锰酸盐指数等。随着我国的水环境管理目标逐渐从水质达标管理向水生态健康管理转变,需要能反映水生态健康的方法标准作技术支持,生物毒性测试就是能反映水生态健康的监测方法。《“十四五”生态环境领域科技创新专项规划》(国科发社〔2022〕238号)中提出:构建以生物毒性及特征污染物控制为目标的工业废水达标排放可行技术体系。

我国制药工业系列排放标准(GB 21903~GB 21908)^[8-13]首次引入了基于发光细菌法的综合毒性指标。2015 年 11 月,原环境保护部修订了《城镇污水处理厂污染物排放标准(征求意见稿)》,首次增加综合毒性指标来反映排放废水的综合毒性,包括发光细菌、溞类、藻类和鱼卵急性毒性,并规定了监管限值。2019 年 9 月,生态环境部修订《纺织工业水污染物排放标准(征求意见稿)》,规定纺织工业水污染物排放标准的大型溞急性毒性排放限值为 10%(稀释倍数为 8)。2020 年 1 月,生态环境部印发《应对新型冠状病毒感染肺炎疫情应急监测方案》,将生物毒性列为饮用水水源地疫情防控特征指标之一。目前,生态环境部发布《电子工业水污染物排放标准》(GB 39731-2020)^[14]、《农药工业水污染物排放标

准》（GB 21523-2024）》^[24]，将斑马鱼卵急性毒性作为综合毒性控制指标。但由于缺乏适用的大型蚤、发光菌、鱼类等水生生物的生态毒性监测方法标准，前述的有些标准迟迟不能发布，急需推进相关生物毒性监测方法标准的制修订。

2.3 落实《水污染防治行动计划》《新污染物治理行动方案》的要求

《水污染防治行动计划》明确提出要完善标准体系。完善水环境监测网络。统一规划设置监测断面（点位）。提升饮用水水源水质全指标监测、水生生物监测、地下水环境监测、化学物质监测及环境风险防控技术支撑能力。

《新污染物治理行动方案》（国办发〔2022〕15号）提出要加强新污染物多环境介质协同治理。排放重点管控新污染物的企事业单位，应采取有效的污染控制措施，满足相关污染物排放控制标准及环境质量目标要求。

本标准的修订发布是落实《水污染防治行动计划》与《新污染物治理行动方案》相关要求的具体举措。

2.4 与国际标准接轨的迫切需要

现有标准《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》（GB/T 13267-91）参照 ISO 7346 制定，而 ISO 7346 制定于 1984 年，并已于 1996 年进行了修订。GB/T 13267 已经颁布实施 30 多年，参考的标准 ISO 7346 也已修订，原标准已经不能适用国内生态环境监测的新要求及国际标准的要求。GB/T 13267-91 采用的是 LC_{50} （半致死浓度）作为毒性评价指标，目前 OECD、ISO 等国际标准体系已普遍采用 LID（最低无效应稀释倍数）作为废水毒性评价的重要指标。随着我国水环境管理要求的不断提高，亟需建立涵盖 LID 测定方法的斑马鱼急性毒性测试技术规范。因此，《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》的修订为我国水生态环境安全提供了科学的监测方法依据。规范了不同实验室、不同监测部门之间的水质生物毒性测试方法（斑马鱼法），以提高监测数据互认程度。本标准的修订，对于提升废水中有毒有害污染物的排放控制，保护生态环境，尤其是水生态环境与美丽河湖建设具有极为重要的现实意义。

3 国内外相关标准情况

3.1 主要国家、地区及国际组织相关测试方法

目前 ISO、美国、德国、日本等均制订了水质鱼类急性毒性测定方法（见表 1），并应用于废水或水体污染物生物毒性监测。其中，ISO 7346 的 3 个标准是系列方法，分别为静态法、半静态法及流水式方法，适用于水中稳定、相对稳定及不稳定物质的测试，采用半致死浓度 LC_{50} 表征水中物质的毒性大小。美国材料与试验协会（ASTM）和美国环保署（EPA）分别制定了水和废水生物毒性测定方法^[15-16]，其中 ASTM（E1192-97）涵盖了鱼类、大型底栖无脊椎动物以及两栖动物的急性毒性测定方法。德国在废水性质比较复杂的有机化工、钢铁、印染等行业的水污染物排放标准中引入了综合毒性指标，受试生物覆盖动物、植物、细菌等多种门类生物，包括鱼卵、蚤类、藻类与发光细菌毒性及致突变性（基因毒性测定等），

在确定测试终点的基础上，采用最小稀释倍数（LID）来表征废水的综合毒性^[17]，简单明了，易于操作。日本的 JIS K 0102-71 基本等同 ISO 7346-1-1996。OECD 化学品 鱼类急性毒性测定导则（TG 203）与美国 EPA 712-C-96-007 的鱼类急性毒性试验主要针对化学物质的生态毒理测试，但总体内容与 ISO7346 相似，也具有参考性。

表 1 国外水质/物质 鱼类急性毒性相关标准

序号	发布组织或国家	标准名称	标准编号	发布时间
1	ISO	Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [<i>Brachydanio rerio</i> Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]-Part 1: Static method	ISO 7346-1 ^[1]	1996
2	ISO	Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [<i>Brachydanio rerio</i> Hamilton (Teleostei, Cyprinidae)]-Part 2: Semi-static method	ISO 7346-2 ^[3]	1996
3	ISO	Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [<i>Brachydanio rerio</i> Hamilton (Teleostei, Cyprinidae)]-Part 3: Flow-through method	ISO 7346-3 ^[18]	1996
4	ASTM	Standard guide for conducting acute toxicity tests on aqueous ambient samples and effluents with fishes, macroinvertebrates and amphibians	ASTM E 1192 ^[15]	2014
5	美国	Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to Freshwater and marine organisms	EPA 821-R-02-012 ^[5]	2002
6	德国	Determining the tolerance of fish to the toxicity of waste water by way of a dilution series	DIN 38412-31 ^[17]	1989
7	日本	工业废水的试验方法 鱼类急性毒性试验	JIS K 0102-71 ^[7]	1998
8	OECD	Fish, Acute Toxicity Testing	OECD (2019), Test Guideline No. 203 ^[4]	2019
9	美国	Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test	EPA 712-C-96-007 ^[16]	2016
注：1~7 是水和废水测试方法，8 和 9 是化学物质的鱼类毒性测试方法。				

3.2 国内相关测试方法

目前我国共有 5 个基于鱼类（鱼卵）的水质急性毒性测定方法标准（见表 2），其中，GB/T 13267-91 等同采用 ISO 7346-1984，即本次修订的标准；GB/T 21814-2008 等同采用日本的 JIS K 0102-71；2019 年发布的《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》（HJ 1069-2019）^[19]，主要参考“Water quality-Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)”（ISO 15088-2007），该标准是本次修订标准斑马鱼急性毒性的重要补充。此外，2011 年我国发布《化学品 鱼类急性毒性试验》（GB/T 27861-2011），等同采用 OECD 的 TG 203（1992），主要针对化学物质的生态毒理测试，2019 年 OECD 发布了 TG 203 修订版，该标准也需要进行更新。2014 年发布的化学农药环境安全评价试验准则 第 12 部分：鱼类急性毒性试验（GB/T 31270.12-2014）已列入 2024 年标准修订计划，目前正在修订中。

表 2 国内鱼类急性毒性相关标准

序号	发布部门	标准名称	标准号	发布时间
1	原国家环境保护局	水质 物质对淡水鱼（斑马）	GB/T 13267-91 ^[2]	1991

		鱼)急性毒性测定方法		
2	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会	工业废水的试验方法 鱼类 急性毒性试验	GB/T 21814-2008 ^[6]	2008
3	生态环境部	水质 急性毒性的测定 斑 马鱼卵法	HJ 1069-2019 ^[19]	2019
4	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会	化学品 鱼类急性毒性试验	GB/T 27861-2011 ^[20]	2011
5	国家质量监督检验检疫总局 国家标准化管理委员会	化学农药环境安全评价试验 准则 第 12 部分: 鱼类急性毒 性试验	GB/T 31270.12 ^[21]	2014
注: 4 针对化学物质的鱼类毒性测试方法; 5 针对化学农药的鱼类急性毒性测试方法。				

3.3 与国内外相关标准的关系

基于上述分析,本研究重点剖析针对水质综合毒性测试的 ISO 7346 1~3^[1,3,18]、德国 (DIN 38412-31-1989^[17]、美国 EPA 821-R-02-012^[5]、ASTM E 1192-2014^[15]及 OECD TG 203 -2019^[4],比较 5 个标准的异同及可借鉴性,包括适用范围、术语定义、受试生物、参比物、稀释水、样品采集与预处理、测试步骤、质量控制与结果表征。相关标准的主要技术指标比较见表 3。

表 3 相关标准主要技术指标比较

标准	适用范围	受试生物	受试生物大小	鱼类驯养	参比物	稀释水	样品采集	样品保存运输	样品预处理	暴露方式	测试步骤	结果表述	质量控制
ISO 7346 1~3	适用于水中单一物质（稳定、相对稳定、不稳定物质）对淡水鱼（斑马鱼）的急性毒性测定	斑马鱼、蓝鳃太阳鱼、青鳉、斑马鱼、孔雀鱼	体重 0.3 g ±0.1 g, 体长 30 mm ±5 mm	在与试验相同的环境下至少驯养一周	重铬酸钾	标准稀释水	无	ISO 5667-16 规定:0℃~5℃避光运输和保存,不超过 24 h; -18℃保存,不超过 60 d	无	静态、半静态、流水式	包括预试验、限度试验、正式试验	LC ₅₀	测试结束时,空白组鱼死亡率和异常行为比例≤10%;参比物重铬酸钾 24 h LC ₅₀ 不同实验室之间一致;试验溶液溶解氧应大于 60%空气饱和值;测试期间,受试物浓度无明显下降
ASTM E 1192	适用于水和废水对鱼类的急性毒性测定	银鲑鱼、虹鳟鱼、溪红点鲑鱼、金鱼、呆头鲮鱼、斑点叉尾鲴、蓝鳃太阳鱼、蓝绿鳞鳃太阳鱼	体重 0.1 g~5.0 g, 新孵化的幼鱼	在与试验相同的环境下至少驯养 14 d	氯化镉、硫酸铜、十二烷基磺酸钠、重铬酸钾等	标准稀释水,可代表纳污水体水质的适当硬度的地表水和地下水,脱氯自来水	采样容器充满密闭	如果 2 h 之内不测试,4℃以下避光保存	≥2 mm 孔径粗筛过滤	静态、半静态、流水式	包括预试验(可选)、限度试验、正式试验	LC ₅₀ , 必要时 LC ₅ 或 LC ₉₅	测试结束时,空白组鱼死亡率≤10%。参比物测试结果符合要求
EPA 821-R-02-012	适用于污水和纳污水对鱼类的急性毒性测定	呆头鲮鱼、虹鳟鱼、溪红点鲑鱼	鱼龄:呆头鲮鱼 1 d~14 d;虹鳟鱼 14 d~30 d;溪红点鲑鱼 30 d~60 d;	无	氯化镉、硫酸铜、十二烷基磺酸钠、重铬酸钾等	标准稀释水,可代表纳污水体水质的适当硬度的地表水和	采样容器充满密闭	0℃~6℃避光运输和保存,不超过 24 h,采样后 36 h 内开展实验。	2 mm~4 mm 粗滤,如微生物较多可用 60 μm	静态、半静态、流水式	包括预试验、限度试验、正式试验	LC ₅₀	测试结束时,空白组鱼死亡率≤10%。参比物测试结果符合要求

标准	适用范围	受试生物	受试生物大小	鱼类驯养	参比物	稀释水	样品采集	样品保存运输	样品预处理	暴露方式	测试步骤	结果表述	质量控制
						地下水			膜滤 (但可能降低毒性)				
DIN 38412-31-1989	适用于废水对鱼类急性毒性的测定	圆腹雅罗鱼(性成熟前)	体长 5 cm~8 cm	在与试验相同的环境条件下至少驯养一周,之后每周死亡率不超过 1%	无	标准稀释水,或满足规定水质参数要求的脱氯过滤自来水	无	无	无	无	无	最低无死亡稀释倍数 (G_F)	无
OECD 203 -2019	适用于化学品对鱼类的急性毒性测定	斑马鱼、黑头呆鱼、鲤鱼、虹鳟、日本青鳉、孔雀鱼、蓝鳃太阳鱼等	斑马鱼 1 cm~2 cm; 黑头呆鱼 1~3 cm; 青鳉 1 cm~2 cm; 孔雀鱼 1 cm~2 cm; 蓝鳃太阳鱼 1 cm~3 cm	在与试验相同的环境条件下至少驯养 9 d (2 d 适应期,其后至少驯养 7 d)	无	标准稀释水,满足规定水质参数要求的洁净地表水、地下水或脱氯自来水等	无	无	无	静态、半静态、流水式	包括预试验、限度试验、正式试验	LC_{50} 、浓度响应曲线、中毒症状	测试结束时,空白组鱼死亡率 $\leq 10\%$,若每组鱼不到 10 尾,则空白组鱼死亡数不得超过 1 尾;试验溶液溶解氧饱和度应大于 60%;受试物浓度变化不大于初始浓度的 20%
GB/T 13267-91	单一化学物质,工业废水	斑马鱼、青鳉鱼	体长 2.5~3.5cm, 体重 0.2~0.4g	在与试验相同的环境条件下至少驯养 2 周	重铬酸钾	标准稀释水	采集有代表性的样品	无	无	静态、半静态、流水式	包括预试验和正式试验	LC_{50} 、浓度响应曲线、中毒症状	无
本标准	适用于地表水、地	斑马鱼	体长 1 cm~2 cm	在与试验相同	重铬酸钾	标准稀释水,或	按照 HJ	6℃及以下避光运	调节样品的温	静态、半静态	LID 测试与	LC_{50} 和最低无效应	测试结束时,空白组鱼死亡率 $\leq 10\%$;参

标准	适用范围	受试生物	受试生物大小	鱼类驯养	参比物	稀释水	样品采集	样品保存运输	样品预处理	暴露方式	测试步骤	结果表述	质量控制
	下水、生活污水与工业废水对鱼类急性毒性的测定			的环境下至少驯养 9 d (2 d 适应期, 其后至少驯养 7 d)		满足规定水质参数要求的脱氯过滤自来水	91.1、HJ 91.2、HJ 164 和 HJ 493 的要求进行样品采集	输和保存, 不超过 24 h; 否则应尽快送实验室于 -18 °C 保存, 不超过 60 d	度; 必要时, 调节样品的 pH 值与溶解氧浓度		LC ₅₀ 测试, 其中 LC ₅₀ 测试包括预试验、限度试验、正式试验	稀释倍数 (LID)	比物重铬酸钾 24 h LC ₅₀ 应为 200 mg/L ~400 mg/L; 单位水体载鱼量 (湿重) 不超过 0.8 g/L; 测试条件符合要求

综上可知：（1）与 ISO 7346-1~3 相比，DIN 38412-31-1989 规定了 LID 测试要求，更适用于表征水质的综合毒性，本标准 LID 测试样品稀释借鉴了该标准；（2）EPA 821-R-02-012-2002，对样品采集与预处理作出了明确规定，本标准样品采集、保存及处理方法借鉴了该标准；（3）OECD TG 203 于 2019 年修订，对受试生物及预养等规定更符合生物毒性测试中动物伦理的要求，本标准斑马鱼预养、驯养、环境条件参照了该标准；（4）ISO 7346-3 流水试验主要针对样品中极不稳定化学物质的毒性测定，并不适合污染物未知的极不稳定样品的实验室测定。因此，本标准修订主要参考 ISO 7346-1~2（LC₅₀）与 DIN 38412-31-1989（LID），并结合 EPA 821-R-02-012、OECD TG 203 的相关要求。

4 标准修订的原则与技术路线

4.1 标准修订的原则

《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》的修订遵循以下原则：

4.1.1 受试生物的选择符合中国国情

受试生物的选择是水生物急性毒性测定中首先应考虑的问题。我国地域辽阔，鱼种资源丰富，但真正可以标准化用于毒性测试的鱼种并不多。国内专门研究受试生物种的单位较少，受试生物标准化程度较低。为了与国际接轨，结合我国实际国情，考虑环境暴露情景及受试生物的易得性、驯养难易程度等，确定斑马鱼为受试生物。

4.1.2 与国内外同类标准的相关性

在标准的修订过程中，对国内外相关标准进行分析研究。借鉴吸收国外先进标准的合理成分，结合实际国情，在我国原有标准的基础上补充完善测试方法的相关内容及要求，使新修订的标准既充分考虑国际接轨程度，又具有实用性。

4.1.3 与时俱进原则

标准的修订本身就是一个自我完善及与时俱进的过程，任何标准在特定的历史阶段都有其具体的意义和作用，随着测试技术的不断发展，新的技术必定会取代落后的测试技术。因此，本标准的修订也应与时俱进。

4.2 标准制修订的技术路线

标准修订的技术路线见图 1。

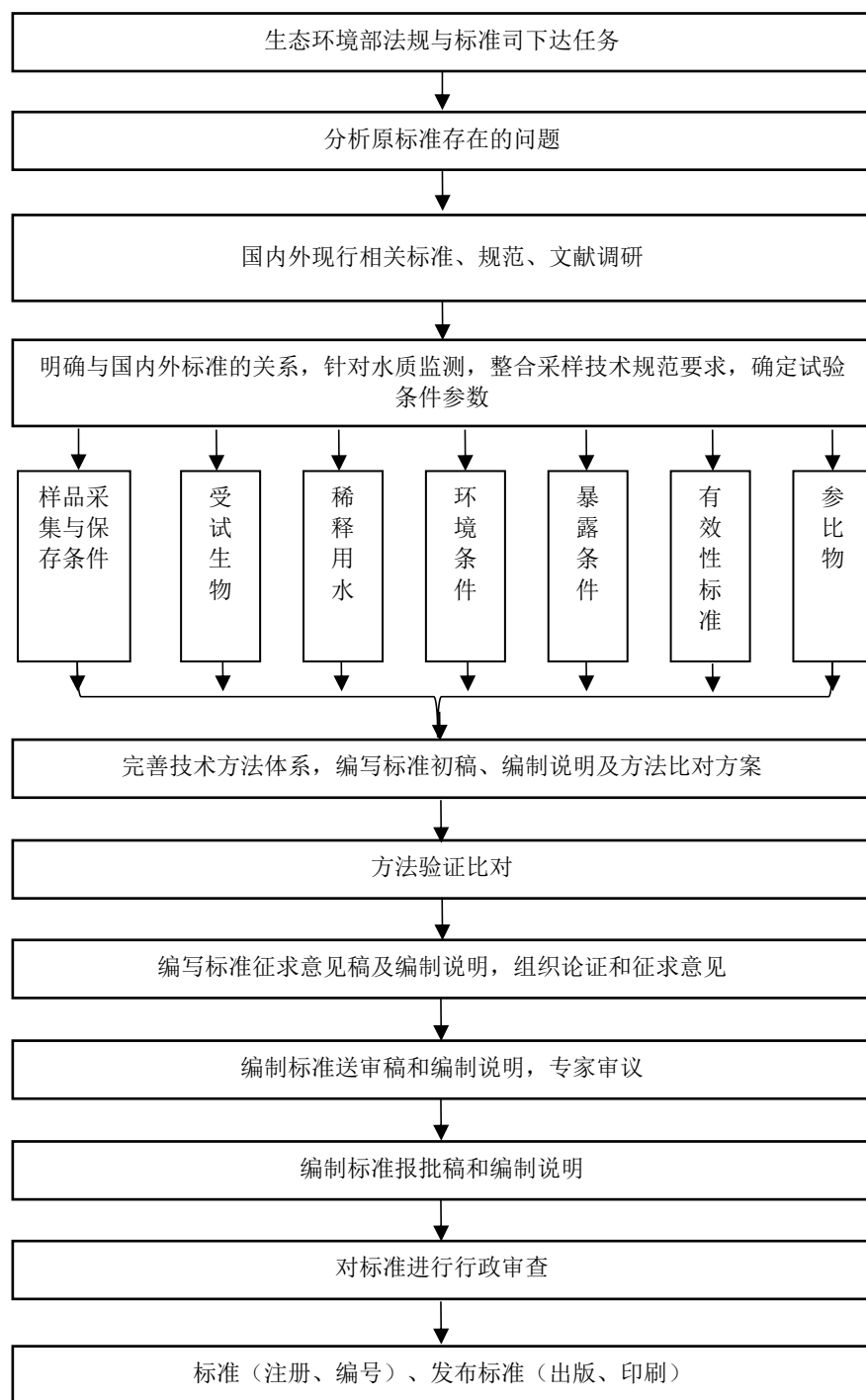


图 1 标准制订技术路线图

5 标准主要技术内容

5.1 标准结构框架

本标准方法主要参考《Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of

substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 1: Static method》(ISO 7346-1-1996)^[1]、《Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 2: Semi-static method》(ISO 7346-2-1996)^[3]、德国《Determining the tolerance of fish to the toxicity of waste water by way of a dilution series》(DIN 38412-31-1989)^[17]，以及经济与发展组织(OECD)《Acute Toxicity Test》(TG 203-2019)^[4]与美国《Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to Freshwater and marine organisms》(EPA 821-R-02-012, 2002)^[5]等标准(见表1)的适用范围、主要内容、结果表征及修订内容与依据，比较分析了GB/T 13267-91标准内容与最新国际标准的差异性及不足之处，确立了标准的框架结构和主要内容。本标准修订的主要技术内容包括下列方面：

- (1) 修改了方法适用范围、方法原理；
- (2) 增加了术语定义部分；
- (3) 完善了标准稀释水和其他稀释用水的要求；
- (4) 增加了样品采集、保存和前处理方法；
- (5) 增加了针对性的水质生物毒性测定LID法；
- (6) 细化了样品测定和结果表示等内容；
- (7) 增加了质量保证和质量控制等条款；
- (8) 增加了附录A~E。

5.2 标准主要技术内容确定的依据

5.2.1 标准适用范围

本标准适用于地表水、地下水、生活污水、工业废水等的急性毒性测定。本标准提供了2种急性毒性测定方法，LID法适用于确定最低无效应稀释倍数；LC₅₀法适用于确定半致死浓度。

由于斑马鱼为淡水脊椎动物，因此，本方法不适用于海水。

5.2.2 规范性引用文件

为满足生态环境监测需求，考虑生物毒性测试要求，本次修订参考ISO 7346-1~2、EPA 821-R-02-012-2002，增加了样品采集、保存和管理要求，水质参数检测要求，以及实验动物管理要求，主要引用我国现行相关标准，具体如下：

GB 13195 水质 水温的测定 温度计或颠倒温度计测定法

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 地表水环境质量监测技术规范

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

此外,由于电导率参数的测量暂无水质类测定方法,参考 GB/T 13580.3 大气降水电导率的测定方法。

5.2.3 术语和定义

本标准中多处涉及“样品”和“试样”,为明确二者之间的区别,参考 ISO 6107-2021 第 3 节 3.563 增加了术语“试样 test solution”,并根据标准内容明确定义。

稀释倍数 D 、最低无效应稀释倍数 LID 是表征水质毒性测试结果的重要参数。 D 定义为“试样中样品的体积分数的倒数。”LID 定义为“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。”即受试生物存活率 $\geq 90\%$ 的最低稀释倍数。同时,为凸显水质综合毒性测定的特点,将半致死浓度 LC_{50} 修订为: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,本标准试样浓度指试样中样品的体积分数(%)。

针对稳定的废水样品的测定,规定了宜采用静态法,即“测试中,不更新试样的测试方式”。针对不稳定样品的测定,宜采用半静态法,即“测试中,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”。由于样品中污染物成分复杂,无法采用目标物分析的方法证实所有污染物成分的稳定性。研究表明,大部分污染物在降解过程中都会发生好氧反应,化学需氧量(COD)或总有机碳(TOC)会发生变化,因此本标准采用 COD 或 TOC 变化来反映样品的稳定性。本标准规定,测试周期内试样的 COD 或 TOC 变化 $\leq 20\%$,可采用不换水的静态法测试。测试周期内试样的 COD 或 TOC 变化 $> 20\%$,宜采用 24 h 换水的半静态法。对于复杂成分废水样品的稳定性,可在测试前通过测定样品的 COD 或 TOC 变化情况,或根据预试验中试样的 COD 或 TOC 变化情况判定。

此外,由于参比(毒)物是质量控制的关键指标之一,增加了参比(毒)物的定义,即“在测试中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,同一实验室内部不同时间或不同人员之间测定结果的可比性评价。”本标准中,选用重铬酸钾为参比物。

5.2.4 方法原理

本标准条款 4 对方法原理进行了说明,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 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养 96 h,根据受试生物存活或死亡的统计数据计算 LID 值或 LC_{50} 值,表征样品的急性毒性。

5.2.5 干扰消除

样品中悬浮颗粒物会堵塞鱼鳃而导致物理性致死,因本标准测定的是水质综合生物毒性,所以规定通常情况下样品不作预处理,即包括物理致死与化学致死的共同毒性作用。但当仅考虑样品中化学污染物的毒性效应时,规定了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致死干扰,静置时间 $\leq 2\text{ h}$ 。该静置时间参考了 DIN 37412-30-1989 第 11 节条款 c 描述的“为使悬浮物沉淀,静置时间(T)应为 $1\text{ h} < T \leq 2\text{ h}$ ”。

5.2.6 试剂和材料

本次标准修订对受试生物、稀释水、参比（毒）物等进行了相应的更新。

条款 6.1 参照 ISO 7346-1~2、 OECD TG 203-2019、GB/T 39649、GB/T 13267-91 和 GB/T 31270.12-2014 等标准（表 4），结合本实验室多年斑马鱼饲养经验，条款 6.1 对斑马鱼饲养的水环境条件（温度、pH、硬度、光照、溶解氧）做了具体的要求。斑马鱼最合适的饲养条件为：水温 22℃~24℃，pH 值 6.0~8.5，水质硬度 40 mg/L~250 mg/L（以 CaCO₃ 计），光暗比 16 h : 8 h~12 h : 12 h。

表 4 斑马鱼饲养的水环境条件

序号	标准	温度	pH	水质硬度	光暗比	溶解氧
1	GB/T 39649	24~30℃	6.8~7.5	—	14 h: 10h	≥ 5.0 mg/L
2	ISO 7346-1~2	26±1℃	7.7~8.2	300 mg/L (以 CaCO ₃ 计)	12 h: 12h~16 h : 8 h	—
3	OECD TG 203-2019	21~25℃	6.0~8.5	40~250 mg/L(以 CaCO ₃ 计)	12h~16 h : 8 h	溶解氧饱和度≥80%
4	GB/T 13267-91	22~24℃	7.6~8.0	250 mg/L 左右(以 CaCO ₃ 计)	—	—
5	GB/T 31270.12-2014	21~25℃	6.0~8.5	10~250 mg/L(以 CaCO ₃ 计)	12h~16 h : 8 h	—
注：“—”表示未做要求。						

为了验证斑马鱼大小对测试结果的影响，编制组组织 9 家实验室分别利用 1 cm~2 cm 的斑马鱼和 2 cm~4 cm 的斑马鱼开展了重铬酸钾急性毒性试验。结果显示，重铬酸钾对不同大小斑马鱼的急性毒性无显著差异，其中，对 1 cm~2 cm 斑马鱼的 24 h LC₅₀ 中位值为 284.8 mg/L（24 h LC₅₀ 值在 186 mg/L~444 mg/L 之间），对 2 cm~4 cm 斑马鱼的 24 h LC₅₀ 中位值为 247.0 mg/L（24 h LC₅₀ 值在 157 mg/L~336 mg/L 之间），两者无统计学差异（P= 0.383）（见图 2）。参照国际上斑马鱼毒性测试的最新要求（OECD 2019 年发布的鱼类急性毒性测试导则，TG No. 203^[4]），同时基于更小的斑马鱼所需要的试样量更少，因此本标准规定受试生物选择性成熟之前、体长为 1 cm~2 cm 的斑马鱼。

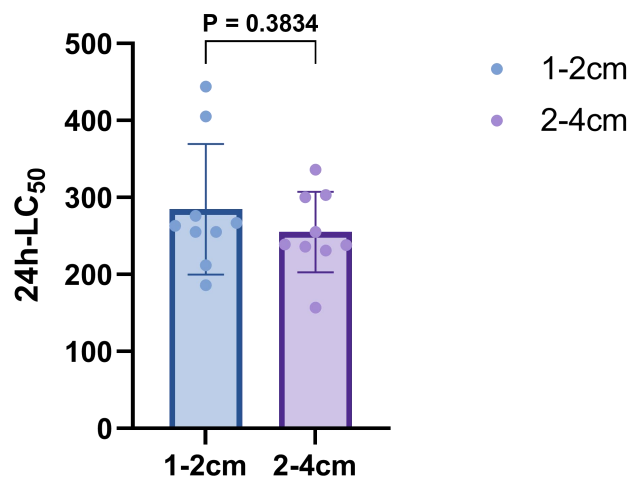


图 2 重铬酸钾对不同大小斑马鱼的急性毒性比较

本标准同时规定，受试生物应来自同一来源和种群，具有同一遗传物质基础，且鱼龄相同，以确保对毒物的敏感程度一致。测试前，受试生物应在规定条件下至少饲养 9 d，其中前 2 d 适应期，后至少 7 d 驯养期。原标准和美国 ASTM 中驯养时间为两周，参考相关国际最新标准和国内其他标准，驯养时间在 7 d~10 d 之间，考虑到驯养 7 d 已完全可以满足斑马鱼对测试条件的适应性，因此驯养时间确定为至少 7 d。驯养时的水质条件和光照条件应与测试时的环境条件一致，即规定驯养条件与测试条件相同，使受试生物提前适应测试条件，因为环境条件改变会干扰受试生物的正常生理活动，从而影响测定结果的准确性。驯养期间（7 d 内）死亡率应≤10%，如果死亡率>10%，则说明该批受试生物存在健康问题或者不能适应测试环境条件，不适合进行毒性测试。如果驯养期间死亡率在 5%~10%，继续驯养 7 d。如果死亡率<5%，可用于测试。

条款 6.2 规定了标准稀释水的配制方法及配制后的水质指标要求。稀释用水推荐采用标准稀释水，标准稀释水宜采用纯水制备，参照 ISO 7346-1 和 GB/T 13267-91，所需试剂包括 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaHCO_3 、 KCl ，均为分析纯，以确保配制的稀释水具有统一的水质标准。此外，参照 OECD TG 203-2019 规定的水质要求，满足标准文本附录 A 要求的脱氯过滤的自来水也可作为稀释用水。

5.2.7 仪器和设备

本标准要求使用化学惰性材质制成的测试容器，避免测试容器中的溶出物或其与样品中的污染物发生化学反应干扰测试。应确保所用材料不对样品中的污染物产生吸附作用，避免样品中污染物浓度降低，影响测试结果。

条款 7.1~7.18 规定了仪器和设备的功能参数，如：用于样品采集的不锈钢采水器、不锈钢筛网（孔径 2 mm~4 mm，10 目~5 目）、聚乙烯（或聚丙烯、聚四氟乙烯）塑料瓶/袋（容积≥5 L）及用于样品运输保存的可移动冷藏箱（具有 6 °C 及以下冷藏功能）；用于水质参数测定的温度计（测量范围 0 °C~40 °C，最小分度为 0.1 °C）、pH 计（测量范围 0~14，最小分度为 0.1 pH 单位）、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)、电导率测定仪(测量范围 0 mS/cm~200 mS/cm, 最小分度为 1 μ S/cm)、硬度计(测量范围 50 mg/L~500 mg/L CaCO₃, 最小分度为 1 mg/L); 用于毒性测试的人工气候箱或恒温室(温控范围 15 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C, 温度控制偏差 $\leq$ 0.5 $^{\circ}$ C, 并能保持光照强度 540 lx~1000 lx)、测试容器(玻璃容器, 如 1 L~5 L 玻璃烧杯, 应满足生物承载量不超过 0.8 g/L, 保证受试生物有充足的溶解氧); 以及用于样品稳定性判定的 COD 测定所用的 TOC 分析仪等。

5.2.8 样品采集、保存及处理

条款 8.1 和 8.2 规定了样品的采集和保存方法。

EPA-821-R-02-012 的 8.3 条款规定了样品的采集方法。对于连续排放的废水, 但连续排放废水在废水处理设施中的滞留时间少于 14 d, 且废水毒性的变化性未知, 则至少在 24 h 内采集 4 个样品或 4 个复合样品。例如, 每 6 h 采集一次样品(总共 4 个样品), 每个样品单独开展试验, 或者连续采集 4 个 6 h 的复合样品, 每个样品单独开展试验。如果连续排放废水在废水处理设施中的滞留时间大于 14 d, 或者可以证明废水在 24 h 内的毒性变化不超过 10%, 无论保留时间如何, 则每个样品单独开展试验。废水处理设施中废水的停留时间可以通过基于调节池容积和废水流入速率的计算来估算。然而, 由于调节池中可能发生短流现象, 计算出的停留时间可能比实际停留时间长得多。当怀疑存在短流现象, 或者沉积物可能已经减少了调节池的有效容积时, 可以通过进行染料示踪实验来获得更准确的停留时间估计。

对于间歇排放的废水, 在每个排放期间的中途采集一个瞬时样品。存在可能情况如下: 当废水在单一的 8 h 工作班次中连续排放时, 采集一个样本; 或者在两个连续的 8 h 工作班次中排放时, 采集两个样本。当设施在 8 h 工作班次中保留废水, 然后以批量方式处理并排放废水时, 采集一个样本。在工作活动结束时, 清理活动可能导致有毒废物的瞬时排放, 这可能需要采样和检测。

本标准规定地表水、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 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。地下水环境监测技术规范(HJ 164-2020), 详细规定了各类地下水包括地下水饮用水水源保护区和补给区、污染源地下水(工业污染源、矿山开采区、加油站、农业污染源、高尔夫球场)等类型地下水的监测点布设方法、采样频次和采样时间和采样方法。地下水采样整体要求, 采集含 VOCs 的样品时执行《地块土壤和地下水中挥发性有机物采样技术导则》(HJ 1019—2019), 出水流速宜 $\leq$ 0.1 L/min; 采集含 SVOCs 水样时出水流速应为 0.2 L/min~0.5 L/min 之间, 其他样品采集时出水流速应 $<$ 1 L/min。

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 $\geq$ 2 h; 生产周期 $>$ 8 h, 采样时间间隔应 $\geq$ 4 h, 每个生产周期内采样频次 $\geq$ 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。为了避免不同批次采集的样品发生变化, 应及时于 6 $^{\circ}$ C 及以下避光保存。

用不锈钢采水器采集不少于 10 L 样品。参考 EPA 821-R-02-012 条款 9.14.2, 采样时,

若样品中有较大的悬浮物或漂浮物，应使用孔径 2 mm~4 mm（12 目~5 目）的筛网去除。样品沿采样瓶（7.3）内壁缓慢倒入，并与瓶塞间不留空隙，宜采集不少于 10 L 的样品，并在采样时测定 pH、DO、电导率等水质参数。

样品采集后应立即放置于冷藏箱的低温容器中，于 6℃ 及以下冷藏避光运输和保存，并在 24 h 以内开展测试；如果不能在 24 h 内开展测试，所采样品送回实验室后应冷冻（-18℃ 及以下）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。到实验室后测定 COD 或 TOC，以便后续质量控制，判断水质是否发生变化。

冷冻保存的样品应在 ≤24℃ 条件下解冻。测试开始前，将样品放置于 22℃~24℃ 温度条件下，待温度达到 22℃~24℃ 后用于测试。应注意不能使用微波炉解冻样品。

采集了地表水、地下水、生活污水（城镇污水处理厂出水）、印染废水、制药废水和农药废水，分别采用上述 2 种预处理方法验证对鱼类急性毒性测定结果的影响，方法 1 为样品 6℃ 冷藏，24 h 内开展测试；方法 2 为 -18℃ 冷冻保存 60 d，24℃ 水浴解冻后开展测试。结果（见表 5）显示，6℃ 冷藏和 -18℃ 冷冻保存 60 d 的样品，毒性测试结果较为一致，说明上述两种样品保存方法是合适的。

表 5 样品鱼类急性测试结果（不同保存方法）

样品	稀释倍数 (D)	受试生物死亡数（尾）							
		1 d		2 d		3 d		4 d	
		方法 1	方法 2	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2
阴性对照组	—	0	0	0	0	0	0	0	0
南京桤溪镇地下水	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	方法 1: LID = 1; 方法 2: LID = 1								
南京桤溪河地表水	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	方法 1: LID = 1; 方法 2: LID = 1								
南京城镇污水处理厂出水	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	方法 1: LID = 1; 方法 2: LID = 1								
山东某印染厂污水处理出水	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.5	0	0	4	2	4	2	4	2
	1	10	6	10	10	10	10	10	10
	方法 1: LID = 2; 方法 2: LID = 2								
山东某印染厂污水处理进水	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	3	2	4	4	4	4
	5	10	10	10	10	10	10	10	10
	4	10	10	10	10	10	10	10	10
	方法 1: LID = 10; 方法 2: LID = 10								
江苏某印染厂污水处理出水	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	方法 1: LID = 1; 方法 2: LID = 1								
江苏某印染厂污水处理进水	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.5	0	0	0	0	2	4	2	4

样品	稀释倍数 (D)	受试生物死亡数（尾）							
		1 d		2 d		3 d		4 d	
		方法 1	方法 2	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2
	1	4	6	10	10	10	10	10	10
	方法 1：LID = 2；方法 2：LID = 2								
江苏某制药厂污水 处理出水	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	6	4	6	6	6	10	6	10
	2	10	10	10	10	10	10	10	10
	1.5	10	10	10	10	10	10	10	10
	方法 1：LID = 10；方法 2：LID = 10								
江苏某制药厂污水 处理进水	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	4	4	4	4
	2	10	10	10	10	10	10	10	10
	1.5	10	10	10	10	10	10	10	10
	方法 1：LID = 10；方法 2：LID = 10								
江苏某农药厂污水 处理出水 1	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	2	2
	2	4	4	8	8	10	10	10	10
	1.33	6	6	10	10	10	10	10	10
	1	8	8	10	10	10	10	10	10
	方法 1：LID = 10；方法 2：LID = 10								
山东某农药厂污水 处理进水	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	4	2	4	2	4	4	4	4
	5	8	6	10	10	10	10	10	10
	1	10	10	10	10	10	10	10	10
	方法 1：LID = 10；方法 2：LID = 10								
山东某农药厂污水 处理出水 2	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	2	0	4	2	4	2	4	2
	4	10	10	10	10	10	10	10	10
	方法 1：LID = 10；方法 2：LID = 10								
注：方法 1 为样品 4 ℃冷藏，24 h 内测试；方法 2 为-18 ℃冷冻保存 60 d、25 ℃水浴解冻后测试。									

条款 8.3 对测试前样品的预处理方法做了详细规定，包括温度、pH 及溶解氧要求。

测试开始前，需将样品的温度调节至 22 ℃~24 ℃，该温度范围与测试温度保持一致。

对于 pH 与溶解氧的要求，本标准分别考虑了两种情况：

（1）需测定 pH 与溶解氧影响在内的急性毒性，不调节样品 pH 值与溶解氧浓度。

（2）需测定排除 pH 与溶解氧影响的急性毒性，而样品 pH 值 >8.5 或 pH <6.0 值时，可使用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节样品 pH 值至 7.0；为降低对样品浓度的影响，注意盐酸溶液或氢氧化钠溶液的使用量应 ≤ 样品体积的 5%。如果调节 pH 值会引起样品中特定污

染物发生变化,则不调节样品 pH 值。当样品的溶解氧浓度 $<4\text{ mg/L}$ 时,可采用曝气的方式充氧 $\leq 20\text{ min}$,充氧后样品溶解氧含量应略小于饱和溶解氧浓度(见附件 F)。如果样品含有挥发性污染物,可采用高纯空气适度充氧,以计泡器计的充氧速度 $\leq 100\text{ 个泡/min}$,以维持测试所需的溶氧浓度,并确保其对样品中挥发性污染物的影响降至最低。

5.2.9 测试步骤

条款 9.1 规定了具体的测试环境条件,测试在恒温水浴槽或恒温光照培养箱中进行。通常,测试容器顶部应敞开,保证试样与空气有充足的接触面,达到氧气交换的目的。但当试样含有挥发性污染物时,测试容器顶部应加盖密闭,避免污染物挥发影响测试结果,及对测试人员造成不必要的危害。

光照强度宜为 $540\text{ lx}\sim 1000\text{ lx}$,光照时间为 $12\text{ h}\sim 16\text{ h}$;温度应保持在 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间。pH 值与测试目的对应,分为两种情况:若需测定包括 pH 影响在内的急性毒性,在样品的 pH 值条件下直接开展测试;若需测定排除 pH 影响的急性毒性,宜在 $6.0\sim 8.5$ 之间选择 pH 值。测试过程中,溶解氧浓度也与测试目的对应,分为两种情况:若需测定包括溶解氧影响在内的急性毒性,在样品的溶解氧条件下直接开展测试;若需测定排除溶解氧影响的急性毒性,测试过程中溶解氧浓度宜 $\geq 4\text{ mg/L}$ (溶解氧饱和度 $\geq 46.7\%$)。

其中 pH 值的规定,主要参考了 OECD TG 203 的 pH 值范围。国外相关标准对测试期间 pH 的规定各不相同,ISO 7346-1 为 7.8 ± 0.2 ,DIN 38412-31-1989 为 7.0 ± 0.2 ,EPA 821-R-02-012 为 $7.4\sim 7.8$,ASTM E1192-97(R2014)未明确,OECD TG 203 为 $6.0\sim 8.5$ 。结合本实验室的经验,pH 值为 $6.0\sim 8.5$ 条件下不会对斑马鱼产生影响。因此,采用 OECD TG 203,规定 pH 值为 $6.0\sim 8.5$ 。另一方面,采用更宽的 pH 值范围更适用于各种类型的样品,减少调节 pH 还可以避免因调节 pH 对毒性结果产生的影响。此外,参照 EPA-821-R-02-012 条款 6.5.4,对于温水、淡水物种,溶解氧浓度不低于 4 mg/L ,溶解氧浓度过低会导致受试生物缺氧引起不良反应。参照 EPA-821-R-02-012 条款 9.14.2,规定测试中,可采用高纯空气适度充氧(不超过 100 个泡/min),维持测试所需的溶氧浓度,并确保其对样品中挥发性污染物的影响降至最低。同时规定单位水体载鱼量 $\leq 0.8\text{ g}$ (湿重)/L,以确保不会因受试生物密度过大造成溶解氧浓度过低而影响测试结果。

污染物浓度相对稳定的样品宜采用静态法(96 h 测试周期内不更换试样),易降解、易挥发的不稳定样品应采用半静态法。稳定性的参考判断方法如下:预试验期间,最高浓度组同时设置一个不加受试生物的平行,用于测量 COD 或 TOC 的变化。如果测试过程中 COD 或 TOC 含量的变化 $>20\%$,则正式试验或限度试验应采用半静态法。

条款 9.2~9.3 详细说明了 LID 测试与 LC_{50} 测试(预试验、限度试验和正式试验)方法。对于 LID 测试,不需进行预试验。用逐级稀释法配制试样,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,配制 1.5 倍和 2 倍的稀释试样,然后逐级稀释。每个浓度组投放 10 尾鱼,不设平行测试条件见 9.1,测试周期为 96 h。

为了便于读者理解稀释操作,稀释操作举例如下:取 500 ml 样品,加入 500 ml 稀释水至 1000 ml ,获得 1 L 稀释倍数为 2 的试样;将该稀释试样摇匀后,取 500 ml ,加入 500 ml

稀释水至 1000 ml, 获得 1 L 稀释倍数为 4 的试样; 将该稀释倍数为 4 的试样摇匀后取 500 ml, 加入 500 ml 稀释水, 至 1000 ml, 获得 1 L 稀释倍数为 8 的试样; 以此类推, 获得稀释倍数分别为 16、32 的试样。另外一组试样稀释操作如下: 取 667 ml 样品加入 333 ml 稀释水, 至 1000 ml, 获得 1 L 稀释倍数为 1.5 的试样; 将该稀释试样摇匀后, 取 500 ml, 加入 500 ml 稀释水至 1000 ml, 获得 1 L 稀释倍数为 3 的试样, 以此类推, 获得稀释倍数分别为 6、12、24 的试样。

对于 LC_{50} 测试, 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 个连续浓度的稀释样品 (试样), 每一浓度投放 5 尾鱼, 以确定样品的毒性范围。预试验不设平行。通过预试验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)。如果一次预试验结果无法确定正式试验所需的浓度范围, 应另选一个浓度范围再次进行预试验。预试验期间, 同时设置一个不加受试生物的最大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。为了便于非生物专业的读者理解换水操作, 根据本实验室的换水操作经验编写换水方法如下: 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 1h, 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。

如果预试验结果显示样品处理组受试生物无死亡, 以样品作为试样开展限度试验, 投放 10 尾鱼, 不设平行, 测试条件见 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。

根据预试验结果确定受试生物死亡率 100% (或最大死亡率) ~ 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 个等比系列浓度的稀释样品进行正式试验。

ASTM E 1192 标准规定, 如果出现以下情况之一或两者, 通常认为 LC_{50} 或 EC_{50} 的计算是不可接受的:

- (1) 所有暴露组受试生物死亡率 $> 37\%$;
- (2) 所有暴露组受试生物死亡率 $< 63\%$ 。

参照上述规定, 本标准规定系列浓度中, 宜包括受试生物死亡率 $\leq 37\%$ 和 $\geq 63\%$ 的 2 个浓度组, 以获得可靠的 LC_{50} 值。正式试验每个浓度组投放 10 尾鱼进行试验, 不设平行, 测试周期为 96 h。

条款 9.4 规定了对照试验要求, 包括空白试验 (阴性对照) 与参比物试验 (阳性对照)。空白试验以稀释水 (6.2.14 或 6.2.15) 为试样开展, LID 法以及 LC_{50} 法均应同步开展空白试验。空白试验不设平行, 投放的受试生物数量与试样组保持一致。参比物试验采用重铬酸钾 (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。

条款 9.5 规定了观测和记录的内容, 包括: 测试开始 0 h 及 96 h, 用照度计 (7.14) 测定并记录测试容器 (7.15) 液面相同高度的光照强度。测试开始 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h, 应定期用温度计 (7.8)、pH 计 (7.9) 和溶解氧测定仪 (7.11) 测量并记录每个浓度组和空白组的温度、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。每日观察并记录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), 出现死鱼时及时清理。本次修订, 规定了“测试结束时, 将存活斑马鱼置于冰水混合物液 (冰的体积不少于 50%) 中 30 min 以上进行安乐死处理。”

5.2.10 结果计算与表示

条款 10 规定了 LID 与 LC_{50} 的确定方法。对于 LID 的确定, 受试生物存活率在 90% 及以上的最低稀释倍数, 即为最低无效应稀释倍数 LID。LID 的确定示例见附录 E。 LC_{50} 的计算可采用寇氏法, 附录 D 介绍了寇氏法的计算步骤, 并以具体数据为例详细说明了具体计算过程。

此外, 因废水类型多样, 生物毒性差异大, 无法确保系列浓度中, 包含受试生物死亡率 $\geq 63\%$ 或 $\leq 37\%$ 的 2 个试样浓度组, 即可能出现数据不充分, 无法计算 LC_{50} 或不需要计算 LC_{50} 的情形。因此, 规定了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)。

5.2.11 有效性、敏感性及精密度

测试结果的有效性与受试生物的敏感性具体见质量控制要求。

根据 6 家方法验证实验室的对阴性对照、参比物重铬酸钾的测试结果, 有效性与敏感性均符合要求。6 家实验室分别测定阴性对照, 重复 6 次, 死亡率均为 0%, 满足 $\leq 10\%$ 的要求。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 LC_{50} 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。

精密度的计算方法参考了 HJ 168-2020。6 家实验室分别测定了生活污水、地表水、地下水、工业废水以及 3 个不同浓度的模拟样品对斑马鱼的急性毒性。分别计算了 LID、96 h LC_{50} 的实验室内与实验室间的相对标准偏差, 以表示测试结果的精密度 (详见方法验证报告)。因 LID 测试结果呈倍数关系, 重复性限与再现性限并不适用。生活污水、地表水、地下水每个样品测定 6 次。LID 均为 1, 96 h LC_{50} 均大于 100%。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 LC_{50} 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%。

因 LID 测试结果呈倍数关系, 重复性限与再现性限并不适用。6 家实验室分别以标准稀释水配制加标浓度依次为 200 mg/L、800 mg/L 以及 3200 mg/L 重铬酸钾溶液, 作为低毒、中毒、高毒模拟样品, 进行 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%。

5.2.12 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%。

5.2.13 质量保证和质量控制

条款 12 规定了空白试验和参比物结果及测试条件应符合下列要求应满足下列要求，测试结果方为有效。“测试结束时空白组鱼死亡率≤10%，意味着若每组鱼不到 10 尾，则对照组鱼死亡数不得超过 1 尾”，阴性对照组受试生物死亡率过高说明受试生物本身存在质量问题，试验组中的死亡率并非完全由试样导致。

参照 GB T 13267 -91 中规定，在相同的测试条件下，以重铬酸钾为参考毒物的参比物试验得到的 24 h LC₅₀ 应在 200 mg/L~400 mg/L 范围内。经 6 家实验室测试验证，参比物重铬酸钾的 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，因此，本标准规定参比物重铬酸钾 24 h LC₅₀ 应为 200 mg/L~400 mg/L，每批次的受试生物应开展一次参比物试验（见附录 C）。此外，测试条件应符合 9.1 测试环境条件要求。

5.2.14 测试报告

条款 13 规定了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) 受试生物的种名、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。

5.2.15 附录

包括附录 A~附录 E 共 5 个附录，其中，附录 A、附录 C、附录 D 和附录 E 是资料性附录，附录 B 是规范性附录。

附录 A：斑马鱼全长测量示意图，参考 OECD TG 203-2019 编写。

附录 B：稀释用水的水质参数及浓度限值，参考 OECD TG 203-2019 编写。

附录 C：重铬酸钾对受试生物（斑马鱼，*Danio rerio*）的急性毒性测试，为规范参比物的测试编写。

附录 D：寇氏（Karber）法计算 EC₅₀ 示例，参考 HJ 1069-2019 附录 G 相关内容编写。

附录 E：废水对斑马鱼（*Danio rerio*）急性毒性的 LID 测定示例。

6 方法验证结果

6.1 实验室内验证

6.1.1 稀释水验证

对稀释水进行了实验室内验证，斑马鱼死亡率结果见表 6。验证结果表明，满足阴性对照组受试生物死亡率 $\leq 10\%$ 的质控要求。

表 6 稀释水精密度验证数据（24 h 受试生物死亡率）

样品	试验号						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
稀释水	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0	0	0

6.1.2 参比物验证

对重铬酸钾开展了参比物毒性试验，重复 6 次，计算受试生物的死亡率与 24 h LC_{50} ，检验其是否符合重铬酸钾的 24 h LC_{50} 应在 200 mg/L~400 mg/L 范围内的质控要求。6 次实验结果显示，重铬酸钾对斑马鱼的 LC_{50} 范围为 255.7~289.3 mg/L，中位值为 267.4 mg/L，在 200 mg/L~400 mg/L 范围内，符合质控要求。

表 7 重铬酸钾精密度验证数据（24 h 受试生物存活率）

浓度 (mg/L)	试验号						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
100	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
150	80%	80%	90%	80%	80%	80%	82%	0.041	5.0%
225	60%	70%	70%	60%	60%	60%	63%	0.052	8.2%
338	50%	50%	50%	40%	50%	40%	47%	0.052	11.1%
506	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
LC_{50} (mg/L)	267.4	278.9	289.3	255.7	267.4	255.7	—	—	—
95%置信区间	209.1~ 351.5	219.5~ 365.8	232.0~ 369.3	201.4~ 329.7	209.1~ 351.5	201.4~ 329.7	—	—	—

注：“—”表示无法计算，下同

6.1.3 实际样品验证

采集了城镇污水处理厂出水、地表水、地下水、农药厂污水处理废水、印染厂污水处理出水、印染厂污水处理进水、制药厂污水处理出水等样品，进行了斑马鱼急性毒性测定验证，结果见表 8~表 9。

表 8 实际样品精密度验证数据（96 h 受试生物存活率）

样品	稀释倍数 (D)	试验号						$\bar{X}_i$	S _i	RSD _i
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆			
南京桡溪河地表水	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
南京桡溪镇地下水	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
南京城镇污水处理厂出水	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
江苏某农药厂污水处理出水	10	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
	4	80%	80%	80%	70%	80%	80%	78.3%	0.041	5.2%
	2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
	1.5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
	1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
山东某印染厂污水处理进水	20	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
	10	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
	6	70%	60%	70%	70%	60%	70%	66.7%	0.052	7.8%
	5	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
	4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
江苏某印染厂污水处理进水	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
	1.5	60%	50%	60%	50%	40%	60%	53.3%	0.082	15.4%
	1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
江苏某印染厂污水处理出水	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
江苏某制药厂污水处理出水	16	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%
	8	70%	80%	70%	80%	80%	80%	76.7%	0.052	6.8%
	4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—
	2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00	—

表 9 实际样品验证测试结果（96 h LC₅₀ 与 LID）

样品	指标	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
南京桡溪河地表水	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
南京桡溪镇地下水	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
南京城镇污水处理厂出水	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
江苏某印染	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

样品	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
厂污水处理出水	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
山东某印染厂污水处理进水	96 h LC ₅₀	17.0%	17.0%	17.0%	17.0%	16.9%	17.0%
	95%置信区间	13.1%~18.7%	13.3%~18.7%	13.1%~18.7%	13.1%~18.7%	12.8%~18.6%	13.1%~18.7%
	LID	10	10	10	10	10	10
江苏某农药厂污水处理出水	96 h LC ₅₀	30.6%	30.6%	30.6%	28.5%	30.6%	30.6%
	95%置信区间	24.2%~43.1%	24.2%~43.1%	24.2%~43.1%	22.5%~45.4%	24.2%~43.1%	24.2%~43.1%
	LID	10	10	10	10	10	10
江苏某印染厂污水处理进水	96 h LC ₅₀	68.4%	66.8%	68.4%	66.8%	65.2%	68.4%
	95%置信区间	66.9%~71.2%	65.2%~68.5%	66.9%~71.2%	65.2%~68.5%	63.4%~66.6%	66.9%~71.2%
	LID	2	2	2	2	2	2
江苏某制药厂污水处理出水	96 h LC ₅₀	13.3%	13.8%	13.3%	13.8%	13.8%	13.8%
	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	16	16	16	16	16	16

本实验室对生活污水、地表水、地下水及工业废水等样品进行了斑马鱼急性毒性的验证测定，每个样品各测定 6 次。结果显示，生活污水、地表水、地下水与江苏某印染厂出水样品的 LID 均为 1，96 h LC₅₀ 均大于 100%；各样品对斑马鱼致死率的相对标准偏差均为 0.0%。江苏某农药厂污水处理出水、山东某印染厂污水处理进水、江苏某印染厂污水处理进水和江苏某制药厂污水处理出水样品的 LID 分别为 10、10、2、16，96 h LC₅₀ 分别为 28.5%~30.6%、16.9%~17.0%、65.2%~68.4%和 13.3%~13.8%；各样品对斑马鱼存活率的相对标准偏差分别为 0%~5.2%、0%~7.8%、0%~15.4%、0%~6.8%。

6.2 实验室间方法验证

6.2.1 方法验证方案

按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，组织 6 家有资质的实验室进行实验室间验证，主要内容为方法精密度及有效性的验证试验。

实施方法验证前，编制组根据初步制订好的标准文本设计了实验作业指导书和验证方案并通过专家论证后，联系并分发实验作业指导书及验证方案至参加验证的 6 家实验室，确定具有生物监测上岗资质的技术人员，具备检定有效期内的相关仪器设备，提前采购并配置好所需试剂，协调验证试验同步开始的时间。

精密度的验证：方法验证样品为地表水、生活污水（二级出水）、工业废水（某农药厂排放口出水）以及地下水，样品由编制单位生态环境部南京环境科学研究所统一提供。样品采集后装于聚乙烯瓶，并标识样品编号，每个样品 10 L，4℃±2℃避光运输并在 48 h 运送至验证实验室。各验证实验室进行最低无效应稀释倍数 LID 与 LC₅₀ 的测定，以上样品均

测定 6 次，分别计算 LID 与 LC₅₀ 及不同处理受试生物的死亡率、标准偏差、相对标准偏差。同时，采用模拟样品（配制见正确度的验证），6 家实验室各进行 6 次 LID 的测定，计算实验室内与实验室间 LID 值的标准偏差、相对标准偏差。

正确度的验证：各实验室自行以标准稀释水配制加标浓度依次为 200 mg/L、800 mg/L 以及 3200 mg/L 的重铬酸钾溶液，作为低毒、中毒、高毒模拟样品，进行 6 次 96 h 最低无效应稀释倍数 LID 的测定。依据《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168—2020），采用 LID 的相对误差表征正确度。

有效性的验证：各实验室自行采购重铬酸钾，并以自制的标准稀释水配制成试样进行斑马鱼急性毒性的测定，检验是否符合 24 h LC₅₀ 为 200 mg/L~400 mg/L、空白组鱼死亡率≤10%的质控要求。

编制组最终将《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，编制验证报告（详见附件）。

6.2.2 方法验证结果

6.2.2.1 方法的精密度

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%（表 10）。生活污水、地表水、地下水 LID 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%（表 11）。表中实验室 1：中国环境监测总站；2：沈阳沈化院测试技术有限公司；3：中国科学院广东微生物研究所；4：浙江省生态环境监测中心；5：贵州健安德科技有限公司；6：江苏省常州环境监测中心，下同。

表 10 生活污水、地下水以及地表水样品验证结果（LID 与 96 h LC₅₀）

实验室	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
2	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
3	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
4	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
5	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
6	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

表 11 生活污水、地下水以及地表水样品精密度验证结果（LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
2	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
3	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
4	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
5	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
6	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
$\bar{x}$	1								
S'	0.0								
RSD_i	0.0%								

注： $\bar{X}_i$ ：第 i 个实验室测试结果的平均值； S_i ：第 i 个实验室测试结果的标准偏差； RSD_i ：第 i 个实验室测试结果的相对标准偏差； $\bar{x}$ ：所有实验室测试结果的平均值； S' ：实验室间标准偏差； RSD' ：实验室间相对标准偏差。（下同）

6 家实验室分别对工业废水（江苏某农药厂排水），进行了斑马鱼急性毒性的测定，每个样品测定 6 次。LID 为 3~4，96 h LC₅₀ 为 41.2%~61.1%（表 12）。由于生物毒性测试采用的稀释倍数之间的绝对差值较大，会导致 LID 值的重复性限和再现性限统计结果出现较大变异。因此，本标准采用实验室和实验室间相对标准偏差表征精密度。LID 实验室内相对标准偏差为 0%~15.7%，实验室间相对标准偏差为 5.35%（表 13）。96 h LC₅₀ 实验室内相对标准偏差为 1.46%~5.20%，实验室间相对标准偏差为 9.92%（表 14）。

表 12 工业废水样品验证结果（LID 与 96 h LC₅₀）

实验室	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	LID	4	4	4	4	4	4
	96 h LC ₅₀	49.1%	47.7%	43.8%	47.7%	45.3%	43.2%
	95%置信限	41.3%~65.6%	39.7%~63.2%	36.6%~56.6%	39.7%~63.2%	38.1%~58.2%	36.6%~56.6%
2	LID	3	4	4	4	3	4
	96 h LC ₅₀	46.9%	46.8%	43.8%	43.8%	46.9%	43.8%
	95%置信限	—	37.3%~69.1%	34.9%~58.8%	34.9%~58.8%	—	34.9%~58.8%
3	LID	3	4	3	4	4	3
	96 h LC ₅₀	61.1%	54.4%	56.2%	54.4%	54.4%	56.2%
	95%置信限	—	42.7%~92.3%	—	42.7%~92.3%	42.7%~92.3%	—
4	LID	3	4	4	4	4	4
	96 h LC ₅₀	47.8%	47.7%	47.7%	49.1%	46.8%	47.7%
	95%置信限	—	39.7%~63.2%	39.7%~63.2%	41.3%~65.6%	39.4%~59.4%	39.7%~63.2%

实验室	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
5	LID	4	4	4	4	4	4
	96 h LC ₅₀	44.0%	43.0%	44.0%	44.0%	41.2%	42.9%
	95%置信限	37.2%~ 54.5%	36.5%~ 53.8%	37.6%~ 54.5%	37.6%~ 54.5%	35.1%~ 50.2%	36.1%~ 51.0%
6	LID	4	4	3	4	4	3
	96 h LC ₅₀	51.7%	54.6%	53.1%	49.1%	49.2%	53.1%
	95%置信限	43.3%~ 72.5%	45.3%~ 78.9%	—	41.3%~ 65.6%	41.3%~ 65.6%	—

表 13 工业废水样品精密度验证结果（LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	4	4	4	4	4	4	4.00	0.00	0.0%
2	3	4	4	4	3	4	3.67	0.52	14.1%
3	3	4	3	4	4	3	3.50	0.55	15.7%
4	3	4	4	4	4	4	3.83	0.41	10.6%
5	4	4	4	4	4	4	4.00	0.00	0.0%
6	4	4	3	4	4	3	3.67	0.52	14.1%
$\bar{x}_i$	3.78								
S'	0.202								
RSD_i	5.35%								

表 14 工业废水样品精密度验证结果（96 h LC₅₀）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	49.1%	47.7%	43.8%	47.7%	45.3%	43.2%	46.1%	0.024	5.20%
2	46.9%	46.8%	43.8%	43.8%	46.9%	43.8%	45.3%	0.017	3.75%
3	61.1%	54.4%	56.2%	54.4%	54.4%	56.2%	56.1%	0.026	4.63%
4	47.8%	47.7%	47.7%	49.1%	46.8%	47.7%	47.8%	0.007	1.46%
5	44.0%	43.0%	44.0%	44.0%	41.2%	42.9%	43.2%	0.011	2.55%
6	51.7%	54.6%	53.1%	49.1%	49.2%	53.1%	51.8%	0.022	4.25%
$\bar{x}_i$	48.4%								
S'	0.048								
RSD_i	9.92%								

6 家实验室对不同浓度重铬酸钾模拟样品（200 mg/L、800 mg/L、3200 mg/L）进行了斑马鱼急性毒性的测定，每个样品测定 6 次。低毒模拟样品（200 mg/L）LID 为 2~3，实验室内相对标准偏差为 0%~18.8%，实验室间相对标准偏差为 4.37%（表 15）；中毒模拟样品（800 mg/L）LID 为 8~10，实验室内相对标准偏差为 0%~9.79%，实验室间相对标准偏差

为 1.64%（表 16）；高毒模拟样品（3200 mg/L）LID 为 32~48，实验室内相对标准偏差为 0%~22.1%，实验室间相对标准偏差为 6.44%（表 17）。

表 15 低毒模拟样品精密度验证结果（200 mg/L，LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	2	2	3	2	2	2	2.17	0.408	18.8%
2	2	3	2	2	2	2	2.17	0.408	18.8%
3	2	2	2	2	2	2	2.00	0.000	0.00%
4	2	2	3	2	2	2	2.17	0.408	18.8%
5	2	2	2	2	2	2	2.00	0.000	0.00%
6	2	2	2	2	2	2	2.00	0.000	0.00%
$\bar{x}_i$	2.08								
S'	0.091								
RSD_i	4.37%								

表 16 中毒模拟样品精密度验证结果（800 mg/L，LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	8	10	8	8	8	8	8.33	0.82	9.79%
2	10	8	8	8	8	8	8.33	0.82	9.8%
3	8	8	8	8	8	10	8.33	0.82	9.79%
4	10	8	8	8	8	8	8.33	0.82	9.79%
5	8	8	8	8	8	10	8.33	0.82	9.79%
6	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0.0%
$\bar{x}_i$	8.28								
S'	0.136								
RSD_i	1.64%								

表 17 高毒模拟样品精密度验证结果（3200 mg/L，LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	32	32	48	32	48	32	37.3	8.26	22.1%
2	48	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
3	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0.00%
4	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0.00%
5	32	48	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
6	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0.0%
$\bar{x}_i$	33.8								
S'	2.18								
RSD_i	6.44%								

6.2.2.2 方法的正确度

6家实验室对《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》的准确度进行验证,使用加标模拟样品进行测定,测定6次。分别用标准稀释水配制浓度为200 mg/L(约96 h LC₁₀的2倍)、800 mg/L(约96 h LC₅₀的2倍)和3200 mg/L(96 h LC₉₀的2倍)的重铬酸钾溶液,作为低毒、中毒与高毒模拟样品。依据《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020),采用LID的相对误差表征正确度。结果显示(表18~表20),不同浓度(200 mg/L、800 mg/L和3200 mg/L)的加标模拟样品,6家实验室的LID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%。

表 18 低毒模拟样品(200 mg/L) LID 测试结果

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	平均值	$\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$
1	2	2	3	2	2	2	2.08	4.00%±0%
2	2	3	2	2	2	2		
3	2	2	2	2	2	2		
4	2	2	3	2	2	2		
5	2	2	2	2	2	2		
6	2	2	2	2	2	2		

表 19 中毒模拟样品(800 mg/L) LID 测试结果

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	平均值	$\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$
1	8	10	8	8	8	8	8.44	1.75%±1.36%
2	10	8	8	10	8	8		
3	8	8	8	8	8	10		
4	10	8	8	8	8	8		
5	8	8	8	8	8	10		
6	8	10	10	8	8	8		

表 20 高毒模拟样品(3200 mg/L) LID 测试结果

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	平均值	$\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$
1	32	32	48	32	48	32	33.8	2.28%±4.47%
2	48	32	32	32	32	32		
3	32	32	32	32	32	32		
4	32	32	32	32	32	32		
5	32	48	32	32	32	32		
6	32	32	32	32	32	32		

6.2.2.3 方法的有效性

6家实验室对水质急性毒性的测定斑马鱼法的有效性进行验证,使用标准稀释水阴性对

照和重铬酸钾参比物进行测定。结果见表 21 和表 22，所有阴性对照斑马鱼存活率达 100%、重铬酸钾 24 h LC₅₀ 均在 200 mg/L~400 mg/L 之间，符合质控要求。

表 21 阴性对照样品方法有效性及敏感性验证数据表（受试生物存活率）

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	范围	结论
1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	符合存活率≥90%的要求
2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
5	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
6	100%	100%	100%	100%	90%	100%	—	

表 22 参比物重铬酸钾方法有效性及敏感性验证数据表

实验室	24h LC ₅₀ （mg/L）	95%置信区间（mg/L）	结论
1	259	179~374	符合 200 mg/L~400 mg/L 范围要求
2	250	225~279	
3	304	253~404	
4	264	185~378	
5	297	260~357	
6	260	179~374	

7 与开题报告的差别说明

在开题论证会文本草案的基础上，根据函审专家以及征求意见稿技术审查会专家的意见，主要修改内容汇总如下：

- （1）标准名称：修改为《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》，与已发布的《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》（HJ 1069-2019）、正在修订的《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》（1158）相一致。
- （2）适用范围：与标准第 9 部分的内容对应，修改适用范围第 3 段描述的 2 种急性毒性测定方法，将静态法和半静态法修改为 LID 法和 LC₅₀ 法。增加海水为不适用条款。
- （3）规范性引用文件：增加电导率的测试方法标准（GB/T 13580.3），修改 COD 的测试方法标准（HJ 828）。
- （4）术语定义：增加术语“试样”。
- （5）样品采样、保存与预处理：8.1 节补充了样品采集的瞬时样品、混合样品的采样要求。
- （6）测试步骤：9.1.7 试样的稳定性增加半静态法的换水方法；9.3.1 预试验时判断试样稳定性的测试指标，增加了 COD 或 TOC 指标。将空白试验的技术要求集中到 9.4.1 描述。

(7) 有效性、敏感性与精密度：根据全国 6 家实验室的参比物比对试验结果，明确了参比物的有效性范围为 200 mg/L~400 mg/L 以及精密度参数。

(8) 增加附录 A 斑马鱼全长测量示意图。

表 23 函审专家意见及修改情况

章节	专家意见	修改内容
条款 8.1.1	补充地表水采样地下水方法，特别是地下水采样要求	采样方法增加了 HJ 1019；
明确 标准 中易 引起 歧义 的地 方	“符合 GB/T 39649 要求”是符合标准的所有要求，还是 4 的要求？	已修改为“符合 GB/T 39649 种质鉴定要求”。
	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。”应说明加盖后怎么保证水中溶解氧？	8.3.3 和 9.1.4 部分明确了溶解氧不足时采取的措施。
	分析 COD 或 TOC 的样品是单独采样，还是在采回来的样品中取样？如果是分别采的两瓶或多瓶试样，请明确怎么取样分析，如果样品需保存，保存前是否分析？	8.2.2 修改为“样品到实验室后，混合均匀后，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。”
	附录 C 中的“C.1 从每批次受试生物随机抽取一定数量的斑马鱼”请明确是已购买批次还是每次的试验批次？等。	修改为“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”。
条款 6.1	测试环境条件建议：参考 GB/T 39649 实验鱼养殖水环境指标。	参照 ISO 7346-1~2、OECD TG 203-2019、GB/T 39649、GB/T 13267-91 和 GB/T 31270.12-2014 等标准（编制说明表 4），结合本实验室多年斑马鱼饲养经验，条款 6.1 对斑马鱼饲养的水环境条件（温度、pH、硬度、光照）做了具体要求。斑马鱼最合适的饲养条件为：水温 22℃~24℃，pH 值 6.0~8.5，水质硬度 40 mg/L~250 mg/L（以 CaCO ₃ 计），光暗比：16 h : 8 h~12 h : 12 h；光照度：540 lx~1000 lx；溶解氧：≥7.1 mg/L（溶解氧饱和度 ≥80%）。

条款 8.1.2	规范表述，例：“采样时，若样品中有较大的悬浮物或漂浮物，可使用筛网（7.2）去除。样品沿采样瓶（7.3）内壁缓慢倒入，与瓶塞间不留空隙”，建议修改成：采样时，若样品中有较大的悬浮物或漂浮物，可使用筛网（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；水样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。	按要求修改。
条款 6.1.1	野生型（AB 品系，具有物种鉴定记录）” 建议明确鉴定内容或在附录增加相关内容。	已修改为“符合 GB/T 39649 种质鉴定要求的斑马鱼”。 GB/T 39649 规定：种质鉴定如形态符合要求,判定为合格;形态不可检验时,进行 DNA 条形码检验,序列歧异度小于或等于 1.0%,判定为合格。
编制说明	补充饲养条件，特别是水环境条件的研究或文献资料	已补充，见编制说明 5.2.6 参照 ISO 7346-1~2、OECD TG 203-2019、GB/T 39649、GB/T 13267-91 和 GB/T 31270.12-2014 等标准（表 4），结合本实验室多年斑马鱼饲养经验，条款 6.1 对斑马鱼饲养的水环境条件（温度、pH、硬度、光照）做了具体要求。斑马鱼最合适的饲养条件为：水温 22℃~24℃，pH 值 6.0~8.5，水质硬度 40 mg/L~250 mg/L（以 CaCO ₃ 计），光暗比：16 h : 8 h~12 h : 12 h；光照度：540 lx~1000 lx；溶解氧：≥7.1 mg/L（溶解氧饱和度≥80%）。
编制说明	补充采样环节的研究情况或文献资料	已补充 EPA-821-R-02-012 的 8.3 条款规定的样品采集方法，见编制说明 5.2.8

8 标准实施建议

本方法标准是系列水质急性毒性测定方法之一，旨在构建以生物毒性及特征污染物控制为目标的工业废水达标排放技术体系，对污水排放的综合毒性（急性毒性）进行有效监管。通过推广和应用本标准，将有助于控制和降低污水中的有毒有害物质，减少水生态环境污染，提高水质监测水平和污染治理效果，保障水生态健康安全，推动绿色可持续发展。

本标准的实施可从以下方面开展：

(1) 更新污水排放标准：集中式污水处理厂及涉及污水排放的工业行业（如农药、纺织印染、电镀、化工、电子等）应逐步将本标准纳入综合毒性控制指标。这将有助于识别潜在的高风险污染物和污染源，及时采取措施进行治理和控制，防止水环境污染事件的发生，为应对新污染物的威胁提供技术支撑。

(2) 更新环境质量标准：将本标准纳入地表水和地下水的环境质量标准中，作为综合毒性控制指标。这有助于全面评价水体中污染物的综合影响，更准确地评估生态环境质量，进一步保护水生生物及其他生态系统成员的健康。

(3) 更新生态环境损害鉴定评估技术指南：在生态环境损害鉴定评估技术指南中，更新基于斑马鱼的水质毒性调查监测要求，以更好地进行生态环境损害调查和评估。

9 参考文献

- [1] ISO 7346-1:1996, Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 1: Static method[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 1996.
- [2] GB/T 13267-1991, 水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 1991.
- [3] ISO 7346-2:1996, Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 2: Static method[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 1996.
- [4] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. [S]. Paris: OECD, 2019.
- [5] EPA 821-R-02-012, Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to Freshwater and marine organisms [S]. 5th edn. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2002.
- [6] GB/T 21814-2008, 工业废水的试验方法 鱼类急性毒性试验[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 2008.
- [7] JIS K 0102-71-1998, Testing methods for industrial wastewater[S]. Tokyo: JISC, 1998.
- [8] GB 21903-2008, 发酵类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 2008.
- [9] GB 21904-2008, 化学合成类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 2008.
- [10] GB 21905-2008, 提取类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 2008.
- [11] GB 21906-2008, 中药类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 2008.
- [12] GB 21907-2008, 生物工程类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京：国家标准化管理委员会, 2008.
- [13] GB 21908-2008, 混装制剂类制药工业水污染物排放标准[S]. 北京：国家标准化管理委

员会, 2008.

- [14] GB 39731-2020, 电子工业水污染物排放标准[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [15] E1192-97(reapproved 2014), Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians[S]. ASTM Committee, 2014.
- [16] Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.1075. Freshwater and Marine Fish Acute Toxicity Test[S]. EPA 712-C-16-007, 2016.
- [17] DIN 38412-31-1989, German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determining the tolerance of fish to the toxicity of waste water by way of a dilution series (L 31) [S]. Beuth Verlag GmbH, Berlin, 1989.
- [18] ISO 7346-3:1996, Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 3: Flow through method[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 1996.
- [19] HJ 1069-2019, 水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法[S]. 北京: 生态环境部, 2019.
- [20] GB/T 27861-2011, 化学品 鱼类急性毒性试验[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2011.
- [21] GB/T 31270.12-2014, 化学农药环境安全评价试验准则 第 12 部分: 鱼类急性毒性试验 [S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2014.
- [22] DB32/T 3979-2021, 实验用斑马鱼 饲养技术条件[S]. 江苏: 江苏省市场监督管理局, 2021.
- [23] 华鹤松.水中饱和溶解氧的理论关系式[J].环境科学,1984,(06):62-65.
- [24] GB 21523-2024, 农药工业水污染物排放标准[S]. 北京: 生态环境部, 2024.

附件

方法验证报告

方法名称： 水质 急性毒性的测试 斑马鱼法

项目主编单位： 生态环境部南京环境科学研究所

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

项目负责人及职称： 石利利 研究员

通讯地址： 南京市栖霞区纬地路 9 号江苏生命科技创新园 F3 栋

电话： 13951035647

报告编写人及职称： 吉贵祥 研究员

报告日期： 2024 年 11 月 10 日

前言

本方法的 6 家验证实验室分别为 1) 中国环境监测总站；2) 沈阳沈化院测试技术有限公司；3) 中国科学院广东微生物研究所；4) 浙江省生态环境监测中心；5) 贵州健安德科技有限公司；6) 江苏省常州环境监测中心。按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，组织开展方法验证。主要工作内容是方法精密度及有效性验证试验。方法验证前，编制组根据初步制订好的标准文本设计了作业指导书和验证方案并经专家论证，然后分发至参加验证的 6 家实验室，确定具有生物监测上岗资质的技术人员，具备检定有效期内的相关仪器设备，提前采购并配置所需试剂，协调验证试验同步开始的时间。

精密度的验证：编制组分别将工业废水（采自江苏丰登作物保护股份有限公司排放口水）、生活污水（采自南京市城东污水处理厂二级出水）、地表水（采自南京市桡溪河）、地下水（采自南京市桡溪镇深井水）于 4℃±2℃避光运送至各验证实验室，各验证实验室进行最低无效应稀释倍数 LID 与 LC₅₀ 的测定，分别测定 6 次，并分别计算不同验证样品的 LID 与 LC₅₀、标准偏差、相对标准偏差。生活污水、地表水、地下水 LID 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%。工业废水 LID 为 3~4，96 h LC₅₀ 为 41.2%~61.1%；LID 实验室内相对标准偏差为 0%~15.7%，实验室间相对标准偏差为 5.35%；96 h LC₅₀ 实验室内相对标准偏差为 1.46%~5.20%，实验室间相对标准偏差为 9.92%。

正确度：编制组分别用标准稀释水配制浓度为 200 mg/L（约 96 h LC₁₀ 的 2 倍）、800 mg/L（约 96 h LC₅₀ 的 2 倍）和 3200 mg/L（96 h LC₉₀ 的 2 倍）的重铬酸钾溶液，作为低毒、中毒与高毒模拟样品。各验证实验室进行最低无效应稀释倍数 LID 测定，分别测定 6 次，并分别计算不同验证样品的 LID 的相对误差 $\overline{RE} \pm 2 \overline{SRE}$ 。不同浓度（200 mg/L、800 mg/L 和 3200 mg/L）的加标模拟样品，6 家实验室的 LID 相对误差 $\overline{RE} \pm 2 \overline{SRE}$ 分别为 4.00% ± 0%、1.75% ± 1.36%、2.28% ± 4.47%。

有效性及敏感性的验证：各比对实验室采用参比物重铬酸钾开展鱼类急性毒性试验，检验重铬酸钾急性毒性测试结果符合本标准推荐的 24 h LC₅₀ 范围（200 mg/L~400 mg/L），以验证斑马鱼的敏感性，确认测试结果的有效性。

编制组最终将《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，并编制验证报告。

A. 1 原始测试数据

A. 1. 1 实验室基本情况

附表 1 参加验证的人员情况登记表

姓名	职务或职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
金小伟	教授级高工	14	沈阳沈化院测试技术有限公司
杨海荣	部门经理	23	
宋京洋	助理工程师	5	
祝新茗	助理工程师	5	

姓名	职务或职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
马月	助理工程师	5	中国科学院广东微生物研究所
梅承芳	正高级工程师	18	
陈桂兰	助理研究员	10	
许玉洁	助理工程师	8	
周胜利	高工	13	浙江省生态环境监测中心
梁涛	工程师	2	
赵亚洲	工程师	8	贵州健安德科技有限公司
杨迪	助理工程师	4	
班羽	试验人员	1	
徐东炯	正高级工程师	35	江苏省常州环境监测中心
沈丽娟	高工	18	
张小琼	高工	22	

附表 2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	性能状况	备注
电子天平	BL-410S, 丹纳赫西特; XS205DU, 梅特勒-托利多	正常	中国环境监测总站
温度计、pH 计	HQ11D, HACH	正常	
溶氧仪	HQ30d, HACH	正常	
电子分析天平	XS205DU, 梅特勒托利多	正常	沈阳沈化院测试技术有限公司
pH 计	HQ40d PH, 哈希	正常	
硬度试剂盒	LR, 广东环凯微生物科技有限公司	正常	
溶解氧仪	HQ40d D.O., 哈希	正常	
电子天平	BS223S 德国赛多利斯	正常	中国科学院广东微生物研究所
电子数显卡尺	SF2000 桂林广陆数字测控股 份有限公司	正常	
pH 测试仪	pH3210 德国 WTW	正常	
溶解氧测试仪	Oxi 3210 德国 WTW	正常	
照度计	T-10A KONICA MINOLTA	正常	
电子天平	MS105DU, 精度 0.1 mg, 梅特 勒托利多, 瑞士	正常	浙江省生态环境监测中心
溶氧仪、温度计、pH 计	HQ40d, 美国哈希公司	正常	
硬度计	16900, 美国哈希公司	正常	
电子天平	EL204, 梅特勒-托利多	正常	贵州健安德科技有限公司
便携式多功能参数测试 仪	SG98-FK2, 梅特勒-托利多	正常	
便携式水质硬度仪	YD300, 上海三信仪表厂	正常	
水质参数分析仪	HQ 40d, 哈希	正常	江苏省常州环境监测中心
游标卡尺	CD-10AX, 日本 Mitutoyo	正常	
电子天平	ME3002E, 梅特勒-托利多	正常	

附表 3 参比物信息登记表

名称	来源、规格	备注
重铬酸钾	百灵威试剂有限公司，纯度≥99.8%	中国环境监测总站
重铬酸钾	纯度≥99.8%	沈阳沈化院测试技术有限公司
重铬酸钾	广州化学试剂厂，纯度≥99.8%	中国科学院广东微生物研究所
重铬酸钾	默克，纯度 99.98%	浙江省生态环境监测中心
重铬酸钾	天津科密欧化学试剂有限公司，纯度 99.92%	贵州健安德科技有限公司
重铬酸钾	上海源叶生物科技有限公司，纯度 99%	江苏省常州环境监测中心

附表 4 受试生物信息

名称	来源、规格	备注
斑马鱼	由实验室自行繁殖、饲养 全长 1.44 cm~1.62 cm	中国环境监测总站
斑马鱼	由实验室自行繁殖、饲养 全长 1.55 cm~1.65 cm	沈阳沈化院测试技术有限公司
斑马鱼	惠州鱼乐乐水族馆 全长 1 cm~2 cm	中国科学院广东微生物研究所
斑马鱼	中国科学院水生生物研究所 范围为 1.67 cm~1.88 cm	浙江省生态环境监测中心
斑马鱼	上海宏业观赏鱼养殖场 全长 1 cm~2 cm	贵州健安德科技有限公司
斑马鱼	由实验室自行繁殖、驯养 全长 1 cm~2 cm	江苏省常州环境监测中心

A. 1. 2 精密度

6 家验证单位对《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》的精密度进行验证，使用生活污水（南京城东污水处理厂出水）进行测定，测定 6 次。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%（附表 5）。生活污水、地表水、地下水 LID 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%（附表 6）。

附表中实验室 1：中国环境监测总站；2：沈阳沈化院测试技术有限公司；3：中国科学院广东微生物研究所；4：浙江省生态环境监测中心；5：贵州健安德科技有限公司；6：江苏省常州环境监测中心，下同。

附表 5 生活污水、地下水以及地表水样品验证结果 (LID 与 96 h LC₅₀)

实验室	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
2	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
3	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
4	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
5	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
6	LID	1	1	1	1	1	1
	96 h LC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

附表 6 生活污水、地下水以及地表水样品精密度验证结果 (LID)

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
2	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
3	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
4	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
5	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
6	1	1	1	1	1	1	1	0.00	0.0%
$\bar{x}$	1								
S'	0.0								
RSD_i	0.0%								

注: $\bar{X}_i$: 第 i 个实验室测试结果的平均值; S_i : 第 i 个实验室测试结果的标准偏差; RSD_i : 第 i 个实验室测试结果的相对标准偏差; $\bar{x}$: 所有实验室测试结果的平均值; S' : 实验室间标准偏差; RSD' : 实验室间相对标准偏差。(下同)

6 家实验室分别对工业废水(江苏某农药厂排放口出水),进行了斑马鱼急性毒性的测定,每个样品测定 6 次。LID 为 3~4, 96 h LC₅₀ 为 41.2%~61.1% (附表 7)。LID 实验室内相对标准偏差为 0%~15.7%, 实验室间相对标准偏差为 5.35% (附表 8)。LC₅₀ 实验室内相对标准偏差为 1.46%~5.20%, 实验室间相对标准偏差为 9.92% (附表 9)。

附表 7 工业废水样品验证结果（96 h LC₅₀与 LID）

实验室	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	LID	4	4	4	4	4	4
	96 h LC ₅₀	49.1%	47.7%	43.8%	47.7%	45.3%	43.2%
	95%置信限	41.3%~ 65.6%	39.7%~ 63.2%	36.6%~ 56.6%	39.7%~ 63.2%	38.1%~ 58.2%	36.6%~ 56.6%
2	LID	3	4	4	4	3	4
	96 h LC ₅₀	46.9%	46.8%	43.8%	43.8%	46.9%	43.8%
	95%置信限	—	37.3%~ 69.1%	34.9%~ 58.8%	34.9%~ 58.8%	—	34.9%~ 58.8%
3	LID	3	4	3	4	4	3
	96 h LC ₅₀	61.1%	54.4%	56.2%	54.4%	54.4%	56.2%
	95%置信限	—	42.7%~ 92.3%	—	42.7%~ 92.3%	42.7%~ 92.3%	—
4	LID	3	4	4	4	4	4
	96 h LC ₅₀	47.8%	47.7%	47.7%	49.1%	46.8%	47.7%
	95%置信限	—	39.7%~ 63.2%	39.7%~ 63.2%	41.3%~ 65.6%	39.4%~ 59.4%	39.7%~ 63.2%
5	LID	4	4	4	4	4	4
	96 h LC ₅₀	44.0%	43.0%	44.0%	44.0%	41.2%	42.9%
	95%置信限	37.2%~ 54.5%	36.5%~ 53.8%	37.6%~ 54.5%	37.6%~ 54.5%	35.1%~ 50.2%	36.1%~ 51.0%
6	LID	4	4	3	4	4	3
	96 h LC ₅₀	51.7%	54.6%	53.1%	49.1%	49.2%	53.1%
	95%置信限	43.3%~ 72.5%	45.3%~ 78.9%	—	41.3%~ 65.6%	41.3%~ 65.6%	—

附表 8 工业废水样品精密度验证结果（LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	4	4	4	4	4	4	4.00	0.00	0.0%
2	3	4	4	4	3	4	3.67	0.52	14.1%
3	3	4	3	4	4	3	3.50	0.55	15.7%
4	3	4	4	4	4	4	3.83	0.41	10.6%
5	4	4	4	4	4	4	4.00	0.00	0.0%
6	4	4	3	4	4	3	3.67	0.52	14.1%
$\bar{x}$	3.78								
S'	0.202								
RSD_i	5.35%								

注： $\bar{X}_i$ ：第 i 个实验室测试结果的平均值； S_i ：第 i 个实验室测试结果的标准偏差； RSD_i ：第 i 个实验室测试结果的相对标准偏差； $\bar{x}$ ：所有实验室测试结果的平均值； S' ：实验室间标准偏差； RSD' ：实验室间相对标准偏差； r ：重复性限； R ：再现性限。（下同）

附表 9 工业废水样品精密度验证结果 (LC₅₀)

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	49.1%	47.7%	43.8%	47.7%	45.3%	43.2%	46.1%	0.024	5.20%
2	46.9%	46.8%	43.8%	43.8%	46.9%	43.8%	45.3%	0.017	3.75%
3	61.1%	54.4%	56.2%	54.4%	54.4%	56.2%	56.1%	0.026	4.63%
4	47.8%	47.7%	47.7%	49.1%	46.8%	47.7%	47.8%	0.007	1.46%
5	44.0%	43.0%	44.0%	44.0%	41.2%	42.9%	43.2%	0.011	2.55%
6	51.7%	54.6%	53.1%	49.1%	49.2%	53.1%	51.8%	0.022	4.25%
$\bar{x}_i$	48.4%								
S'	0.048								
RSD_i	9.92%								

6 家实验室对不同浓度的重铬酸钾模拟样品 (200 mg/L、800 mg/L、3200 mg/L) 进行了斑马鱼急性毒性的测定, 每个样品测定 6 次。200 mg/L 的重铬酸钾模拟样品, LID 为 2~3, LID 实验室内相对标准偏差为 0%~18.8%, 实验室间相对标准偏差为 4.37% (附表 10); 800 mg/L 的重铬酸钾模拟样品, LID 为 8~10, LID 实验室内相对标准偏差为 0%~9.79%, 实验室间相对标准偏差为 1.64% (附表 11); 3200 mg/L 的重铬酸钾模拟样品, LID 为 32~48, LID 实验室内相对标准偏差为 0%~22.1%, 实验室间相对标准偏差为 6.44% (附表 12)。

附表 10 低毒模拟样品精密度验证结果 (200 mg/L, LID)

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	2	2	3	2	2	2	2.17	0.408	18.8%
2	2	3	2	2	2	2	2.17	0.408	18.8%
3	2	2	2	2	2	2	2.00	0.000	0.00%
4	2	2	3	2	2	2	2.17	0.408	18.8%
5	2	2	2	2	2	2	2.00	0.000	0.00%
6	2	2	2	2	2	2	2.00	0.000	0.00%
$\bar{x}_i$	2.08								
S'	0.091								
RSD_i	4.37%								

附表 11 中毒模拟样品精密度验证结果（800 mg/L，LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	8	10	8	8	8	8	8.33	0.82	9.79%
2	10	8	8	8	8	8	8.33	0.82	9.8%
3	8	8	8	8	8	10	8.33	0.82	9.79%
4	10	8	8	8	8	8	8.33	0.82	9.79%
5	8	8	8	8	8	10	8.33	0.82	9.79%
6	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0.0%
$\bar{x}_i$	8.28								
S'	0.136								
RSD_i	1.64%								

附表 12 高毒模拟样品精密度验证结果（3200 mg/L，LID）

实验室	试验号 X						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
1	32	32	48	32	48	32	37.3	8.26	22.1%
2	48	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
3	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0.00%
4	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0.00%
5	32	48	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
6	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0.0%
$\bar{x}_i$	33.8								
S'	2.18								
RSD_i	6.44%								

A. 1.3 方法的正确度

6 家实验室对《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》的准确度进行验证，使用加标模拟样品进行测定，测定 6 次。分别用标准稀释水配制浓度为 200 mg/L（约 96 h LC₁₀ 的 2 倍）、800 mg/L（约 96 h LC₅₀ 的 2 倍）和 3200 mg/L（96 h LC₉₀ 的 2 倍）的重铬酸钾溶液，作为低毒、中毒与高毒模拟样品。依据《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168—2020），采用 LID 的相对误差表征正确度。结果显示（附表 13~15），不同浓度（200 mg/L、800 mg/L 和 3200 mg/L）的加标模拟样品，6 家实验室的 LID 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%，正确度符合要求。

附表 13 低毒模拟样品（200 mg/L）LID 测试结果

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	平均值	$\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$
1	2	2	3	2	2	2	2.08	4.00% ± 0%
2	2	3	2	2	2	2		
3	2	2	2	2	2	2		
4	2	2	3	2	2	2		
5	2	2	2	2	2	2		
6	2	2	2	2	2	2		

附表 14 中毒模拟样品（800 mg/L）LID 测试结果

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	平均值	$\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$
1	8	10	8	8	8	8	8.44	1.75% ± 1.36%
2	10	8	8	10	8	8		
3	8	8	8	8	8	10		
4	10	8	8	8	8	8		
5	8	8	8	8	8	10		
6	8	10	10	8	8	8		

附表 15 高毒模拟样品（3200 mg/L）LID 测试结果

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	平均值	$\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$
1	32	32	48	32	48	32	33.8	2.28% ± 4.47%
2	48	32	32	32	32	32		
3	32	32	32	32	32	32		
4	32	32	32	32	32	32		
5	32	48	32	32	32	32		
6	32	32	32	32	32	32		

A. 1. 4 有效性

6 家验证单位对《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》的有效性进行验证，使用标准稀释水阴性对照和重铬酸钾参比物进行测定。结果见附表 16 和附表 17，所有阴性对照斑马鱼存活率均为 100%、重铬酸钾 24 h LC₅₀ 均在 200~400 mg/L 之间，符合质控要求。

附表 16 阴性对照样品方法有效性及敏感性验证数据表（受试生物存活率）

实验室	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	范围	结论
1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	符合 存活 率 $\geq$ 90% 要求
2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
5	100%	100%	100%	100%	100%	100%	—	
6	100%	100%	100%	100%	90%	100%	—	

附表 17 参比物（重铬酸钾）方法有效性及敏感性验证数据表

实验室	24 h LC_{50} (mg/L)	95%置信区间 (mg/L)	结论
1	259	179~374	符合 200 mg/L~400 mg/L 范围要求
2	250	225~279	
3	304	253~404	
4	264	185~378	
5	297	260~357	
6	260	179~374	

A. 2 方法验证结论

A. 2.1 精密度

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 LC_{50} 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%。

6 家实验室分别对工业废水（江苏某农药厂排放口出水），进行了斑马鱼急性毒性的测定，每个样品测定 6 次。LID 为 3~4，96 h LC_{50} 为 41.2%~61.1%。LID 实验室内相对标准偏差为 0%~15.7%，实验室间相对标准偏差为 5.35%。 LC_{50} 实验室内相对标准偏差为 1.46%~5.20%，实验室间相对标准偏差为 9.92%。

6 家实验室对不同浓度重铬酸钾模拟样品（200 mg/L、800 mg/L、3200 mg/L）进行了斑马鱼急性毒性的测定，每个样品测定 6 次。200 mg/L 的重铬酸钾模拟样品，LID 为 2~3，LID 实验室内相对标准偏差为 0%~18.8%，实验室间相对标准偏差为 4.37%；800 mg/L 的重铬酸钾模拟样品，LID 为 8~10，LID 实验室内相对标准偏差为 0%~9.79%，实验室间相对标准偏差为 1.64%；3200 mg/L 的重铬酸钾模拟样品，LID 为 32~48，LID 实验室内相对标准偏差为 0%~22.1%，实验室间相对标准偏差为 6.44%。

A. 2. 2 正确度

6 家实验室对《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》的准确度进行验证，使用加标模拟样品进行测定，测定 6 次。分别用标准稀释水配制浓度为 200 mg/L（约 96 h LC₁₀ 的 2 倍）、800 mg/L（约 96 h LC₅₀ 的 2 倍）和 3200 mg/L（96 h LC₉₀ 的 2 倍）的重铬酸钾溶液，作为低毒、中毒与高毒模拟样品。结果显示（表 17～表 19），不同浓度（200 mg/L、800 mg/L 和 3200 mg/L）的加标模拟样品，6 家实验室的 LID 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%。

A. 2. 3 有效性及敏感性

6 家实验室对阴性对照稀释水各进行了 6 次重复测定，存活率均为 100%（死亡率均为 0%），满足存活率≥90%（死亡率≤10%）的要求。

6 家实验室对参比物重铬酸钾对鱼类的急性毒性进行了测定，24 h LC₅₀ 均在 200 mg/L～400 mg/L 范围内，符合质控要求。