



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 大型溞活动 抑制法

Water quality—Determination of the acute toxicity—Inhibition of the
mobility of daphnia (*Daphnia magna* Straus) 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	3
6 试剂和材料	3
7 仪器和设备	4
8 样品采样、保存与预处理	5
9 测试步骤	6
10 结果计算与表示	9
11 有效性、敏感性与精密度	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） M4 和 M7 培养基的配制	12
附录 B（资料性附录） 大型溞的培养繁殖方法	16
附录 C（资料性附录） 重铬酸钾对大型溞（ <i>Daphnia magna</i> Straus）的急性毒性测试	18
附录 D（资料性附录） 废水对大型溞（ <i>Daphnia magna</i> Straus）活动抑制的 LID 测定示例	23
附录 E（资料性附录） 寇氏（Karber）法计算 EC ₅₀ 示例	19

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，规定水质大型溞急性活动抑制的测定方法，制定本标准。

本标准规定了地表水、地下水、生活污水和工业废水对大型溞的急性毒性测定方法。

本标准的附录 A～附录 E 为资料性附录。

本标准与《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》（GB/T 13266—91）相比，主要差异如下：

- 名称修改为《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》；
- 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 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》（GB/T 13266-91）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：生态环境部南京环境科学研究所、中国环境科学研究院。

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 大型溞活动抑制法

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大型溞活动抑制法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水对大型溞急性毒性最低无效应稀释倍数（LID）和半数效应浓度（EC₅₀）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

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

新生幼溞 **neonate**

新出生或孵化 24 h 以内的幼溞。

3.2

亲溞 **parent daphnia**

繁殖幼溞的大型溞母溞。

3.3

孤雌生殖 parthenogenesis

单性生殖的一种形式，雌性通过未受精卵产生遗传上与自身相同的后代。

3.4

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。

3.5

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 $D=4$ 。

3.6

活动抑制 immobilization

轻轻摇动测试容器，15 s 内蚤体不能游动或死亡，视为活动受到抑制。

注：即使蚤的触角仍能活动，也视为活动抑制。

3.7

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% 受试生物保持活动能力的最低稀释倍数。

3.8

半数效应浓度 median effective concentration (EC_{50})

在规定条件的测试周期内，导致 50% 受试生物出现活动抑制的试样浓度。

3.9

静态法 static test

测试周期内不更换试样的测试方式。

3.10

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。

3.11

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（大型蚤，*Daphnia magna* Straus）置于不同稀释倍

数的试样中，在 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下暴露 48 h，根据受试生物的活动抑制（包括死亡）数量计算 LID 或 EC_{50} ，以表征样品的急性毒性。

5 干扰和消除

5.1 样品不作预处理，以测定其对受试生物的综合毒性。但当仅考虑化学性抑制时，可通过静置消除样品中悬浮颗粒物对测试的干扰，静置时间 $\leq 2\text{ h}$ 。

5.2 对于地表水与生活污水样品，宜用 $60\text{ }\mu\text{m}$ 孔径（250 目）筛网（7.2）过滤，以消除对测试的影响。

6 试剂和材料

6.1 受试生物

6.1.1 使用孤雌繁殖的大型蚤（*Daphnia magna* Straus，甲壳纲，枝角亚目）作为亲蚤，采用 M4 或 M7 培养基保种，培养基配制方法参见附录 A，大型蚤培养繁殖方法参见附录 B。

6.1.2 受试生物应为非头胎蚤，蚤龄应 $\leq 24\text{ h}$ ，且来源于同一保种培养的健康的亲蚤储备群体。此外，亲蚤群体还应满足以下条件：

- a) 未见任何受胁迫现象（如，2 d 内死亡率 $> 20\%$ ，出现雄蚤、冬眠卵或体色异常等现象）；
- b) 测试前 7 d 内，用于产蚤的亲蚤平均产蚤量 $\geq 3\text{ 只/d}$ ；
- c) 保种培养的光照和温度条件应与 9.1 节的测试环境条件一致。否则，应在 9.1 节的光照和温度条件下重新驯化亲蚤。

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 $\kappa \leq 10\text{ }\mu\text{S/cm}$ ）。

6.2.1 氢氧化钠（NaOH）。

6.2.2 氯化钙（ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）。

6.2.3 硫酸镁（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）。

6.2.4 碳酸氢钠（ NaHCO_3 ）。

6.2.5 氯化钾（KCl）。

6.2.6 重铬酸钾（ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ）。

6.2.7 浓盐酸（HCl）： $\rho = 1.19\text{ g/ml}$ 。

6.2.8 盐酸溶液： $c(\text{HCl}) = 1\text{ mol/L}$

移取 41.7 ml 浓盐酸（6.2.7），用水定容至 500 ml。

6.2.9 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH}) = 1\text{ mol/L}$

称取 20 g 氢氧化钠（6.2.1），溶于少量水中，用水定容至 500 ml。

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

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 180 d。

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

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 180 d。

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

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 180 d。

6.2.13 氯化钾贮备液: $\rho(\text{KCl}) = 230 \text{ mg/L}$

称取 0.23 g 氯化钾 (6.2.5), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。室温条件下可保存 180 d。

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) 各 25 ml 混合, 用水定容至 1000 ml。

b) 新配制的标准稀释水曝气至溶解氧浓度不低于 7.1 mg/L (溶解氧饱和度不低于 80%), 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 ± 0.5 范围内。

6.2.15 其他稀释水

在培养、驯化和测试过程中, 大型蚤活动正常, 没有表现出胁迫迹象的水也可作为稀释水, 如脱氯过滤自来水。稀释水的 pH 值应在 6.0~9.0 之间, 水质硬度在 140 mg/L~275 mg/L (以 CaCO_3 计) 之间。

注: 用于大型蚤保种的 M4 和 M7 培养基, 不能作为含有二价金属离子或者成分未知样品的稀释水。

6.2.16 重铬酸钾贮备液: $\rho(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 100 \text{ mg/L}$

称取 0.05 g 重铬酸钾 (6.2.6), 溶于少量水中, 用水定容至 500 ml。室温条件下可保存 180 d。

6.2.17 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 (10 目~5 目)、孔径 60 μm (250 目)。

7.3 采样瓶: 棕色磨口具塞玻璃瓶, 或聚乙烯 (或聚丙烯、聚四氟乙烯) 塑料瓶, 容积 $\geq 1 \text{ L}$ 。

7.4 冷藏箱: 可移动, 具有 6 $^{\circ}\text{C}$ 及以下冷藏功能。

7.5 冰箱或冷库: 具有 6 $^{\circ}\text{C}$ 及以下冷藏功能或 -18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻功能。

7.6 天平: 实际分度值 0.1 mg。

7.7 温度计: 测量范围 0 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$, 最小分度为 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 。

7.8 pH 计: 测量范围 0~14, 最小分度为 0.1 pH 单位。

7.9 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。

- 7.10 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。
- 7.11 电导率测定仪：测量范围 0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ~200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，最小分度为 0.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。
- 7.12 人工气候箱或恒温室：温控范围 15 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ ，温度控制偏差 ≤ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ ；可设置光暗比为 16 h：8 h，光照强度 ≤ 1500 lx。
- 7.13 照度计：测量范围 200 lx~2000 lx，最小分度为 1 lx。
- 7.14 测试容器：玻璃烧杯或顶空瓶，规格 100 ml。宜采用 100 ml 烧杯；若样品有异味或疑似具有挥发性时，应采用顶空瓶。
- 7.15 体视镜或者显微镜。
- 7.16 总有机碳（TOC）分析仪。
- 7.17 计泡器。
- 7.18 实验室常用玻璃器皿。

8 样品采样、保存与预处理

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 以及 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。采集的样品混合之前应及时于 6 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存。

8.1.2 宜用采水器（7.1）采集样品。采样时，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，宜采集不少于 2 L 的样品。

8.1.3 宜在采样时，分别采用 pH 计（7.8）、便携式溶解氧测定仪（7.10）、电导率测定仪（7.11）测定 pH、溶解氧（DO）、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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻保存，保存前将样品充分混匀，每 1000 ml 容器分装 500 ml~700 ml 样品，保存期不超过 2 个月。24 h 内不能开展测试的样品，宜采用聚四氟乙烯、聚乙烯或聚丙烯材质的塑料瓶运输和保存。

8.2.2 样品到实验室混合均匀后，采用 TOC 分析仪（7.16）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 $\leq 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下解冻。测试开始前，将样品放置于 $18\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下，待温度达到 $18\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $\text{pH} > 8.5$ 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 $\leq$ 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 $< 3.6\text{ mg/L}$ （溶解氧饱和度 $< 40\%$ ）时，可采用搅拌或曝气的方式充氧 $\leq 20\text{ min}$ ，使样品溶解氧含量 $\geq 3.6\text{ mg/L}$ ，但不能过饱和。若充氧会引起样品特定污染物发生变化，则不应充氧。

9 测试步骤

9.1 测试环境条件

9.1.1 光照

光照强度应 $\leq 1500\text{ lx}$ ，光照周期光暗比为 $16\text{ h} : 8\text{ h}$ 。

9.1.2 温度

在 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 内选择测试温度，测试过程中试样温度变化幅度在 $\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以内。

9.1.3 pH 值

a) 测试过程中不调节 pH。

b) 测定排除 pH 影响的急性毒性时，试样 pH 值应在 $6.0\sim 9.0$ 之间，测试过程中 pH 变化幅度应在 ± 0.75 以内。

9.1.4 溶解氧

a) 测试过程不调节溶解氧。

b) 测定排除溶解氧影响的急性毒性时，测试过程中溶解氧浓度宜 $\geq 2.0\text{ mg/L}$ （溶解氧饱和度 $\geq 22\%$ ）。可采用高纯空气适度充氧，以计泡器（7.17）计数的充氧速度 ≤ 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 ≥ 2 ml/只。

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 48 h EC_{50} 时，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；否则，应采用半静态法测试。

9.1.7.2 采用半静态法测试时，换水时间宜为 24 h，也可根据试样稳定性作相应调整。换水时，先将新配制的试样转入洁净的测试容器中，然后用胶头吸管小心的将受试生物从原测试容器中吸取转入装有对应浓度新试样与相同编号的测试容器中，转移操作时间不超过 0.5 h。

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（4 个平行）使用 20 只受试生物，每个平行 1 个测试容器（7.14），每个容器中投放 5 只受试生物。将测试容器放置于人工气候箱或恒温室（7.12）。根据试样的稳定性采用静态法或者半静态法，测试条件见 9.1，测试周期为 48 h。样品的稀释系列参照表 1。

表 1 样品的稀释系列（以 100 ml 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	0	100
1	100	100	0
1.5	66.7	66.7	33.3
2	50.0	50.0	50.0
3	33.3	33.3	66.7
4	25.0	25.0	75.0
6	16.7	16.7	83.3
8	12.5	12.5	87.5
12	8.3	8.33	91.67
16	6.2	6.25	93.75
24	4.2	4.17	95.83
32	3.1	3.13	96.87
.....			

9.3 EC₅₀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 配制 ≥ 3 个连续浓度的试样，每一浓度投加 5 只受试生物，不设平行，测试条件见 9.1，测试周期为 48 h，以确定受试生物活动抑制率 100%（或最大活动抑制率）~0% 所对应的试样浓度范围（体积分数）。

9.3.1.1 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 以及 48 h 测定 COD 或 TOC，以确定试样稳定性。如果 48 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对受试生物产生活动抑制影响，设置 1 个样品浓度组开展限度试验。将 20 只受试生物分为 4 个平行，每个平行 1 个容器、投放 5 只受试生物。测试条件见 9.1，测试周期为 48 h。若测试结束时受试生物活动抑制率 $\leq 10\%$ ，测试停止。若测试期间观测到受试生物活动抑制率 $> 10\%$ ，应进一步开展正式试验。

9.3.3 正式试验

9.3.3.1 根据预试验结果确定的受试生物活动抑制率 100%（或最大活动抑制率）~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 个等比系列浓度的试样进行正式试验。系列浓度中，宜包括活动抑制率为 $\leq 37\%$ 和 $\geq 63\%$ 的 2 个浓度。

9.3.3.2 每个浓度组 20 只受试生物，分为 4 个平行，每个平行 1 个容器、投放 5 只受试生物。测试条件见 9.1，测试周期为 48 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 EC₅₀ 法均应同步开展空白试验。
- c) 空白试验的平行数量及投放的受试生物数量与试样组一致。

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，样品测试前 1 个月内应至少开展一次参比物试验。对于样品测试频次较低的实验室，宜在每次样品测试的同时开展参比物试验，以确认受试生物敏感性。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 测试时，阴性对照和各浓度组同步设置 1 个不加受试生物、专用于测量环境条件的平行。

9.5.1.2 测试开始 0 h 及 48 h，用照度计（7.13）测定并记录测试容器（7.14）液面相同高度的光照强度。

9.5.1.3 测试开始 0 h、24 h、48 h，用温度计（7.7）、pH 计（7.8）和便携式溶解氧测定仪（7.10）测定并记录阴性对照和各浓度组的温度、pH 值和溶解氧浓度。对于半静态试验，应在每次换水前后分别测定试样溶液的水质参数。

9.5.2 受试生物观测和记录

9.5.2.1 测试开始 0 h、24 h 及 48 h，观测并记录每个容器中仍有活动能力的受试生物数量，以及出现的异常状态（如死亡、不活跃、浮在水面、异常旋转或盘旋等），出现死亡受试生物时及时清理。

9.5.2.2 测试结束时，将存活受试生物置于冰水混合物液（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% 受试生物保持活动能力的最低稀释倍数，即为最低无效应稀释倍数 LID。LID 的确定示例参见附录 D。

10.2 EC_{50} 的估算

10.2.1 EC_{50} 可参照附录 E 方法计算，也可采用概率单位法、直线内插法等其他方法来计算，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 EC_{50} 或不需要计算 EC_{50} 时，应报告最大活动抑制率的最低浓度和无活动抑制的最高浓度（以稀释百分比浓度表示）。

11 有效性、敏感性与精密度

11.1 有效性及敏感性

11.1.1 6 家实验室分别开展空白试验（9.4.1），重复 6 次，活动抑制率均小于 10%，满足 $\leq 10\%$ 的要求。

11.1.2 6 家实验室分别测定参比物重铬酸钾的大型蚤急性毒性，24 h EC_{50} 测试结果介于 1.06 mg/L ~ 1.17 mg/L，均在 0.60 mg/L ~ 2.10 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、地下水样品进行了大型蚤急性活动抑制的测定，每个水样测定6次。LID均为1，48 h EC₅₀均大于100%。各浓度组新生幼蚤活动抑制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%。

11.2.2 6家实验室分别对工业废水（农药废水）样品进行大型蚤急性毒性的测定，分别测定6次。LID均为192，48 h EC₅₀为0.98%~1.09%。LID实验室内相对标准偏差为0%，实验室间相对标准偏差为0%。48 h EC₅₀实验室内相对标准偏差为1.57%~3.15%，实验室间相对标准偏差为2.14%。

11.2.3 6家实验室以加标浓度分别为1.20 mg/L、4.80 mg/L以及19.2 mg/L的重铬酸钾溶液为模拟样品，分别进行了6次48 h最低无效应稀释倍数LID的测定。LID值分别为2~3、8~12、32~48，实验室内相对标准偏差分别为0%~18.8%、0%~18.8%、0%~18.8%，实验室间相对标准偏差分别为3.36%、4.19%、4.38%。

11.3 正确度

6家实验室以加标浓度为1.20 mg/L、4.80 mg/L和19.2 mg/L的重铬酸钾溶液为模拟样品，分别进行了6次48 h最低无效应稀释倍数LID的测定，LID平均值分别为2.03、8.22、33.3，相对误差（ $\overline{RE} \pm 2 \overline{S_{RE}}$ ）分别为2.28%±4.47%、3.60%±4.02%、4.00%±3.76%。

12 质量保证和质量控制

12.1 空白试验和参比物试验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，阴性对照中活动受到抑制的受试生物数量≤10%。

12.3 相同测试条件下，参比物重铬酸钾的24 h EC₅₀应在0.60 mg/L~2.10 mg/L范围内。在样品测试前1个月内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（适用时）、保存方法及保存时间；
- b) 测试前样品的pH值、溶解氧浓度及静置或过滤条件、调pH等预处理方法；
- c) 受试生物的种名、来源、蚤龄等信息；
- 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48 h EC₅₀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，如死亡、不活跃、浮在水面、异常旋转或盘

旋等。

附 录 A
(资料性附录)
M4 和 M7 培养基的配制

本方法为贮备液及 M4、M7 培养基配制方法。

A.1 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 $\kappa \leq 10 \mu\text{S/cm}$ ）。

- A.1.1 硼酸 (H_3BO_3)。
- A.1.2 四水氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.3 氯化锂 (LiCl)。
- A.1.4 氯化铷 (RbCl)。
- A.1.5 六水氯化锶 ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.6 溴化钠 (NaBr)。
- A.1.7 二水钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.8 二水氯化铜 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.9 氯化锌 (ZnCl_2)。
- A.1.10 六水氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.11 碘化钾 (KI)。
- A.1.12 亚硒酸钠 (Na_2SeO_3)。
- A.1.13 偏钒酸铵 (NH_4VO_3)。
- A.1.14 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.15 七水硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.16 维生素 B1 ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$)。
- A.1.17 维生素 B12 ($\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{O}_{14}\text{N}_{14}\text{PCo}$)，纯度 $\geq 96\%$ 。
- A.1.18 维生素 H ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$)，纯度 $\geq 96\%$ 。
- A.1.19 硝酸钠 (NaNO_3)。
- A.1.20 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。
- A.1.21 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)。
- A.1.22 九水偏硅酸钠 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)。

A.2 14 种微量元素一级贮备液配制

以下贮备液，无特殊说明的，4℃下可保存 180 d。

A.2.1 硼酸贮备液： $\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 57.19 \text{ g/L}$

称取 57.19 g 硼酸 (A.1.1)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A.2.1 四水氯化锰贮备液： $\rho(\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}) = 7.21 \text{ g/L}$

称取 7.21 g 四水氯化锰 (A.1.2)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A.2.3 氯化锂贮备液： $\rho(\text{LiCl}) = 6.12 \text{ g/L}$

称取 6.12 g 氯化锂 (A.1.3)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 4 氯化铷贮备液： $\rho(\text{RbCl}) = 1.42 \text{ g/L}$

称取 1.42 g 氯化铷 (A.1.4)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 5 六水氯化锶贮备液： $\rho(\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}) = 3.04 \text{ g/L}$

称取 3.04 g 六水氯化锶 (A.1.5)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 6 溴化钠贮备液： $\rho(\text{NaBr}) = 0.32 \text{ g/L}$

称取 0.32 g 溴化钠 (A.1.6)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 7 二水钼酸钠贮备液： $\rho(\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 1.26 \text{ g/L}$

称取 1.26 g 二水钼酸钠 (A.1.7)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 8 二水氯化铜贮备液： $\rho(\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.335 \text{ g/L}$

称取 0.335 g 二水氯化铜 (A.1.8)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 9 氯化锌贮备液： $\rho(\text{ZnCl}_2) = 0.26 \text{ g/L}$

称取 0.26 g 氯化锌 (A.1.9)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 10 六水氯化钴贮备液： $\rho(\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}) = 0.20 \text{ g/L}$

称取 0.20 g 六水氯化钴 (A.1.10)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 11 碘化钾贮备液： $\rho(\text{KI}) = 0.065 \text{ g/L}$

称取 0.065 g 碘化钾 (A.1.11)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 12 亚硒酸钠贮备液： $\rho(\text{Na}_2\text{SeO}_3) = 0.044 \text{ g/L}$

称取 0.044 g 亚硒酸钠 (A.1.12)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 13 偏钒酸铵贮备液： $\rho(\text{NH}_4\text{VO}_3) = 0.012 \text{ g/L}$

称取 0.012 g 偏钒酸铵 (A.1.13)，溶于少量水中，用水定容至 1000 ml。

A. 2. 14 Fe-EDTA 溶液贮备液

a) Fe-EDTA 溶液贮备液 Na_2EDTA 组分： $\rho(\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 5.00 \text{ g/L}$

称取 5.00 g 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物 (A.1.14)，溶于少量水中，用水定容至 500 ml。

b) Fe-EDTA 溶液贮备液 FeSO_4 组分： $\rho(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 1.99 \text{ g/L}$

称取 1.99 g 七水硫酸亚铁 (A.1.15)，溶于少量水中，用水定容至 500 ml。

c) Fe-EDTA 溶液贮备液

将 Fe-EDTA 溶液贮备液 Na_2EDTA 组分与 Fe-EDTA 溶液贮备液 FeSO_4 组分混匀，经 121℃ 高压灭菌 15 分钟，6℃ 及以下避光保存。

A. 3 14 种微量元素二级贮备液配制

A. 3. 1 M4 用微量元素二级贮备液

移取 1.00 ml 硼酸贮备液 (A.2.1)、1.00 ml 四水氯化锰贮备液 (A.2.2)、1.00 ml 氯化锂贮备液 (A.2.3)、1.00 ml 氯化铷贮备液 (A.2.4)、1.00 ml 六水氯化锶贮备液 (A.2.5)、1.00 ml 溴化钠贮备液 (A.2.6)、1.00 ml 二水钼酸钠贮备液 (A.2.7)、1.00 ml 二水氯化铜贮备液 (A.2.8)、1.00 ml 氯化锌贮备液 (A.2.9)、1.00 ml 六水氯化钴贮备液 (A.2.10)、1.00 ml 碘化钾贮备液 (A.2.11)、1.00 ml 亚硒酸钠贮备液 (A.2.12)、1.00 ml 偏钒酸铵贮备液 (A.2.13) 以及 20.0 ml Fe-EDTA 溶液贮备液 (A.2.14)，加入 500 ml~800 ml 的水中，然

后用水定容至 1000 mL。4℃下可保存 180 d。

A. 3. 2 M7 用微量元素二级贮备液

移取 0.25 ml 硼酸贮备液 (A.2.1)、0.25 ml 四水氯化锰贮备液 (A.2.2)、0.25 ml 氯化锂贮备液 (A.2.3)、0.25 ml 氯化铷贮备液 (A.2.4)、0.25 ml 六水氯化锶贮备液 (A.2.5)、0.25 ml 溴化钠贮备液 (A.2.6)、0.25 ml 二水钼酸钠贮备液 (A.2.7)、0.25 ml 二水氯化铜贮备液 (A.2.8)、1.00 ml 氯化锌贮备液 (A.2.9)、1.00 ml 六水氯化钴贮备液 (A.2.10)、1.00 ml 碘化钾贮备液 (A.2.11)、1.00 ml 亚硒酸钠贮备液 (A.2.12)、1.00 ml 偏钒酸铵贮备液 (A.2.13) 以及 5.00 ml Fe-EDTA 溶液贮备液 (A.2.14), 加入 500 ml~800 ml 的水中, 然后用水定容至 1000 mL。4℃下可保存 180 d。

A. 4 混合维生素贮备液配制

称取 0.75 g 维生素 B₁ (A.1.16), 0.01g 维生素 B₁₂ (A.1.17) 以及 0.008 g 维生素 H (A.1.18), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml 得混合维生素贮备液。4℃下可保存 180 d。

A. 5 8 种常量营养元素贮备液配制

以下贮备液, 无特殊说明的, 4℃下可保存 180 d。

A. 5. 1 氯化钙贮备液 II: $\rho(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 293.80 \text{ g/L}$

称取 293.80 g 氯化钙 (6.2.2), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 5. 2 硫酸镁贮备液 II: $\rho(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 246.60 \text{ g/L}$

称取 246.60 g 硫酸镁 (6.2.3), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 5. 3 氯化钾贮备液 II: $\rho(\text{KCl}) = 58.00 \text{ g/L}$

称取 58.00 g 氯化钾 (6.2.5), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 5. 4 碳酸氢钠贮备液: $\rho(\text{NaHCO}_3) = 64.80 \text{ g/L}$

称取 64.80 g 碳酸氢钠 (6.2.4), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 5. 5 九水偏硅酸钠贮备液: $\rho(\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}) = 50.0 \text{ g/L}$

称取 50.0 g 九水偏硅酸钠 (A.1.22), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 5. 6 硝酸钠贮备液: $\rho(\text{NaNO}_3) = 2.74 \text{ g/L}$

称取 2.74 g 硝酸钠 (A.1.19), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 5. 7 磷酸二氢钾贮备液: $\rho(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 1.43 \text{ g/L}$

称取 1.43 g 磷酸二氢钾 (A.1.20), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 5. 8 磷酸氢二钾贮备液: $\rho(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 1.84 \text{ g/L}$

称取 1.84 g 磷酸氢二钾 (A.1.21), 溶于少量水中, 用水定容至 1000 ml。

A. 6 M4 和 M7 培养基的配制

A. 6. 1 M4 培养基的配制

移取 50.0 ml M4 用微量元素二级贮备液 (A.3.1)、0.10 ml 混合维生素贮备液 (A.4)、1.00 ml 氯化钙贮备液 II (A.5.1)、0.50 ml 硫酸镁贮备液 II (A.5.2)、0.10 ml 氯化钾贮备液 II (A.2.3)、1.00 ml 碳酸氢钠贮备液 (A.5.4)、0.20 ml 九水偏硅酸钠贮备液 (A.5.5)、0.10

ml 硝酸钠贮备液 (A.5.6)、0.10 ml 磷酸二氢钾贮备液 (A.5.7) 以及 0.10 ml 磷酸氢二钾贮备液 (A.5.8), 加入 500 ml~800 ml 的水中, 然后用水定容至 1000 mL, 得到 M4 培养基。室温下可保存 180 d。

A. 6. 2 M7 培养基的配制

移取 50.0 ml M7 用微量元素二级贮备液 (A.3.1)、0.10 ml 混合维生素贮备液 (A.4)、1.00 ml 氯化钙贮备液 II (A.5.1)、0.50 ml 硫酸镁贮备液 II (A.5.2)、0.10 ml 氯化钾贮备液 II (A.2.3)、1.00 ml 碳酸氢钠贮备液 (A.5.4)、0.20 ml 九水偏硅酸钠贮备液 (A.5.5)、0.10 ml 硝酸钠贮备液 (A.5.6)、0.10 ml 磷酸二氢钾贮备液 (A.5.7)、0.10 ml 磷酸氢二钾贮备液 (A.5.8), 加入 500 ml~800 ml 的水中, 然后用水定容至 1000 mL, 得到 M7 培养基。室温下可保存 180 d。

附 录 B
(资料性附录)
大型溞的培养繁殖方法

本方法适用于大型溞 (*Daphnia magna* Straus) 的培养繁殖与幼溞的获取。

B.1 生物学背景

大型溞 (*Daphnia magna* Straus) 是滤食性水生无脊椎生物, 属节肢动物门甲壳纲枝角目溞科, 广泛分布于世界各地, 也是一种重要的生态毒理学模式生物。大型溞的生长是间歇性的, 生长与脱壳交替进行。每脱壳一次, 增加一龄, 两次脱壳的间期叫龄期。性成熟前的龄期为幼龄期, 性成熟后为成龄期。大型溞有 4~6 个幼龄期, 幼溞比成龄溞对毒物更敏感。20℃ 条件下, 约 6 d~8 d 达到性成熟开始产卵。

当温度稳定与食物充足的实验室条件下, 大型溞通过孤雌生殖快速繁殖后代。孤雌生殖产生的卵直接发育为雌性个体, 无需受精即可形成胚胎, 一般每胎可产 20~30 个卵, 最多可达 150 个。这种繁殖方式有助于种群迅速扩张, 且后代基因高度一致。当温度或食物等发生变化或受到其他环境因子胁迫时可能会出现有性生殖, 培养系统中可见雄溞和休眠卵。休眠卵形成后不久, 会随着母溞蜕皮而沉于水底。

B.2 大型溞的培养繁殖方法

B.2.1 大型溞的选育

大型溞 (*Daphnia magna* Straus) 宜从实验室已有的纯培养中挑取、引种, 也可从野外采集。野外采集的溞应经分离、纯化, 依据《中国动物志 淡水枝角类》在体视镜 (7.15) 下鉴定为大型溞 (*Daphnia magna* Straus), 选择体大、健康的母体数个, 用 100 ml 小烧杯单个培养。选择繁殖量最大的一代为母溞, 单克隆化, 使之成为纯品系。

B.2.2 饵料

雌性的大型溞在 20 ℃ 条件下可生存 4 个月。宜使用实验室培养的绿藻, 如普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*) 等作为大型溞的食物。

B.2.3 繁殖容器

单个母溞培养可用 100 ml 小烧杯, 繁殖培养宜使用 2000 ml 大烧杯, 储备培养宜使用 10 L 玻璃容器。

B.2.4 喂养

用不含无机培养基的绿藻培养液喂养大型溞。培养液宜每周更换 3 次, 也可每天追加一次浓缩悬浮绿藻培养液。培养液中绿藻的浓度宜为 10^6 个/L 左右 (可用分光光度计、颗粒计数器等仪器测量), 绿藻培养液的颜色以淡苹果绿色为宜。

注: 如果绿藻浓度过高, 在夜间无光照条件下, 残余绿藻会引起大型溞培养液出现缺氧现象, 导致

大型溞死亡。

B. 2. 5 培养条件

培养用水除附录 A 的培养基外，宜选用经自然曝气 3 d 以上的自来水或人工配制的标准稀释水，大型溞生存的适宜温度在 17 °C~25 °C 之间，适宜的 pH 值在 6.0~9.0 之间。大型溞的密度宜为 50 个母溞/L。过分拥挤，会造成大型溞停止孤雌生殖。

B. 2. 6 新生幼溞的分离

宜选用实验室条件下培养 3 代以上、出生 ≤ 24 h 的幼溞，最好为同一母溞的后代。

测试前从实验室贮备培养群体中挑取 20~30 个怀卵母溞，放入 2000 ml 烧杯中培养。24 h 之前移走母溞，此时的幼溞即为溞龄为 ≤ 24 h 的新生幼溞。

B. 2. 7 母溞的分离方法

为保证大型溞的正常繁殖，应定期分离母溞。常用以下 2 种分离方法。

(1) 用孔径 1000 μm 尼龙网制成一个杯形的网袋（略小于繁殖容器）套在繁殖容器内壁，将母溞放入尼龙网内，定期提出装有母溞的尼龙网。放入另一个盛有绿藻培养液的培养容器中。

(2) 采用双层筛网套在繁殖容器内壁，分离母溞并获取新生幼溞。其中，上层筛网的孔径为 $900 \mu\text{m} \pm 100 \mu\text{m}$ ，下层筛网的孔径为 $475 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$ 。母溞被截留在上层粗网上，幼溞被截留在下层细网上。用新鲜绿藻培养液，将截留的母溞和幼溞分别冲入不同的养殖容器内。可每天分离 1 次，注明幼溞的出生日期，便得到不同出生时间的幼溞。定期淘汰溞龄超过 8 周的母溞。

附录 C

(资料性附录)

重铬酸钾对受试生物（大型溞 *Daphnia magna* Straus）的急性毒性测试

C.1 目的

用于验证受试生物（大型溞，*Daphnia magna* Straus）的敏感性和测试条件的可靠性。定期随机抽取亲溞群体生产的非头胎新生幼溞（溞龄 < 24 h），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活动抑制与存活数量，以确定 50% 受试生物活动受抑制时的参比物浓度，即半数效应浓度，以 24 h EC₅₀ 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

a) 3.20 mg/L 重铬酸钾试样

吸取 16 mL 重铬酸钾贮备液（6.2.16），以稀释水（6.2.14 或 6.2.15）稀释至 500 mL，得浓度为 3.20 mg/L 的试样；

b) 1.60 mg/L 重铬酸钾试样

吸取 250 mL 3.20 mg/L 重铬酸钾试样（C.3.1 a），以稀释水（6.2.14 或 6.2.15）稀释至 500 mL，得浓度为 1.60 mg/L 的试样；

c) 0.80 mg/L 重铬酸钾试样

吸取 250 mL 1.60 mg/L 重铬酸钾试样（C.3.1 b），以稀释水（6.2.14 或 6.2.15）稀释至 500 mL，得浓度为 0.80 mg/L 的试样；

d) 0.40 mg/L 重铬酸钾试样

吸取 250 mL 0.80 mg/L 重铬酸钾试样（C.3.1 c），以稀释水（6.2.14 或 6.2.15）稀释至 500 mL，得浓度为 0.40 mg/L 的试样；

e) 0.20 mg/L 重铬酸钾试样

吸取 250 mL 0.40 mg/L 重铬酸钾试样（C.3.1 d），以稀释水（6.2.14 或 6.2.15）稀释至 500 mL，得浓度为 0.20 mg/L 的试样。

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	大型蚤，蚤龄<24 h，非头胎蚤
光周期	光暗比 16 h : 8 h
照度	≤1500 lx
测试温度	在 20 °C ±2 °C 之间选择，测试过程中温度变化不超过 ±1 °C
溶解氧	≥2 mg/L（溶解氧饱和度>22%）
pH 值	在 6.0~9.0 之间选择，测试过程中 pH 值变化不超过 ±0.75
测试容器	100 ml 玻璃烧杯
饲喂	不饲喂
试样浓度	0、0.20 mg/L、0.40 mg/L、0.80 mg/L、1.60 mg/L、3.20 mg/L
正式试验	采用静态法，各浓度组与阴性对照组均为 20 只受试生物，分 4 个平行，每个容器 5 只
单位水体生物承载量	≥2 ml/只
测试周期	24 h

C.4 有效性标准

按照附录 E 推荐的 EC₅₀ 计算方法，得到参比物重铬酸钾的 24 h EC₅₀ 值在 0.60 mg/L~2.10 mg/L 之间，说明大型蚤的敏感性和测试条件符合要求。

附 录 D
(资料性附录)

废水对大型溞 (*Daphnia magna Straus*) 活动抑制的 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) 为至少 90% 的新生幼溞保持活动能力的最低稀释倍数 (D)。

以表 E.1 的测试结果为例，稀释倍数为 8 时，受试生物活动抑制率为 10%，即 90% 的新生幼溞保持活动能力，即 $LID = 8$ 。

表 D.1 LID 测试结果

稀释倍数 (D)	活动受抑制的大型溞数量	^a 活动抑制率 (%)
1	20	100
2	20	100
4	5	25
8	2	10
16	0	0
^a : 活动抑制率的计算方法见公式 E.1。		

附 录 E
(资料性附录)
寇氏 (Karber) 法计算 EC₅₀ 示例

以下为寇氏 (Karber) 法计算废水大型溞急性活动抑制半数效应浓度 EC₅₀ 的示例。

E.1 EC₅₀ 计算

寇氏 (Karber) 法计算 EC₅₀ 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) 最高浓度组的抑制率宜为 100%或与之接近, 最低浓度组的抑制率应为 0%或与之接近。

各浓度组受试生物活动抑制率按照公式 (E.1) 计算:

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

式中: R_{mi} ——第 i 浓度组的受试生物活动抑制率;

n_{mi} ——第 i 浓度组受试生物活动抑制数量;

n ——每个浓度组受试生物的数量。

$\log EC_{50}$ 的估算按照公式 (E.2) 计算:

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

式中: EC₅₀——半数效应浓度 (以体积分数表示), %;

φ_m ——100%抑制率的最低浓度 (以体积分数表示), %;

q ——逐级稀释倍数 (等比数列的公比);

j ——从 0 抑制率最高浓度到 100%抑制率最低浓度, 测试浓度组数量;

R_{mi} ——第 i 浓度组的活动抑制率;

0.5——50%的抑制率;

EC₅₀ 按照公式 (E.3) 计算:

$$EC_{50} = 10^{\log EC_{50}} \quad (\text{E.3})$$

式中: EC₅₀——半数效应浓度 (以体积分数表示), %;

10——指数函数的底数。

$\log EC_{50}$ 标准误差按照公式 (E.4) 计算:

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

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

q ——逐级稀释倍数 (等比数列的公比);

n_{mi} ——第 i 浓度组活动受抑制的受试生物数量；

n ——每个浓度组受试生物的数量。

95%置信区间（95%CI）按照公式（E.5）计算：

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

式中：95%CI——95%置信区间；

10——指数函数的底数；

EC_{50} ——半数效应浓度，%；

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；

$SE_{\log EC_{50}}$ —— $\log EC_{50}$ 的标准误差。

E.2 EC_{50} 计算示例

某工业废水对大型蚤 48 h 急性活动抑制测试数据如表 E.1 所示，求 48 h EC_{50} 及 95%CI。

表 E.1 某工业废水对大型蚤 48 h 急性活动抑制测试结果

序号	浓度 (%)	各组大型蚤活动抑制数量 n_{mi}	各组大型蚤活动未受抑制数量 $n - n_{mi}$	$n_{mi} \times (n - n_{mi})$	各组的活动抑制率 R_{mi}
1	0 (CK)	0	20	0	0
2	6.25	2	18	36	0.10
3	12.5	4	16	64	0.20
4	25.0	8	12	96	0.40
5	50.0	14	6	84	0.70
6	100	20	0	0	1.00
Σ	-	48	-	280	2.40

以表 E.1 中的数据为例，导致受试生物 100%活动抑制率的最低浓度（体积分数）为 100%，则 $\log \varphi_m = \log 100 = 2$ 。

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

累计活动抑制率 ΣR_{mi} 为 2.4

$\Sigma(n_{mi} \times (n - n_{mi}))$ 为 280。

$\log EC_{50}$ 值计算如下：

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

EC_{50} 计算如下：

$$EC_{50} = 10^{\log EC_{50}} = 10^{1.428} = 26.8 \text{ (％)}$$

EC_{50} 的标准误差计算如下：

$$SE_{\log EC_{50}} = \frac{\log q}{n} \times \sqrt{\sum_{i=1}^j (n_{mi} \times (n - n_{mi}))} \Big/ (n - 1) = \frac{0.301}{20} \times \sqrt{\frac{280}{20 - 1}} = 0.058$$

EC₅₀ 标准误差的 1.96 倍：1.96 × SE_{logEC₅₀} = 1.96 × 0.058 = 0.114

则 95% 置信区间：95%CI = 10^(logEC₅₀ ± 1.96SE_{logEC₅₀})

95%CI 下限 = 10^(1.428 - 0.114) = 10^{1.314} = 20.6

95%CI 上限 = 10^(1.428 + 0.114) = 10^{1.542} = 34.8

则 EC₅₀ 的 95%CI 为 20.6% ~ 34.8%。
