

《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法（征求意见稿）》编制说明

《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》编制组

2025 年 3 月

项目名称：水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法（修订GB/T 13266-91）

项目统一编号：1158

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

编制组主要成员：汪 贞、郭 敏、曹 宇、许 静、王 蕾
范德玲、余若祯、刘丽颖、王一喆、石利利

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

1	项目背景	1
1.1	任务来源	1
1.2	工作过程	1
2	标准修订的依据及必要性分析	5
2.1	修订本标准的法律依据	5
2.2	我国水环境管理目标向水生态健康管理转变的要求	5
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	6
2.4	与国际标准接轨的迫切需要	6
3	国内外相关标准情况	7
3.1	主要国家、地区及国际组织相关测试方法	7
3.2	国内相关测试方法	8
3.3	与国内外相关标准的关系	8
4	标准修订的基本原则和技术路线	15
4.1	标准修订的基本原则	15
4.2	标准制修订的技术路线	15
5	标准主要技术内容	16
5.1	标准结构框架	16
5.2	标准主要技术内容确定的依据	17
5.2.1	标准适用范围	17
5.2.2	规范性引用文件	17
5.2.3	术语和定义	18
5.2.4	方法原理	18
5.2.5	干扰消除	18
5.2.6	试剂与材料	19
5.2.7	仪器和设备	19
5.2.8	样品采集、保存及处理	20
5.2.9	测试步骤	22
5.2.10	结果计算	25
5.2.11	有效性、敏感性与精密度	25
5.2.12	质量保证和质量控制	26
5.2.13	测试报告	26
5.2.14	附录	26
6	方法验证报告	27
6.1	实验室内验证	27
6.1.1	稀释水验证	27
6.1.2	参比物验证	27
6.1.3	实际样品验证	27
6.2	实验室间验证	29
6.2.1	方法验证方案	29
6.2.1	方法验证结果	30
7	与开题报告的差别说明	34
8	标准实施建议	36

9 参考文献	36
附件 方法验证报告	39

《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法（修订 GB/T 13266-91）》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 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》的编制任务，项目统一编号为 1158，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）。

2007 年，原国家环境保护总局发布了《关于开展 2007 年第一批国家标准制修订项目工作的通知》（环科函〔2008〕7 号），下达了《对水、废水和淤泥的统一检验法 用水生物试验法（L 组）水中所含物质对虾蟹影响的测定（鱼虫的短时测定）（L 11）》的编制任务，要求等同采用德国标准《Methods for the examination of water, waste water and sludge-Test method using water organisms (group L)-Determination of the effect on *microcrustacea* of substances contained in water (*Daphnia* short-time test) (L 11)》^[1]（中文译名：对水、废水和淤泥的统一检验法 用水生物试验法（L 组）：水中所含物质对微甲壳纲影响的测定（水蚤短期试验）（L 11））（DIN 38412-L11-1982），项目统一编号为 1207.18，任务承担单位为广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心。

2020 年 10 月生态环境部法规与标准司和生态环境部监测司组织召开了 2016 年及以前立项国家环境保护标准结题论证会，将上述 2 个项目合并为一，项目统一编号为 1158，由生态环境部南京环境科学研究所继续承担标准制修订工作，标准名称为《水质 急性毒性的测定 溞类（大型溞）活动抑制法》。本次修订，建议将标准名称为“水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法”，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 斑马鱼法》（992）相一致。

1.2 工作过程

1.2.1 标准制修订前期工作回顾

（1）原《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》的修订情况

2007 年，原国家环境保护总局南京环境科学研究所《水质 物质对蚤类（大型蚤）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调研分析，主要参考 ISO 标准《Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) - Acute toxicity test》（ISO 6341-1982）^[2]，同时参考了美国环境

保护署（EPA）《Ecological Effects Test Guidelines: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids》（OCSPP 850.1010-1996）^[3]，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、受试生物及繁殖驯养条件等内容，形成标准《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》征求意见稿及编制说明，提交原国家环境保护总局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 家单位公开征求意见，共反馈 21 条书面意见。编制组对回复意见进行了汇总和处理，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。

（2）原《对水、废水和淤泥的统一检验法 用水生物试验法：水中所含物质对微甲壳纲影响的测定（水蚤的短时测定）》的制定情况

2007 年，1207.18 标准立项后，广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心《对水、废水和淤泥的统一检验法 用水生物试验法：水中所含物质对微甲壳纲影响的测定（水蚤的短时测定）》标准编制组，于 2008 年～2009 年 12 月，调研了国内外相关标准与文献资料，重点分析了德国 DIN 38412-L11《Methods for the examination of water, waste water and sludge-Test method using water organisms(group L)-Determination of the effect on *microcrustacea* of substances contained in water (*Daphnia* short-time test) (L 11)》（1982 年 10 月）^[1]，并对比我国的有关国家标准方法，对相关试验设备、试验步骤及判定原则，以及标准转化过程中的细节进行了研究，形成标准草案与编制说明。2010 年 11 月 5 日通过标准开题论证，会后标准编制组根据专家意见建议，修改形成征求意见稿和相应的编制说明，并提交原环境保护部环境标准研究所。

2011 年 7 月 11 日，原环境保护部科技标准司向国务院有关部门及相关单位（合计 211 家单位）公开征求意见（见环办函〔2011〕818 号）。共反馈 20 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 2014 年 12 月提交环境保护部科技标准司和环境标准研究所。

2015 年 1 月至 2018 年 6 月，编制组与环境标准研究所相关的技术负责人就标准中的技术内容及格式进行了多次修改，最终形成准备参加标准技术审查会的标准送审稿，并向原环境保护部监测司提交了参加标准技术审查会的申请。

（3）两个标准内容的异同点

《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》《对水、废水和淤泥的统一检验法 用水生物试验法：水中所含物质对微甲壳纲影响的测定（水蚤的短时测定）》两个标准的适用范围、受试生物、试验过程、质量控制及结果表征等主要内容基本一致，前者主要参考 ISO 的相关标准，后者主要参考德国的相关标准，所以两个标准整合在一起是科学合理的。

鉴于前期两个标准编制组已经开展了大量工作，尤其是对 2008 年之前的文献资料进行了系统分析，但 2008 年以后 ISO 的相关标准进行了更新，提出了更适合水质生物毒性测定

结果的表征方法。因此，本标准编制组在回顾分析前述文献资料的同时，重点调研 2008 年以后相关标准的更新情况及最新的文献资料，结合生态环境标准制定的最新要求，以及生态环境部关于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的新态势，编制本标准并将标准名称确定为《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》，以更好地发挥本标准对于水生态环境保护的作用。

1.2.2 成立标准编制组

2020 年 10 月，再次接到标准修订任务后，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 1158 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《Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) - Acute toxicity test》(ISO 6341-2012)^[4]、Ecological Effects Test Guidelines: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater *Daphnids*(OCSPP 850.1010-1996)^[3]、OECD TG 202 *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test (2004)^[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，以及与 GB/T 13266-91^[6]的比较和分析，确立标准的框架结构和主要内容。

此外，美国材料试验协会（ASTM）曾于 1984 年制订了废水的溞类静态急性毒性测试方法（ASTM D4229 - 84 Practice for Conducting Static Acute Toxicity Tests on Waste-Waters with *Daphnia*）^[7]，但 1988 年撤销了该标准；2002 年发布了鱼类、大型无脊椎动物、两栖类急性毒性试验方法标准（Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, ASTM E729-2002）^[8]，2020 年发布了溞类慢性毒性试验方法标准（Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests, ASTM E 1193-20）^[9]，具有一定的参考价值。1992 年日本发布的行业标准《Testing methods for determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia* by chemicals》（JIS K0229-1992）^[10]主要依据 ISO 6341-1989^[11]制定，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水样浓度。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) 修改了适用范围中试验方法的表述，将静态法和半静态法修改为 LID 法和 LC₅₀ 法；
- (2) 组织 9 家实验室开展了大型蚤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；补充了受试生物的选取等相关参数的确定依据；
- (3) 补充了样品采集的瞬时水样、混合水样的采样要求、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 以及 HJ 565-2010 修改完善开题论证报告及标准草案。

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 大型蚤活动抑制法》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) 补充光照强度的研究或文献资料的相关内容；
- (2) 补充地表水采样地下水方法，特别是地下水采样要求；
- (3) 样品的运输与保存中：①1000ml 容器的材质？②“若存在其他水生动物，可使用筛网（7.2）去除”在什么情况下用哪种筛网？大型蚤是在筛网上还是滤过的是大型蚤？
- (4) 补充采样品运送回实验室后应立即于-18℃及以下冷冻保存，保存前将样品充分混匀，每 1000 ml 容器的材质选择？
- (5) 补充原标准(修订的标准)存在问题分析，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，并针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 5.2.9 补充了光照强度的文献资料来源；
- (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) 标准文本 7.3 中明确容器的材质；在 8.2 中明确筛网（7.2）去除其他水生动物的条件。在标准征求意见稿技术审查会上，专家建议整体删除去除其他水生动物的相关描述。
- (4) 标准文本 8.2.1 中明确 24h 内不能开展测试的容器材质。
- (5) 完善编制说明表 3，包括等同采用的内容，有修改的内容以及参考的内容。。

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) 增加孤雌生殖、亲蚤等术语，核实检测方法和引用标准的一致性；
- (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) 适用范围已明确为地表水、地下水、生活污水和工业废水，在编制说明 5.2.1 中明确：由于大型蚤为淡水无脊椎动物，因此，本方法不适用于海水；
- (2) 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，空白对照/阴性对照统一修改为阴性对照；
- (3) 增加术语“亲蚤”及“孤雌生殖”；
- (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)等文件的有关规定，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份迅速增加。废水经净化处理后，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。生物毒性监测就是能反映水生态健康的方法。《“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。

2008 年，我国制药工业系列排放标准(GB 21903~GB 21908)^[12-17]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)》，增加了一些选择控制项目。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，生态环境部发布的《电子工业水污染物排放标准》（GB 39731-2020）^[18]、《农药工业水污染物排放标准》（GB 21523-2024）^[29]，将斑马鱼卵急性毒性作为综合毒性控制指标。但因为缺乏适用的大型溞、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，急需尽快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的环境风险管控与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、环境质量目标及环境风险管控要求。

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 GB/T 13266-91 参照 ISO 6341-1982 制定。ISO 6341 已于 1989 年、1996 年以及 2012 年进行了 3 次修订。对受试生物为非头胎溞、稀释水参数（pH 及硬度范围）及限制条件（M4 培养基不能用于含金属离子样品的测试）、试样的制备、测试步骤等方面的内容均有调整或者修改，尤其是测试结果的表征更能反映水质的综合毒性，更能适应新时期我国水生态系统保护的要求，现有标准 GB/T 13266-91 已经与国际标准不匹配，存在以下问题，亟需修订：

- （1）标准的适用范围与标准题目不一致；
- （2）试验用溞未规定非头胎溞，与现行的 ISO6341-2012、OECD TG 202 等国外标准不一致；标准稀释水的 pH、硬度参数范围与 ISO6341-2012 不一致；
- （3）样品的冷冻保存时间规定不明确；
- （4）试验温度包含 2 个区间，与 ISO6341-2012 不一致；未规定 pH、光照等环境条件；
- （5）单个试验容器中的试验生物用量与现行的 ISO6341-2012、OECD TG 202 等国外标准不一致；
- （6）参比物重铬酸钾的 24h EC₅₀ 与现行的 ISO6341-2012 不一致；
- （7）结果表征只针对物质，未针对水质。

《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》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（大型溞活动抑制法），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，尤其是水生态环境具有重要的现实意义。

3 国内外相关标准情况

溞类是枝角类（*Cladocera*）的通称，在分类上属节肢动物门（*Arthropoda*），甲壳动物纲（*Crustacea*），鳃足亚纲（*Branchiopoda*），双甲目（*Diplostraca*），枝角亚目（*Cladocera*）。溞类广泛分布在淡水中，是水体中初级生产者（藻类）和消费者（如鱼类）之间的中间环节，能滤食水中碎屑和菌类，在水体自净过程中具有重要作用，同时又是鱼类的天然饵料。溞类作为实验生物模型的独特优势包括下列方面：（1）是全世界各个水域中具有广泛分布的一类动物，在水生食物链中起着重要作用，具有很强的代表性；（2）生命周期短，可以孤雌生殖，且繁殖能力强，短时间内可以得到大量遗传背景稳定的后代，易于实验室培养；（3）对污染物敏感；（4）个体小、所需试样少，成本低。因此世界各国广泛使用溞类进行水生生态毒理学研究。

3.1 主要国家、地区及国际组织相关测试方法

1928 年，美国 Aimo Viehovever 首先将溞类应用于药物毒理学^[19]，Anderson BG 在 1972 年首次用溞类监测工业废水的毒性^[20]，美国 EPA 在 1976 年将溞类毒性试验列为必测项目，此后许多国家也展开了溞类的毒理研究，并制定了相关方法和标准。目前美国、欧盟、OECD、ISO、DIN 均制订了基于大型溞活动抑制的急性毒性测试方法。自 ISO 6341-2012 标准实施后，欧盟及成员国（13 个国家）参照该标准修订颁布了相应的国家和欧盟标准，标准内容和 ISO 标准一致，未做任何改动。如：欧盟（EN ISO 6341-2012）、英国（BS EN ISO 6341-2012）、法国（NF EN ISO 6341-2012）、德国（DIN EN ISO 6341）等，但德国标准（DIN 38412 Part 30）自成体系。美国 ASTM（E1192-97）和 EPA（EPA 821-R-02-012）制定了水和废水生物毒性测试方法，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试方法。日本的 JIS K 0229-92^[10]基本等同 ISO 6341-1989^[11]。

表 1 国外大型溞急性毒性相关标准

序号	标准制订主体	标准名称	标准编号	发布时间
1	ISO	Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test	ISO 6341	2012
2	欧盟	Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test	EN ISO 6341	2012
3	ASTM	Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians	E1192-97	2014
4	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	德国	Determining the tolerance of <i>Daphnia</i> to the toxicity of waste water by way of a dilution series (L30)	DIN 38412 Part 30	1989
6	日本	Testing methods for determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia</i> by chemicals	JIS K0229	1992
7	OECD	<i>Daphnia</i> sp., Acute Immobilisation Test	OECD 202	2004

序号	标准制订主体	标准名称	标准编号	发布时间
8	欧盟	<i>Daphnia</i> Sp. Acute Immobilisation Test	EC Regulation No 440, C2	2008
9	美国	Ecological Effects Test Guidelines: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids	OCSPP 850.1010	2016
注：1~5 是水和废水测试方法，6~9 是化学物质对溞类的活动抑制测试方法。				

OECD TG 202^[5]、欧盟 EC Regulation No 440, C2^[21]与美国 EPA 712-C-96-114^[3]的溞类急性活动抑制试验主要针对化学物质的生态毒理测试，而不是针对水和废水的生物毒性测试，但总体内容与 ISO 6341 相似，也具有参考性。

3.2 国内相关测试方法

我国于 1991 年参照 ISO 6341-1982^[2]制订了《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》（GB/T 13266-91）^[6]。如前所述，ISO 6341 标准已于 1989 年^[11]、1996 年^[22]以及 2012 年^[4]进行了 3 次修订。因此有必要对 GB/T 13266-91^[6]进行相应的修订。

目前我国共有 4 项基于大型溞的水质以及物质急性毒性测定方法（见表 2）。其中，GB/T 21830^[23]与 GB/T 31270.13^[24]分别参考 OECD 与 EPA 相关标准，针对化学物质的环境危害鉴别与化学农药的登记资料要求而制定，根据受试溞的活动抑制率，得到基于物质浓度的 EC₅₀ 值，其中 GB/T 31270.13-2014 也正在修订中。而 GB/T 16125^[25]综合了 ISO 与 OECD 相关标准的内容，但标准涉及的关键技术内容，包括试验程序、质量控制和质量保证、结果表示等，主要以 OECD 测试导则为主，也更适合化学物质的毒性测试。

表 2 国内大型溞急性毒性相关标准

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 物质对溞类（大型溞）急性毒性测定方法 ^[6]	GB/T 13266	1991
2	国家卫生健康委员会	大型溞急性毒性实验方法 ^[25]	GB/T 16125	2012
3	全国危险化学品管理标准化技术委员会	化学品 溞类急性活动抑制试验 ^[26]	GB/T 21830	2008
4	农业农村部	化学农药环境安全评价试验准则 第 13 部分：溞类急性活动抑制试验 ^[24]	GB/T 31270.13	2014

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 6341-2012^[4]、德国 DIN 38412 L 30-1989^[1]、美国 EPA 821-R-02-012^[27]、ASTM E1192-2014^[28]及 OECD TG 202^[5]，比较 5 个标准异同及可借鉴性，包括适用范围、术语定义、受试生物、参比物、稀释水、试样制备、测试条件、幼溞暴露、有效性标准（质量控制）与结果表征，具体见表 3。

表 3 相关标准方法主要技术指标比较

标准	适用范围	受试生物	幼蚤蚤龄	保种与预养	试验期间饲喂	参比物	样品采集	样品保存运输	样品预处理
ISO 6341-2012	废水、浸出液和渗滤液、淡水和孔隙水	大型蚤	不超过 24 h 非头胎蚤	来源于同一保种培养的健康蚤储备群体，无任何受胁迫现象，头胎繁殖时间不能延迟。保种培养条件和测试条件一致	无	重铬酸钾	参照 ISO 5667-16	0℃~6℃保存 24 h，-18℃保存 2 个月	浊度补偿，静置 2 h 取上清液，5000 g 离心 10 min 或过滤
DIN 38412 L 30-1989	废水	大型蚤	2 h~26 h	无	无	无	无	无	无
EPA 821-R-02-012	水和废水	模糊网纹蚤、蚤状蚤、大型蚤	不超过 24 h	测试前储备群体蚤的异常或死亡率不能超过 10%	暴露时间 96 h 时，48 h 饲喂	氯化钠、氯化钾、氯化镉、硫酸铜、十二烷基磺酸钠、重铬酸钾等	瞬时试样或组合试样；采样容器充满，密闭。有较大的悬浮物或漂浮物时，使用 2 mm~4 mm 筛网去除。	0℃~6℃避光运输和保存，不超过 24 h，采样 36 h 内开展测试	2 mm~4 mm 粗筛过滤，如果存在其他生物，可用 60 μm 滤膜过滤（但可能降低毒性）
ASTM E1192-97(R2014)	淡水、海水与废水	大型蚤、蚤状蚤、多蚤蚤	不超过 24 h	应来自同一培养群体，新引入亲蚤应隔离培养≥14 d。不能使用有卵鞍的群体产生的幼蚤。测试前 48 h，逐步更换培养基为稀释水，期间温度变化不超过 3℃	不饲喂	无	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

标准	适用范围	受试生物	幼蚤蚤龄	保种与预养	试验期间饲喂	参比物	样品采集	样品保存运输	样品预处理
OECD TG 202	化学物质	大型蚤，可使用其他适宜品种	小于 24 h 非头胎蚤	来源于同一保种培养的健康蚤储备群体，无任何受胁迫现象。保种培养条件和测试条件一致。在测试条件下至少驯养 48 h。	不饲喂	重铬酸钾	无	无	无
GB/T13266-1991	化学物质，工业废水、生活污水、地表水、地下水	大型蚤 <i>Daphnia magna</i> <i>straus</i>	出生 6~24 h 的幼蚤	实验室条件下培养 3 代以上、试验蚤应是同一母体的后代。	未涉及	重铬酸钾， 24h EC ₅₀ 为 0.5~1.2 ppm	含样品的采集及处理、采样间隔等规定	采集后 6h 之内不能进行试验，则必需将样品冷冻保存（0-4℃）。	未涉及
本标准	地表水、地下水、生活污水和工业废水。在 ISO 6341-2012 的基础上结合中国水质管理需求修改。	大型蚤。等同采用 ISO 6341-2012。	不超过 24 h 非头胎蚤等同采用 ISO 6341-2012。	来源于同一健康亲蚤的储备群体，未见任何受胁迫现象；测试前 7 d 内，亲蚤平均产蚤量 ≥3 只/d；保种培养的光照和温度条件应与测试条件一致。在 ISO 6341-2012 的基础上，结合了 OCSPP 850.1010 对亲蚤群体的规定。	不饲喂。等同采用 ISO 6341-2012。	重铬酸钾。等同采用 ISO 6341-2012。	按照相关要求采集试样，采样容器充满、密闭；有较大的悬浮物或漂浮物时，使用 2 mm~4 mm 筛网去除。在 ISO 6341-2012 的基础上，结合了 EPA 821-R-02-012 的过滤处理	6℃及以下避光保存不超过 24 h，-18℃保存 2 个月。等同采用 ISO 6341-2012。	必要时，静置 ≤ 2 h 消除浊度干扰，消除样品中其他生物的影响。样品温度达 21℃~25℃后用于测试。通常，不调节 pH 与溶氧含量。在 ISO 6341-2012 的基础上，结合了 EPA 821-R-02-012 的

标准	适用范围	受试生物	幼蚤蚤龄	保种与预养	试验期间饲喂	参比物	样品采集	样品保存运输	样品预处理
									滤除其他生物的规定。

续表 3 相关标准方法主要技术指标比较

标准	测试用水	试样	测试环境条件	幼蚤暴露	暴露时间与暴露方式	有效性标准	结果表征
ISO 6341-2012	稀释水，M4（不能用于含有二价金属离子或者成分未知的样品）。pH 为 7.8 ± 0.5 。硬度为 $250 \text{ mg/L} \pm 50 \text{ mg/L}$ （以 CaCO_3 计），Ca/Mg 比接近 4:1。DO 在 7 mg/L 以上	至少 5 个测试浓度，预试验通常选 10 为稀释因子。正式试验稀释因子通常为 2	完全黑暗或光暗比 16 h : 8 h；温度 $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ；溶解氧浓度 $\geq 2 \text{ mg/L}$ ；pH 为 6~9	预试验：每个浓度 5 个幼蚤，不设平行；正式试验、限度试验或 LID 测试：每个浓度组与对照组至少 20 只幼蚤，分为 4 组，每组 5 只幼蚤。承载量 $\geq 2 \text{ mL/只}$	48 h；无	测试结束时，对照组活动抑制的蚤数 $\leq 10\%$ ；测试期间，应保持测试条件正常；参比物重铬酸钾 24 h EC_{50} 应为 $0.6 \text{ mg/L} \sim 2.1 \text{ mg/L}$ 之间	LID 或基于试样稀释度的 EC_{50}
DIN 38412 L 30-1989	稀释水，pH 为 7.0 ± 0.2 。硬度为 Ca^{2+} 浓度 $2.2 \text{ mmol/L} \pm 0.4 \text{ mmol/L}$ ， Mg^{2+} 浓度 $0.5 \text{ mmol/L} \pm 0.1 \text{ mmol/L}$ ，Ca/Mg 比约 4:1	取适量体积的废水原水用稀释水按比例稀释，配制系列稀释样品作为试样	未规定光照条件；测试温度 $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ；未规定溶解氧浓度；测试 pH 7.0 ± 0.2	仅 LID 法。按照 1、2、3、4、6、8、12、16、24 等逐级稀释，每个浓度 2 个 50 ml 烧杯，各加入 20 ml 稀释试样，每平行 5 只大型蚤	24 h；无	对照组中活动抑制大型蚤数量 ≤ 1	至少 9 只蚤仍能活动的最低 G 值，以稀释倍数表示

标准	测试用水	试样	测试环境条件	幼蚤暴露	暴露时间与暴露方式	有效性标准	结果表征
EPA 821-R-02-012	稀释水或 20% 的矿泉水。pH 为 7.4~7.8, 硬度为 80~100 mg CaCO ₃ /L。	废水: 5 个浓度与对照组, 稀释因子 ≥ 0.5。受纳水体: 原试样与对照组, 无稀释因子或 ≥ 0.5	光周期 16 h : 8 h, 光照强度 10~20 μE/m ² /s; 温度 20℃ 或 25℃ (变化 ≤ 3℃); 溶解氧浓度 ≥ 4 mg/L; pH 为 6~9 或不调 pH	仅 EC ₅₀ 法。每个浓度组与对照组至少 20 只幼蚤, 分为 4 组, 每组 5 只幼蚤	24, 48 或 96 h; 静态、半静态、流水式	对照组存活率 ≥ 90%	LC ₅₀
ASTM E1192-97(R2014)	受纳水体废水排口上游采集的稀释水, ASTM 培养基, 未受污染、通气良好的地表水或地下水。与试样相比, pH 相差 ≤ 0.2、硬度 ≤ 10%, 溶解氧饱和度为 40%~100%	至少 5 个浓度, 级比 ≥ 0.5。可选择关注浓度、1/2 关注浓度和 2 倍关注浓度及阴性对照组, 以确认关注浓度是否有急性毒性	光周期 16 h : 8 h; 温度 20℃ (变化 ≤ 4℃); 溶解氧 40%~100% 饱和浓度; 未规定 pH	仅 EC ₅₀ 法。每个浓度至少 10 只幼蚤, 承载量 ≤ 0.8 g/L (湿重); 流水式: 每个浓度至少 20 只幼蚤, 承载量 ≤ 1 g/L (湿重)	48 h; 静态、半静态、流水式	测试前亲蚤群体在测试温度下驯养 48 h; 对照组受试生物异常率不超过 10%; 包括活动抑制率 ≤ 37% 或 ≥ 63% 的处理组时, EC ₅₀ 才有效	LC ₅₀ , EC ₅₀
OECD 202	天然水或标准稀释水, 建议与培养水类似。M4 和 M7 培养基不能用于含有金属的受试物的测试	预试验: 较大范围浓度系列。正式试验: 至少设 5 个浓度组, 级比 ≤ 2.2	光周期 16 h : 8 h, 或完全黑暗; 温度 18℃~22℃ (变化 ≤ 1℃); pH 6.0~9.0, 变化 ≤ 1.5; 溶解氧 ≥ 3 mg/L	仅 EC ₅₀ 法。每个浓度组和对照组至少 20 只幼蚤, 分成 4 组, 每组 5 只。承载量 ≥ 2 ml/只蚤	48 h; 静态、半静态、流水式	测试结束时, 对照组和受试组的溶解氧浓度 ≥ 3 mg/L; 对照组活动受抑制蚤数不超过 10%	EC ₅₀

标准	测试用水	试样	测试环境条件	幼蚤暴露	暴露时间与暴露方式	有效性标准	结果表征
GB/T13266-1991	人工稀释水, pH、硬度参数范围与 ISO6341-2012 不一致	5~7 个浓度, 浓度系列中以能出现一个 60%左右和 40%左右大型蚤运动受抑制或死亡的浓度最为理想。	温度变化不超过 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。毒性试验在 $20\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行。溶解氧 $\geq 2\text{ mg/L}$ 。试验温度包含 2 个区间, 与 ISO6341-2012 不一致; 未规定光照强度、pH,	预试验: 每个浓度至少 5 个幼蚤; 正式试验: 100 mL 烧杯 (或结晶皿), 装 40~50 mL 试验液, 置蚤 10 个。每个浓度至少有 2~3 个平行。 单个试验容器中的试验生物用量与现行的 ISO6341-2012 不一致	48h; 未明确暴露系统	对照组试验未出现不活动大型蚤。 重铬酸钾的 24 h-EC ₅₀ 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时为 0.5~1.2 ppm 的范围内。 试验结束时溶解氧浓度必须大于或等于 2 mg/L 重铬酸钾的 24 h-EC ₅₀ 范围与 ISO6341-2012 不一致	EC ₅₀ , 只针对物质, 未规定水质的表征方法
本标准	标准稀释水和其他稀释水。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。本部分等同采用了 ISO 6341-2012 的规定	LID 法, 逐级稀释。 EC ₅₀ 法, 预试验选择 3 个稀释比 10 的连续浓度的试样, 限度试验设置原水与稀释水对照组, 正式试验至少设 5 个浓度 (稀释比 ≤ 2)。 根据预试验期间试样的 COD 或 TOC 变化情况, 限度试验或正式试验选择静态法或 24 h 换水的半静态法测试方式。等	光照强度应 $\leq 1500\text{ lx}$, 光周期 16 h : 8 h; pH 值在 6.0~9.0 之间选择, 变化 $\leq \pm 0.75$; 溶解氧浓度 $\geq 2\text{ mg/L}$; 温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 变化 $\leq \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。光照强度等同采用了 OECD TG 211 的规定。其他环境条件在 ISO 6341-2012 的基础上结合了 OECD	预试验: 每个浓度 5 只幼蚤, 不设平行。限度试验与正式试验: 每个浓度与对照组至少 20 只幼蚤, 分为 4 组, 每组 5 只幼蚤。本部分等同采用了 ISO 6341-2012 的规定。	48 h; 半静态和半静态。在 OECD 202 等标准的基础上修改	测试结束时, 阴性对照组活动受抑制蚤数量 $\leq 10\%$; 相同测试条件下, 参比物重铬酸钾 24 h EC ₅₀ 应在 0.6 mg/L~2.1 mg/L 范围内; 单位水体生物承载量 $\geq 2\text{ mL/只}$; 测试条件符合要求。等同采用了 ISO 6341-2012 的规定。	LID 与 EC ₅₀ 。等同采用了 ISO 6341-2012 的规定。

标准	测试用水	试样	测试环境条件	幼溞暴露	暴露时间与 暴露方式	有效性标准	结果表征
		同 采 用 在 ISO 6341-2012。	202 的变化范围				

综上所述可知：（1）ISO 6341-2012、DIN 38412-30-1989 均涉及 LID 法，其中 DIN 38412-30-1989 详细描述了 LID 法的测试要求，更适用于表征水质的综合毒性，本标准 LID 测试样品稀释综合了 ISO 6341-2012 与 DIN 38412-30-1989；（2）EPA 821-R-02-012-2002，对样品采集与预处理的规定更明确，本标准样品采集、保存及处理方法借鉴了该标准；（3）ASTM E1192-97(R2014)，对 EC₅₀ 测试的试样浓度提出了要求，宜包括活动抑制率≤37%或≥63%的两个试样浓度组；（4）OECD TG 202，规定了受试生物的承载量≥2 ml/只蚤，更符合大型蚤毒性测试要求。因此，本标准修订主要参考 ISO 6341-2012（EC₅₀）与 DIN 38412-30-1989（LID），并结合 EPA 821-R-02-012-2002、OECD TG 202-2004 及 ASTM E1192-97(R2014)的相关要求。

4 标准修订的基本原则和技术路线

4.1 标准修订的基本原则

《水质 急性毒性的测定 大型蚤活动抑制法》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生物急性毒性测定方法中首先应考虑的问题。我国地域辽阔，淡水蚤类（枝角类甲壳动物）有 136 种，资源丰富，但真正可以标准化用于毒性试验的蚤类并不多。国内尚无蚤类种质资源库，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，确定大型蚤为受试生物。

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充分调研分析。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，随着实验技术的不断发展，新的技术必定会取代落后的实验技术。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。

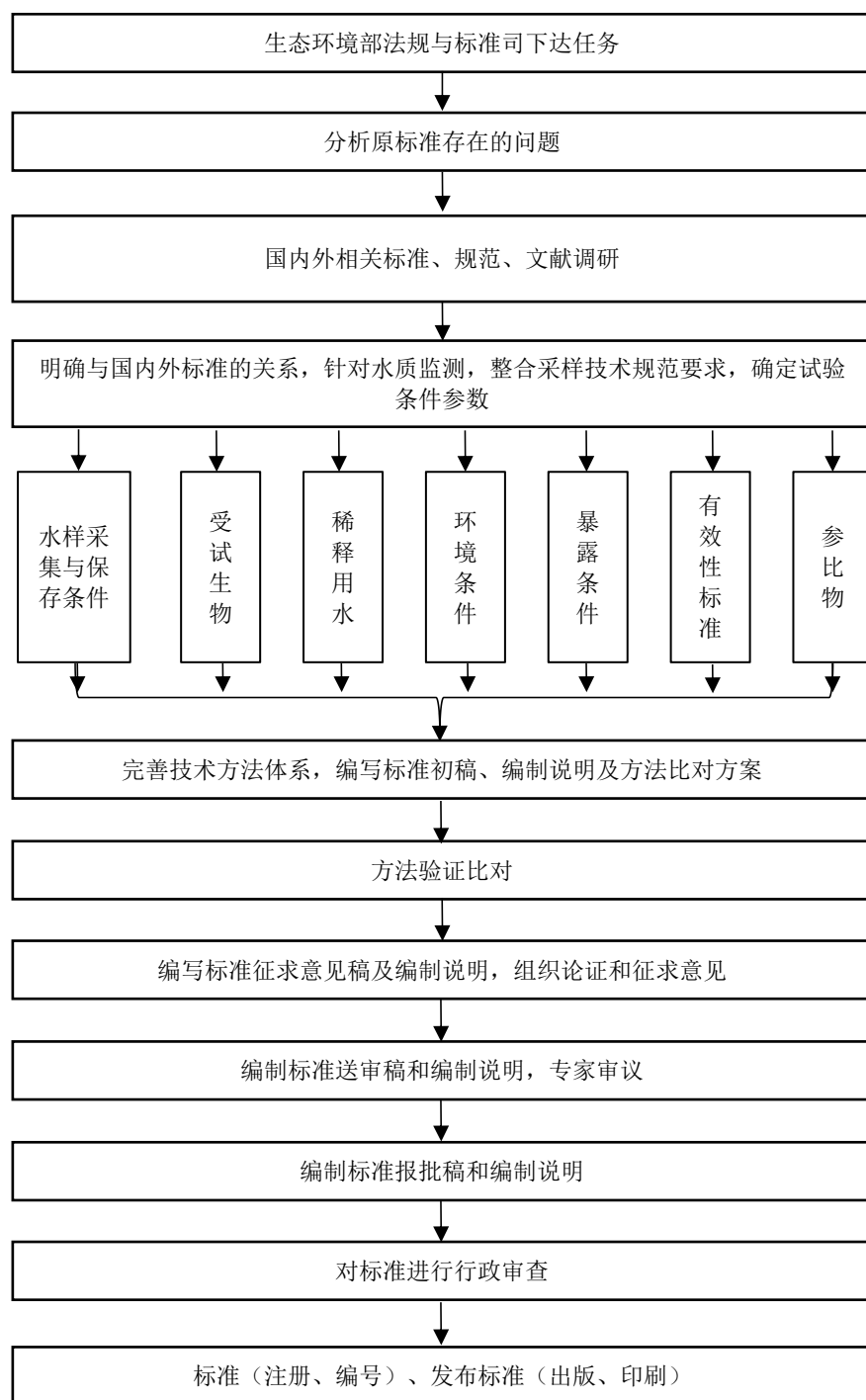


图 1 标准制订技术路线图

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《ISO 6341:2012, Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)—Acute toxicity test[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 2012.》^[4]，经济与发展组织（OECD）TG 202 Acute Toxicity Test（2004）^[5]

及美国环境保护署（EPA）《Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. EPA 712-C-96-114, 1996》^[3]等标准（见表 3）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 13266-1991 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有以下几个方面：

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

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、生活污水与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；EC₅₀ 法适用于确定半数效应浓度。

由于大型溞为淡水无脊椎动物，因此，本方法不适应于海水。

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 6341-2012 第 2 节，增加了样品采集、保存和管理要求，以及水质参数检测要求，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

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

因不同蚤龄的大型蚤可能对测试结果产生影响，参考 ISO 6341-2012 第 3 节，定义了试验用蚤的蚤龄，即“24 h 以内新出生或孵化的幼蚤”。

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。

参考 ISO 6341-2012 第 3 节，本标准以“活动抑制”为效应终点，不用致死率，死亡幼蚤计入活动抑制蚤数。“活动抑制”指轻轻摇动试验容器，若 15 s 内蚤体不能游动，认为其活动能力受到抑制，即使其触角仍能活动，也应视为活动抑制，包含致死效应。

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“试样中原水的体积分数的倒数。” LID 定义为“在规定条件的测试周期内，不会导致受试蚤活动抑制或死亡等可见不良效应的最低稀释倍数。”即至少 90% 受试幼蚤保持活动能力的最低稀释倍数。同时，为凸显水质毒性测定的特点，将半数效应 EC_{50} 修订为：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，本标准试样浓度指测试容器中原水的体积分数（%）。

针对稳定的废水样品，规定了宜采用静态法，即“测试周期内，不更换试样的测试方式”。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”。由于样品中污染物成分复杂，无法采用化学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。对于成分复杂的废水样品，可在测试前测定样品的 COD 或 TOC 变化情况，或根据预试验期间试样的 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“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”。本标准中，选用重铬酸钾为参比物。

为了便于非生物专业的读者理解，增加了亲蚤和孤雌生殖两个术语的定义。参照 OECD TG 211 导则附录 1 中的术语“Parent Animals”定义“亲蚤”为繁殖幼蚤的大型蚤母蚤。参考《农药登记环境影响试验生物试材培养 第 5 部分：大型蚤》（征求意见稿），定义“孤雌生殖”：为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。

5.2.4 方法原理

参照 ISO 6341-2012，补充了方法原理，修订为“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。”

5.2.5 干扰消除

本标准测定的是水质综合生物毒性，所以规定样品不作预处理，即包括物理致死与化学

致死的共同毒性作用。但当仅考虑化学性致死时，可通过静置消除样品中悬浮颗粒物对滤食性大型溞毒性测试的干扰影响，静置时间 ≤ 2 h。该静置时间参考了 ISO 6341-2012 第 8.1 节描述的“必要时静置不超过 2 h”以及 DIN 37412-30-1989 第 11 节条款 c 描述的“为使悬浮物沉淀，静置时间应 >1 h 并且 ≤ 2 h”。此外，地表水与生活污水样品中的捕食性水生动物以及与大型溞近似的水生动物（如溞状溞 *Daphnia pulex*）会对大型溞毒性测试产生干扰影响，这类样品宜使用孔径 60 μm （250 目）的筛网过滤。

5.2.6 试剂与材料

本次标准修订对包括受试生物、稀释水与培养基、参比（毒）物等进行了相应的更新。

条款 6.1 参照 ISO 6341-2012 第 6.1 节以及 EPA OCSP 850.1010 条款（e）第 3 条对受试生物进行了规定说明，使用在规定繁殖条件下孤雌繁殖的大型溞（*Daphnia magna* Straus）幼溞，溞龄应 ≤ 24 h 的非头胎溞，且来源于同一保种培养的健康溞储备群体。此外，亲溞群体还应满足如下条件：

- a) 未见任何受胁迫现象（如，2 d 内死亡率 $>20\%$ ，出现雄溞、冬眠卵或体色异常等现象）；
- b) 测试前 7 d 内，用于产溞的亲溞平均产溞量 ≥ 3 只/d（参考 EPA OCSP 850.1010 条款（e）第 3 条）。
- c) 保种培养条件（光照、温度）应与测试条件一致。如果培养条件与测试条件有显著差异，应在测试条件下驯化亲溞以获取符合要求的幼溞。
- d) 参考 ISO 6341-2012、DIN 38412 L 30-1989 等相关标准，规定受试生物为大型溞（*Daphnia magna* Straus），未进一步对品系进行规定。

条款 6.2 规定了标准稀释水的配制方法及水质指标要求。本标准采用了与 ISO 6341-2012 相同配方的标准稀释水，标准稀释水用纯水制备，所需试剂包括 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （6.2.2）、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （6.2.3）、 NaHCO_3 （6.2.4）、KCl（6.2.5），均为分析纯，从而确保配制的稀释水具有统一的标准。

参照 ISO 6341-2012，新配制的标准稀释水 pH 值在 7.8 ± 0.5 之间；溶解氧浓度 ≥ 7.1 mg/L（溶解氧饱和度 $\geq 80\%$ ）。将配制的标准稀释水曝气至溶解氧饱和，pH 稳定。必要时用 1 mol/L 氢氧化钠溶液（6.2.9）或 1 mol/L 盐酸溶液（6.2.8）调节 pH 值至 7.8 ± 0.5 。按这种方法配制的稀释水在使用前不得再次曝气。由于标准稀释水以纯水和已知的分析纯试剂配制，硬度范围相对固定，未进一步要求硬度范围。

此外，在培养、驯化和测试过程中溞类未见任何胁迫迹象的水也可作为稀释水（6.2.15），如脱氯自来水，稀释水的 pH 值在 6.0~9.0 之间，硬度在 140 mg/L~275 mg/L（以 CaCO_3 计）之间。但用于大型溞保种的 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。

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试样中的污染物与发生化学反应干扰测试。应确保所用材料不会对试样中的污染物产生吸附作用，避免试样中污染物浓度降低，影响测试结果。条款 7.1~7.18 规定了相关仪器设备的功能参

数，如：用于样品采集的不锈钢采水器（7.1）、不锈钢筛网（7.2，孔径 2 mm~4 mm、孔径 60 μm）、棕色磨口具塞玻璃瓶等采样瓶（7.3，容积≥1 L）及用于样品运输保存的可移动冷藏箱（7.5，具有 6 °C 及以下冷藏功能）；用于水质参数测定的温度计（7.5，测量范围 0 °C~40 °C，最小分度为 0.1 °C）、pH 计（7.8，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（7.10，测量范围 0 mg/L~20 mg/L，最小分度为 0.1 mg/L）、硬度计（7.9，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箱（7.12，温控范围 15 °C~30 °C，温度控制偏差≤0.5 °C，可自动设置光暗比为 16 h : 8 h，光照强度≤1500 lx）、测试容器（7.14，玻璃烧杯或顶空瓶，规格 100 ml，宜采用 100 ml 烧杯，若样品有气味或疑似具有挥发性时，应采用顶空瓶）；以及用于样品稳定性判定的，总有机碳（TOC）分析仪（7.16）等。

为了鉴定野外采集的大型蚤种属，还需要用到显微镜或者体视镜（7.15）。

5.2.8 样品采集、保存及处理

条款 8.1~2.2 规定了样品的采集和保存方法。

EPA-821-R-02-012 指南 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 天，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 采集一次样本（总共 4 个样本），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 天，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水样。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。在工作活动结束后，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 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。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≤ 0.1 L/min；采集含 SVOCs 样品时出水流速应为 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 ≥ 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。为了避免不同批次采集的样品发生变化，应及时于 6 ℃及以下避光保存。

参考 EPA 821-R-02-012 第 9.1.2 条款，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（7 目~12 目）的筛网（7.2）去除。样品沿采样瓶内壁缓慢倒入，与瓶塞间不留空隙，宜采集不少于 2 L 的样品。宜在采样时测定 pH、DO、电导率等水质参数。

样品采集后，应立即于 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于-18 ℃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。由于玻璃容器冷冻保存时可能破裂，24h 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（7.3）运输和保存。

因废水样品污染成分复杂，无法一一通过化学分析定性与定量，所以提出采用 COD 或 TOC 指标，要求到实验室后测定废水样品的 COD 或 TOC，以便后续质量控制，判断水质是否发生变化。

条款 8.3 规定了样品预处理要求。冷冻保存的样品应在 ≤ 22 ℃的温度条件下解冻。测试开始前，将样品置于 18 ℃~22 ℃条件下，待温度达到 18 ℃~22 ℃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、城镇污水处理厂出水、农药废水、印染废水等样品，分别采用 2 种保存方法验证大型蚤急性毒性测试结果，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 2 个月，室温下解冻后开展测试。2 种方法大型蚤急性毒性验证数据见表 4，各稀释倍数的受试生物总数为 20 只。

结果表明：6 ℃冷藏、-18 ℃冷冻保存 2 个月的试样，毒性测试结果较为一致，自然解冻与水浴解冻的毒性结果较为一致，说明上述试样保存方法与解冻方法对大型蚤毒性测试无显著影响。

表 4 样品对大型蚤的急性测试数据（不同保存方法）

样品	稀释倍数 (D)	受试生物抑制数（只）			
		方法 1		方法 2	
		1d	2d	1d	2d
南京桡溪镇地下水	1	0	0	0	0
	-	LID=1, EC ₅₀ >100%		LID=1, EC ₅₀ >100%	
南京桡溪河地表水	1	0	0	0	0
	-	LID=1, EC ₅₀ >100%		LID=1, EC ₅₀ >100%	
南京城镇污水处理厂出水	1	0	0	0	0
	-	LID=1, EC ₅₀ >100%		LID=1, EC ₅₀ >100%	
江苏某农药厂污水	1	11	20	12	20

处理出水	2	8	17	7	16
	4	7	12	6	13
	8	5	11	5	11
	16	2	4	3	6
	32	2	4	2	4
	64	0	0	0	0
	-	LID=64, EC ₅₀ =13.4%		LID=64, EC ₅₀ =12.5%	
山东某印染厂污水 处理进水	2	12	20	13	20
	4	6	14	8	16
	8	4	9	4	8
	16	2	4	2	4
	32	0	0	0	0
	-	LID=16, EC ₅₀ =13.9%		LID=16, EC ₅₀ =13.4%	
山东某印染厂污水 处理出水	1	0	0	0	0
	-	LID=1, EC ₅₀ >100%		LID=1, EC ₅₀ >100%	

条款 8.3 对样品预处理方法做了详细规定，包括温度、pH 及溶解氧要求。测试前需将样品的温度调节至大型溞生长适宜的温度，18 ℃～22 ℃。该温度范围与保持一致。

对于 pH 与溶解氧的要求，本标准分别考虑了两种情况：

- (1) 一般不调节样品 pH 值与溶解氧浓度，即测定 pH 与溶解氧影响在内的急性毒性。
- (2) 需测定排除 pH 与溶解氧影响的急性毒性，应使用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节样品 pH 值至 6.0～9.0。当稀释后试样的溶解氧浓度<3.6 mg/L（溶解氧饱和度<40%）时，可通过搅拌或曝气等方式充氧≤20 min，确保受试溞正常生长所需的溶解氧浓度，但是充氧后溶解氧浓度不能超过溶解氧饱和度（20 ℃，9.08 mg/L）。溶解氧饱和度<40%以及曝气时间不超过 20 min 参考了 ISO 6431-2012 第 8.1 节中的描述“当且仅当溶解氧饱和度<40%时，可以通过适当的方法充气不超过 20 min，且不可使溶解氧浓度过饱和”。

5.2.9 测试步骤

本次修订参照 ISO 6341-2012 中的上述内容，将原 GB/T 13266-91 标准中第 7 部分预试验，第 8 部分正式试验的内容并入第 9 节，但未采纳针对化学物质毒性测试的溶剂对照组等内容。并将上述内容中通用步骤及全文涉及环境条件的描述汇总为 9.1 测试环境条件。按照 LID 和 EC₅₀ 两类测试进行了修改。具体如下：

条款 9.1 规定了具体的测试环境条件，测试在人工气候箱或恒温室中进行。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。

根据表 3 的调研资料，多数水质相关标准中规定的试验光照条件为：完全黑暗或光暗比 16h:8h（ISO 6341: 2012、OECD TG 202），DIN 38412 L 30-1989 中未规定，EPA 821-R-02-012 中规定为光照强度 10 μE/m²/s～20 μE/m²/s（即 540 lx～1080 lx），光暗比 16h:8h。此外，与大型溞相关的 OECD TG 211 导则中推荐的光照强度范围为 1000 lx～1500 lx。结合本实验室

的经验，最终确定光照强度应不超过 1500 lx，设置光周期使光暗比为 16 h : 8 h。为兼顾光降解性样品，也可以采用完全黑暗的条件开展测试。在 20 °C ± 2 °C 内选择测试温度，测试过程中试样温度变化幅度在 ± 1.0 °C 以内。pH 值与测试目的对应，分为两种情况：需测定 pH 影响在内的急性毒性时，在样品的 pH 值条件下直接开展测试。若需测定排除 pH 影响在内的急性毒性，宜在 6.0~9.0 之间选择 pH 值，且测试过程中试样 pH 值变化幅度应在 ± 0.75 以内。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 ≥ 2.0 mg/L（溶解氧饱和度 ≥ 22%）。测试过程中不投喂饵料。

其中对于 pH 值的规定，主要参考了 OECD 202 的 pH 值范围及变化幅度。国外相关标准对测试期间 pH 的规定各不相同，ISO 6341-2012 为 7.8 ± 0.5，DIN 38412 L 30-1989 为 7.0 ± 0.2，EPA 821-R-02-012 为 7.4~7.8，ASTM E1192-97(R2014)未明确，OECD 202 为 6.0~9.0 且不超过 1.5 个单位。结合本实验室的经验，pH 为 6.0~9.0 条件下不会对大型蚤产生影响。因此，采用了 OECD 的 pH 值范围，即 6.0~9.0。另一方面，采用更宽的 pH 值范围更适用于各种类型的样品，减少调整 pH 还可以避免因调节 pH 对毒性结果产生的影响。但在合适的范围内选定 pH 值后，测试期间应确保试样 pH 值变化幅度在 ± 0.75 以内。该变化范围使用了 OECD 202 的 pH 值变化范围值。测试过程中，如果 pH 变化幅度超过 ± 0.75，说明试样不稳定，应改用半静态法重新开展测试。

污染物浓度相对稳定的样品宜采用静态法（48 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（常用的半静态法为 24 h 换水）。稳定性的参考判断方法如下：预试验期间，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，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。用胶头吸管小心的将受试生物从 A 组测试容器中吸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 分钟。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。

条款 9.2~9.3 详细说明了 LID 试验与 EC₅₀ 试验。LID 试验采用逐级稀释法，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，配制 1.5 倍和 2 倍的稀释试样，然后逐级稀释。每个浓度组使用 20 只幼蚤，分为 4 个平行组，每组 1 个容器，每个容器中投入 5 只幼蚤，同时设置稀释水对照组。将测试容器放置于人工气候箱或恒温室。根据试样的稳定性采用静态法或者半静态法，测试条件同 9.1，测试周期为 48 h。

为了便于读者理解稀释操作，稀释操作举例如下：取 50 ml 样品，加入 50 ml 稀释水至 100 ml，获得 100 ml 稀释倍数为 2 的试样；取 50 ml 稀释倍数为 2 的试样，加入 50 ml 稀释水至 100 ml，获得 100 ml 稀释倍数为 4 的试样；取 50 ml 稀释倍数为 4 的试样，加入 50 ml 稀释水至 100 ml，获得 100 ml 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 66.7 ml 样品加入 33.3 ml 稀释水，至 100 ml，获得 100 ml 稀释倍数为 1.5 的试样；取 50 ml 稀释倍数为 1.5 的试样，加入 50 ml 稀释水至 100 ml，获得 100 ml 稀释倍数为 3 的试样；取 50 ml 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 EC_{50} 测试，宜通过预试验确定正式试验的浓度范围，预试验采用静态法。以逐级稀释倍数（即等比数列的公比）为 10 选择 3 个连续浓度的稀释水样（试样），同时设置一个稀释水对照，每一浓度 5 只幼蚤，以确定样品的毒性范围。预试验不设平行，测试条件同 9.1，测试周期为 48 h，确定受试蚤活动抑制率 100%（或最大抑制率）~0%与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高试样浓度的平行处理，分别于 0 h、24 h 与 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 24 h 换水的半静态法。

如果预试验结果显示原水处理组受试蚤均未产生活动抑制影响，以原水作为试样开展限度试验验证“低毒”的测试结果。受试组和对照组各 20 只幼蚤，20 只幼蚤分为 4 个平行组，每组 1 个容器，每个容器投放 5 只幼蚤。测试条件同上，测试周期为 48 h。如果测试结束时，受试组幼蚤活动抑制率 $\leq$ 10%，测试停止。若测试期间观测到受试蚤活动抑制率 $>$ 10%，应进一步开展正式试验。

根据预试验结果确定的受试蚤活动抑制率 100%（或最大抑制率）~0%对应的浓度范围（体积分数），在此范围内按一定逐级稀释倍数（一般 $\leq$ 2.2）稀释，应至少选择 5 个等比系列浓度的试样进行正式试验，同时设置一个空白试验。系列浓度中，宜包括活动抑制率为 $\leq$ 37%和 $\geq$ 63%的 2 个浓度组。正式试验每个浓度组各 20 只幼蚤，分为 4 个平行组，每组 1 个容器，每个容器投放 5 只幼蚤。测试条件同 9.1，测试周期为 48 h。以参比物开展的正式试验结果参见表 7，以实际样品开展的正式试验结果参见表 8。

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）。参比物推荐采用重铬酸钾，测定重铬酸钾对大型蚤活动抑制的 24 h EC_{50} ，以验证受试生物的敏感性。重铬酸钾 24 h EC_{50} 应为 0.6 mg/L~2.1 mg/L 之间。如测定值不在此范围内，应检查测试步骤，以及大型蚤的培养方式，必要时重新获取测试用蚤。关于参比物试验的次数，OECD TG 202 第 5 条规定最好每月开展一次，一年至少开展两次；ISO 6341-2012 第 9.4 节规定测试完成 1 个月内开展参比物测试；EPA-821-R-02-012 第 4.7.2 节规定每月至少开展一次参比物测试。如果试验方法每月或较少开展，则每次测试同时开展。综合 ISO 6341-2012 以及 EPA-821-R-02-012 的要求，本标准规定：样品测试前 1 个月内应至少开展一次参比物试验。对于实验室保种培养的大型蚤，每半年至少开展一次参比物试验（见附录 C）。

条款 9.5 规定了观测和记录的内容，包括：测试开始 0 h 及 48 h，用照度计（7.13）测定并记录试验容器（7.14）液面高度的光照强度。测试开始 0 h、24 h、48 h 用温度计（7.7）、pH 计（7.8）和溶解氧测定仪（7.10）测定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。每日观察并记录每个容器中仍有活动能力的新生幼蚤数量，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), 出现死亡幼蚤时及时清理。为避免测定环境条件时, pH 电极、溶解氧电极以及温度计对受试生物产生影响, 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。

5.2.10 结果计算

条款 10 规定了 LID 与 EC_{50} 的确定方法。对于 LID 的确定, 在至少有 90% 的新生幼蚤保持活动能力的受试组中, 选择稀释倍数最低的受试组, 以其稀释倍数 D 作为 LID。LID 的结果应为整数, 如 $LID=2$ 。LID 的确定示例见附录 D。附录 E 给出了采用寇氏法计算 EC_{50} 的步骤, 并以具体数据为例详细说明了 EC_{50} 的计算过程。

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, 包含新生幼蚤活动抑制率 $\geq 63\%$ 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 EC_{50} 或不需要计算 EC_{50} 的情形。因此, 规定了“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)。”

5.2.11 有效性、敏感性、精密度以及正确度

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稀释水、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 家实验室分别以稀释水为试样开展空白试验, 重复 6 次, 活动抑制率均小于 10%, 满足 $\leq 10\%$ 的要求。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。

精密度的计算方法参考了 HJ 168-2020。本标准采用“新生幼蚤活动抑制率”, 计算了实验室内与实验室间的相对偏差, 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。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 EC_{50} 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%。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 EC_{50} 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 EC_{50} 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%。

参考德国水污染物排放标准中综合毒性指标中基于生态毒性测试的 LID 限值范围为 2~32, 确定 LID 值的低值和高值分别为 2 和 32, 并取 $LID=8$ 作为中值。基于重铬酸钾对大型蚤 48 h $EC_{10}=0.6$ mg/L, 推算加标浓度 1.2 mg/L、4.80 mg/L 以及 19.2 mg/L 重铬酸钾溶液的 LID 值分别约为 2、8、32。6 家实验室分别以标准稀释水配制加标浓度依次为 1.2 mg/L、4.80 mg/L 以及 19.2 mg/L 重铬酸钾溶液, 作为低毒、中毒、高毒模拟样品, 进行 6 次 48 h 最低无效应稀释倍数 LID 的测定。依据 HJ 168-2020, 采用 LID 的相对误差表征正确度。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

准偏差分别为 3.36%、4.19%、4.38%。

5.2.12 质量保证和质量控制

条款 12 规定了空白试验与参比物试验（阴性对照和阳性对照）及测试环境条件应满足下列要求，测试结果方为有效。“测试结束时，空白组中活动受到抑制的新生幼蚤数量 $\leq$ 10%。”，以确保新生幼蚤的健康状态，如果对照组受试蚤运动抑制率过高说明受试生物（幼蚤）本身存在质量问题，受试蚤的活动抑制率并非完全由试样导致。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 EC₅₀ 应在一定范围内，以确保受试生物（幼蚤）的敏感性符合测试要求。经 6 家实验室测试验证，参比物重铬酸钾的 24 h EC₅₀ 及 95% 置信限为均在 ISO 6341 推荐的 0.6~2.1 mg/L 范围内，因此，本标准参照 ISO 6341，推荐的重铬酸钾 24h EC₅₀ 为 0.60~2.10 mg/L。此外，测试条件应符合 9.1 测试环境条件要求。

5.2.13 测试报告

本次修订参照 ISO 6341-2012，但未采纳针对物质的溶液制备以及相关结果的描述。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、溶解氧浓度及静置或过滤条件、调 pH 等前处理方法；
- c) 受试生物的种名、来源、蚤龄等信息；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、生物承载率、换水等信息；
- e) 空白组结果是否符合质量保证和质量控制规定的要求；
- 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。

5.2.14 附录

包括附录 A~附录 E 共 5 个附录，均为资料性附录。

附录 A：M4 和 M7 培养基的配制，参考 ISO 6341-2012 附录 A 以及 OECD TG 211 导则相关内容编写。

附录 B：大型蚤的培养繁殖方法，参考 ISO 6341-2012 附录 C 以及 GB/T 16125-2012 附录 C 相关内容编写。

附录 C：重铬酸钾对受试生物（大型蚤）的急性活动抑制测试，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 以及 ISO 6341-2012 附录 B 相关内容编写。

附录 E：废水对大型蚤（*Daphnia magna* Straus）活动抑制的 LID 测定示例，参考 ISO 6341-2012 附录 F 相关内容编写。

6 方法验证报告

6.1 实验室内验证

6.1.1 稀释水验证

对稀释水进行了 6 次实验室内验证, 大型溞幼溞的活动抑制率结果见表 5。结果显示, 满足阴性对照活动抑制率 $\leq 10\%$ 的质控要求。

表 5 稀释水试验精密度验证数据 (24h 幼溞活动抑制率)

样品	各次试验抑制率(%)						$\bar{X}_i$	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

对重铬酸钾进行了 6 次实验室内验证, 计算参比物样品的活动抑制率, 检验其是否符合重铬酸钾的 24 h EC_{50} 应在 0.6 mg/L~2.1 mg/L 范围内的质控要求。验证结果为参比物重铬酸钾 24 h EC_{50} 为 1.07 mg/L~1.35 mg/L, 符合应在 0.6 mg/L~2.1 mg/L 范围内的要求。

表 6 重铬酸钾精密度验证数据 (24 h 幼溞活动抑制率)

浓度 (mg/L)	各次试验抑制率(%)						$\bar{X}_i$	S_i	RSD_i
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
0.32	0	0	0	0	0	0	0%	0	0
0.56	0	0	0	0	0	0	0%	0	0
1.00	20.0	40.0	20.0	40.0	40.0	40.0	36.7%	0.103	22.3%
1.80	80.0	80.0	100	100	80.0	100	90.0%	0.110	12.2%
3.20	100	100	100	100	100	100	100%	0	0
EC_{50} (mg/L)	1.35	1.20	1.20	1.07	1.20	1.07	1.18	0.103	8.73%
95%置信区间	1.26~ 1.45	1.11~ 1.31	1.14~ 1.27	1.01~ 1.14	1.11~ 1.31	1.01~ 1.14	/		

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、农药厂污水处理出水、印染厂污水处理进水及出水等样品, 进行了大型溞急性活动抑制测试验证, 每个样品各浓度处理分别测定 6 次, 结果见表 7 和表 8。

表 7 实际样品精密度验证数据 (48 h 幼溞活动抑制率)

样品	测试浓度 (%)	各次试验抑制率(%)						$\bar{X}_i$ (%)	S_i	RSD_i (%)
		X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
南京城镇污水处理厂出水	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.00	—

样品	测试浓度 (%)	各次试验抑制率(%)						$\overline{X}_i$ (%)	S_i	RSD_i (%)
		X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6			
南京桠溪河地表水	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.00	—
南京亚栖镇地下水	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.00	—
江苏某农药厂 污水处理出水	100	95	100	100	95	100	100	98.3	0.03	2.63
	50	85	80	75	85	70	75	78.3	0.06	7.73
	25	65	60	65	60	55	65	61.7	0.04	6.62
	12.5	55	55	55	50	55	60	55.0	0.03	5.75
	6.25	35	40	40	35	40	40	38.3	0.03	6.74
	3.125	20	20	20	20	20	20	20.0	0.00	0.00
	1.56	0	0	0	0	0	0	0	0.00	-
山东某印染厂 污水处理进水	100	100	100	100	100	100	100	100	0.00	0.00
	50	100	100	100	100	100	100	100	0.00	0.00
	25	90	90	85	90	80	80	85.8	0.05	5.73
	12.5	55	55	60	60	55	55	56.7	0.03	4.56
	6.25	0	0	0	0	0	0	0	0	—
山东某印染厂 污水处理出水	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.00	—
江苏某印染厂 污水处理进水	50	100	100	100	100	100	100	100	0.00	0.00
	25	70	65	70	75	65	70	69.2	0.04	5.44
	12.5	35	40	40	35	40	40	38.3	0.03	6.74
	6.25	20	20	20	20	20	20	20.0	0.00	0.00
	3.125	0	0	0	0	0	0	0.0	0.00	—
江苏某印染厂 污水处理出水	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.00	—
注：“—”表示无法计算，下同										

表 8 实际样品验证结果（48 h EC₅₀ 与 LID）

样品	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
南京桠溪河 地表水	48 h EC ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
南京亚栖镇 地下水	48 h EC 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	48 h EC ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
山东某印染	48 h EC ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100

厂污水处理出水	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
江苏某印染厂污水处理出水	48 h EC ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100
江苏某印染厂污水处理出水	95%置信区间	—	—	—	—	—	—
	LID	1	1	1	1	1	1
江苏某农药厂污水处理出水	48 h EC ₅₀	12.1	12.1	12.1	12.9	13.4	11.7
江苏某农药厂污水处理出水	95%置信区间	8.9~16.5	8.9~16.5	8.8~16.5	9.4~17.6	9.70~18.4	8.60~16.0
	LID	64	64	64	64	64	64
山东某印染厂污水处理进水	48 h EC ₅₀	14.9	14.9	14.4	14.4	14.9	14.4
山东某印染厂污水处理进水	95%置信区间	11.8~18.8	11.7~19	11.4~18.3	11.4~18.1	11.7~19	11.4~18.3
	LID	32	32	32	32	32	32
江苏某印染厂污水处理进水	48 h EC ₅₀	12.9	12.9	12.9	12.5	13.9	13.9
江苏某印染厂污水处理进水	95%置信区间	10.8~15.4	10.8~15.4	10.7~15.5	10.5~14.9	11.4~18.1	11.4~16.9
	LID	16	16	16	16	16	16
注：48 h EC ₅₀ 及 95%置信区间单位为%，LID 无量纲							

根据实际样品验证结果，地表水样品、地下水以及城镇污水处理厂出水、印染厂出水样品（山东某印染厂污水处理出水、江苏某印染厂污水处理出水）中大型蚤活动正常，测试期间未观测到明显的抑制影响，LID 均为 1，48 h EC₅₀ 均大于 100%；江苏某农药厂污水处理出水、江苏某印染厂污水处理进水、山东某印染厂污水处理进水对大型蚤具有活动抑制效应，6 次测试的抑制率相对标准偏差分别为 0.0%~7.73%，0%~6.74%，0%~5.73%；LID 分别为 64、16、32，48 h EC₅₀ 分别为 11.7%~13.4%、12.5%~13.9%、14.4%~14.9%。

6.2 实验室间验证

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验证。工作主要内容是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作业指导书和验证方案，并经专家论证后，联系并分发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（消毒前的沉淀池二级出水）、工业废水（农药厂排放口出水）以及地下水，废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，瓶上注明水样编号，每种废水 2 L，6 ℃ 以下避光运输并在 48 h 运送至比对实验室。各验证实验室进行最低无效应稀释倍数 LID（或 EC₅₀）的测定，以上样品均测定 6 次，分别计算不同验证样品的活动抑制率、标准偏差、相对标准偏差。

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验溶液进行大型蚤急性活动抑制的测定，检验是否符合 24h EC₅₀ 为 0.6~2.1 mg/L、标准稀释水活动抑制率≤10%的质控要求。

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 1.20 mg/L、4.80 mg/L 以及 19.2 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 48 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。

编制组最终将《水质 急性毒性的测定 大型蚤活动抑制法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，得出验证报告，见附件一。

6.2.1 方法验证结果

6.2.1.1 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 1，48 h EC₅₀ 均大于 100%（表 9）。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 10）。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 9 生活污水、地下水以及地表水样品验证结果（LID 与 48 h EC₅₀）

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
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
2	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
3	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
4	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
5	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
6	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

表 10 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），进行大型蚤急性毒性的测定，每个样品测定 6 次。LID 均为 192，48 h EC₅₀ 为 0.98%~1.09%（表 11）。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%，实验室间相对标准偏差为 0%（表 12）。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%（表 13）。

表 11 工业废水样品验证结果（48 h EC₅₀ 与 LID）

实验室	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	48 h EC ₅₀	1.05	1.09	1.01	1.09	1.05	1.09
	95%置信区间	0.96~1.15	1.00~1.19	0.92~1.11	0.99~1.19	0.96~1.15	1.00~1.19
	LID	192	192	192	192	192	192
2	48 h EC ₅₀	1.05	1.05	1.01	1.05	1.05	1.05
	95%置信区间	0.96~1.15	0.92~1.11	0.96~1.15	0.96~1.15	0.96~1.15	0.96~1.15
	LID	192	192	192	192	192	192
3	48 h EC ₅₀	1.01	1.05	1.05	1.05	0.98	1.05
	95%置信区间	0.92~1.11	0.96~1.15	0.96~1.15	0.96~1.15	0.89~1.08	0.96~1.15
	LID	192	192	192	192	192	192
4	48 h EC ₅₀	1.09	1.09	1.05	1.05	1.13	1.09
	95%置信区间	1.00~1.19	0.99~1.19	0.96~1.15	0.96~1.15	1.03~1.23	0.99~1.19
	LID	192	192	192	192	192	192
5	48 h EC ₅₀	1.01	1.01	1.01	1.05	1.01	1.05
	95%置信区间	0.92~1.12	0.92~1.12	0.92~1.12	0.96~1.15	0.92~1.12	0.96~1.15
	LID	192	192	192	192	192	192
6	48 h EC ₅₀	1.05	1.01	1.05	1.09	1.01	1.01
	95%置信区间	0.96~1.15	0.92~1.11	0.96~1.15	1.00~1.19	0.92~1.11	0.92~1.12
	LID	192	192	192	192	192	192

注：48 h EC₅₀ 及 95%置信区间单位为%，LID 无量纲

表 12 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	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
2	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
3	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
4	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
5	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
6	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
$\bar{x}_i$	192								
S'	0.0%								
RSD_i	0.0%								

表 13 工业废水样品精密度验证结果（48h EC₅₀）

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	1.05	1.09	1.01	1.09	1.05	1.09	1.06	0.03	3.07%
2	1.05	1.05	1.01	1.05	1.05	1.05	1.04	0.02	1.57%
3	1.01	1.05	1.05	1.05	0.98	1.05	1.03	0.03	2.90%
4	1.09	1.09	1.05	1.05	1.13	1.09	1.08	0.03	2.78%
5	1.01	1.01	1.01	1.05	1.01	1.05	1.02	0.02	2.02%
6	1.05	1.01	1.05	1.09	1.01	1.01	1.04	0.03	3.15%
$\bar{x}_i$	1.05								
S'	0.02								
RSD_i	2.14%								

6 家实验室对不同浓度重铬酸钾模拟水样（1.20 mg/L、4.80 mg/L、19.2 mg/L）进行了大型蚤急性活动抑制的测定，每个样品测定 6 次。低毒模拟水样（1.20 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 3.36%（表 14）；中毒模拟水样（4.80 mg/L）LID 为 8~12，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 4.19%（表 15）；高毒模拟水样（19.2 mg/L）LID 为 32~48，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 4.38%（表 16）。

表 14 低毒模拟水样精密度验证结果（1.20 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	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
2	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
3	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
4	2	2	2	2	2	3	2.17	0.41	18.8%
5	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
6	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
$\bar{X}_i$	2.03								
S'	0.07								
RSD_i	3.36%								

表 15 中毒模拟水样精密度验证结果（4.80 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			

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	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
2	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
3	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
4	8	8	8	8	12	8	8.67	1.63	18.8%
5	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
6	12	8	8	8	8	8	8.67	1.63	18.8%
$\bar{X}_i$	8.22								
S'	0.34								
RSD_i	4.19%								

表 16 高毒模拟水样精密度验证结果（19.2 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	32	32	32	32	32.0	0.00	0%
2	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0%
3	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0%
4	48	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
5	32	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
6	32	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
$\bar{X}_i$	33.3								
S'	1.46								
RSD_i	4.38%								

6.2.1.2 方法的正确度

6 家实验室对《水质 急性毒性的测定 大型蚤活动抑制法》的正确度进行验证，使用加标模拟水样进行测定，测定 6 次。分别用标准稀释水配制浓度为 1.20 mg/L、4.80 mg/L 和 19.2 mg/L 的重铬酸钾溶液，作为低毒、中毒与高毒模拟水样。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 17～表 19），不同浓度（1.20 mg/L、4.80 mg/L 和 19.2 mg/L）的加标模拟水样，6 家实验室的 LID 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%。

表 17 低毒模拟水样（1.20 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	2	2	2	2	2.03	2.28%±4.47%
2	2	2	2	2	2	2		
3	2	2	2	2	2	2		
4	2	2	2	2	2	3		
5	2	2	2	2	2	2		
6	2	2	2	2	2	2		

表 18 中毒模拟水样（4.80 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	8	8	8	8	8	8.22	3.60%±4.02%

2	8	8	8	8	8	8		
3	8	8	8	8	8	8		
4	8	8	8	8	12	8		
5	8	8	8	8	8	8		
6	12	8	8	8	8	8		

表 19 高毒模拟水样（19.2 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	32	32	32	32	33.3	4.00% $\pm$ 3.76%
2	32	32	32	32	32	32		
3	32	32	32	32	32	32		
4	48	32	32	32	32	32		
5	32	32	32	32	48	32		
6	32	32	32	48	32	32		

6.2.1.3 方法的有效性与敏感性

6 家验证单位对《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》的有效性进行验证，使用标准稀释水阴性对照样品进行测定。所有阴性对照大型溞活动抑制率均为 0%。使用重铬酸钾作为参比物，测试结果见表 20，重铬酸钾 24 h EC₅₀ 均在 0.6~2.1 mg/L 之间，符合质控要求。

表 20 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 EC ₅₀	95%置信限	结论
1	1.09	0.99~1.21	符合 0.6~2.1 mg/L 范围内要求
2	1.17	1.06~1.30	
3	1.13	1.02~1.25	
4	1.13	1.02~1.26	
5	1.17	1.06~1.29	
6	1.06	0.96~1.17	

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 大型溞活动抑制法》，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 斑马鱼法》（992）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 EC₅₀ 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“亲蚤”及“孤雌生殖”。
- (5) 样品采样、保存与预处理：8.1 节补充了样品采集的瞬时水样、混合水样的采样要求。
- (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 0.60 mg/L~2.1 mg/L 以及精密度参数。
- (8) 附录：附录 A 修改为溶液配制的文字描述形式，便于初学者理解。明确附录 B 中的绿藻为普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*) 等，并删除“也可使用酵母等其他食物”。

表 21 函审专家意见及修改情况

章节	专家意见	修改内容
6 试剂和材料	文本中要求“Ca/Mg 比接近 4:1”，如何测定	删除正文中的硬度控制指标及 Ca/Mg 比接近 4:1 的表述。
8 样品采集、保存与预处理	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；
	规范描述：1)“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，宜采集不少于 2 L 的样品。”。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。	修改 8.1：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。
	样品的运输与保存中：①1000ml 容器的材质？②“若存在其他水生动物，可使用筛网（7.2）去除”在什么情况下用哪种筛网？大型蚤是在筛网上还是滤过的是大型蚤？	8.2.1 补充：24h 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：若存在可能捕食幼蚤的其他水生动物，可使用筛网（7.2）去除。（在标准征求意见稿技术审查会上，考虑到可操作性，专家建议整体删除去除其他水生动物的相关描述。）

	文本中“用体视镜或者显微镜观察（7.15），若存在其他水生动物，可使用筛网（7.2）去除”。这一步骤操作性差，建议直接用 250 目筛网过滤	8.2：若存在可能捕食幼蚤的其他水生动物，可使用筛网（7.2）去除。（在标准征求意见稿技术审查会上，考虑到可操作性，专家建议整体删除去除其他水生动物的相关描述。）
	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：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 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害物质，减少生态环境污染，提高水质监测水平和污染治理效果，保障水生态健康安全，推动绿色发展和可持续发展。

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，更新基于大型蚤的水质毒性调查要求，以更好地进行损伤调查和评估。

9 参考文献

- [1] DIN 38412-L11. Methods for the examination of water, waste water and sludge-Test method using water organisms (group L)-Determination of the effect on microcrustacea of substances contained in water (*Daphnia* short-time test) (L 11). Beuth Verlag GmbH, Berlin, 1989.
- [2] ISO 6341:1982, Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 1982.
- [3] Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1010. Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. EPA 712-C-96-114, 1996.
- [4] ISO 6341:2012, Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test[S]. Geneva, Switzerland: ISO,

2012.

- [5] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Procedure 202. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Paris: OECD, 2004.
- [6] GB/T 13266-1991, 水质 物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 1991.
- [7] ASTM D4229-84, Practice for Conducting Static Acute Toxicity Tests on Waste-Waters with *Daphnia*[S]. Philadelphia, PA: ASTM, 1984.
- [8] ASTM E729-2002, Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians[S]. Philadelphia, PA: ASTM, 2002.
- [9] ASTM E1193-2020, Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests[S]. Philadelphia, PA: ASTM, 2020.
- [10] JIS K0229-1992, Testing methods for determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia* by chemicals[S]. Tokyo: JISC, 1992.
- [11] ISO 6341:1989, Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 1989.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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, 2020.
- [19] 修瑞琴, 大型水蚤生物测试技术研究进展. 国外医学(卫生学分册), 1990(06): 335-338.
- [20] Anderson, B.G., The Toxicity Thresholds of Various Substances Found in Industrial Wastes as Determined by the Use of *Daphnia magna*[J]. Sewage works journal, 1944. 16(6): 1156-1165.
- [21] EC Regulation No 440, C2. *Daphnia* Sp. Acute Immobilisation Test. O. J. L142, 2008.
- [22] ISO 6341:1996, Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 1996.
- [23] GB/T 21830-2008, 化学品 蚤类急性活动抑制试验[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.

- [24] GB/T 31270.13-2014, 化学农药环境安全评价试验准则 第 13 部分: 溞类急性活动抑制试验[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2014.
- [25] GB/T 16125-2012, 大型溞急性毒性实验方法[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2012.
- [26] GB/T 21830-2008, 化学品 溞类急性活动抑制试验[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2008.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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 大型蚤急性活动抑制法

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：南京市蒋王庙街 8 号 电话：13951035647

报告编写人及职称：汪贞 高级工程师

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，开展实验室验证工作，主要内容是方法精密度及有效性的验证试验。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六家实验室，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：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出水）、生活污水处理厂出水（采自南京市城东污水处理厂）、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 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 EC_{50} 的测定，分别测定 6 次，并分别计算不同验证样品的 LID 与 EC_{50} 、标准偏差、相对标准偏差。此外，6 家实验室还对不同浓度重铬酸钾模拟样品（1.20 mg/L、4.80 mg/L、19.2 mg/L）进行了大型蚤急性活动抑制的测定，每个样品测定 6 次，并分别计算不同验证样品的 LID、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 均为 192，48 h EC_{50} 为 0.98%~1.09%，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 EC_{50} 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%。低毒模拟样品（1.20 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 3.36%；中毒模拟样品（4.80 mg/L）LID 为 8~12，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 4.19%；高毒模拟样品（19.2 mg/L）LID 为 32~48，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 4.38%。

正确度：编制组分别以标准稀释水配制加标浓度依次为 1.20 mg/L、4.80 mg/L 以及 19.2 mg/L 的重铬酸钾溶液，作为低毒、中毒、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（1.20 mg/L、4.80 mg/L 和 19.2 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 $2.28\% \pm 4.47\%$ 、 $3.60\% \pm 4.02\%$ 、 $4.00\% \pm 3.76\%$ 。

有效性及敏感性的验证：各验证实验室采用参比物重铬酸钾开展大型蚤急性活动抑制试验，检验重铬酸钾急性毒性测试结果符合推荐的 24 h EC_{50} 范围（0.6~2.1 mg/L）。

编制组最终将《水质 急性毒性的测定 大型蚤活动抑制法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，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	中国环境监测总站
杨海荣	部门经理	23	沈阳沈化院测试技术有限公司
宋京洋	助理工程师	5	
祝新茗	助理工程师	5	
马月	助理工程师	5	
梅承芳	正高级工程师	18	中国科学院广东微生物研究所
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
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 DO, 哈希	正常	
恒温水浴	HXC-01, 沈阳空调设备有限公司	正常	中国科学院广东微生物研究所
pH 测试仪	pH3210, 德国 WTW	正常	
溶解氧测试仪	Oxi 3210, 德国 WTW	正常	
人工气候箱	PQX-450B-22H, 宁波莱福	正常	
温湿度记录仪	DSR 系列, 佐格公司	正常	
照度计	T-10A KONICA MINOLTA	正常	浙江省生态环境监测中心
电子天平	MS105DU, 瑞士梅特勒托利多	正常	
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	贵州健安德科技有限公司
便携式多功能参数测试仪	SG98-FK2, LHY376, 梅特勒-托利多	正常	
照度计	T-10A, HFC0081, 柯尼卡美能达株式会社	正常	
人工气候培养箱	ZXSD-B1430, HFC0041, 上海智城分析仪器制造有限公司	正常	江苏省常州环境监测中心
水质参数分析仪	HQ 40d, 哈希	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 $\geq 99.8\%$	中国环境监测总站
重铬酸钾	纯度 $\geq 99.8\%$	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 $\geq 99.8\%$	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，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 受试蚤信息

名称	来源、规格	备注
大型蚤	实验室繁殖、饲养	中国环境监测总站
大型蚤	实验室繁殖、饲养	沈阳沈化院测试技术有限公司
大型蚤	实验室繁殖、饲养	中国科学院广东微生物研究所
大型蚤	实验室繁殖、饲养	浙江省生态环境监测中心
大型蚤	实验室繁殖、饲养	贵州健安德科技有限公司
大型蚤	实验室繁殖、饲养	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 大型蚤活动抑制法》的精密度进行验证，使用生活污水（南京市城东污水处理厂出水）、地表水（江苏高淳桤溪河）以及地下水（江苏高淳桤溪镇深井水）进行测定，每个样品测定 6 次。LID 均为 1，48 h EC₅₀ 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：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 48h EC₅₀）

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
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
2	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
3	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
4	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
5	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC ₅₀	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
6	LID	1	1	1	1	1	1
	48 h EC 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（江苏某农药厂排水），进行大型蚤急性毒性的测定，每个样品测定 6 次。LID 均为 192，48 h EC₅₀ 为 0.98%~1.09%（附表 7）。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%，实验室间相对标准偏差为 0%（附表 8）。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%（附表 9）。

附表 7 工业废水样品验证结果（48 h EC₅₀ 与 LID）

实验室	指标	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	48 h EC ₅₀	1.05	1.09	1.01	1.09	1.05	1.09
	95%置信区间	0.96~1.15	1.00~1.19	0.92~1.11	0.99~1.19	0.96~1.15	1.00~1.19
	LID	192	192	192	192	192	192
2	48 h EC ₅₀	1.05	1.05	1.01	1.05	1.05	1.05
	95%置信区间	0.96~1.15	0.92~1.11	0.96~1.15	0.96~1.15	0.96~1.15	0.96~1.15
	LID	192	192	192	192	192	192
3	48 h EC ₅₀	1.01	1.05	1.05	1.05	0.98	1.05
	95%置信区间	0.92~1.11	0.96~1.15	0.96~1.15	0.96~1.15	0.89~1.08	0.96~1.15
	LID	192	192	192	192	192	192
4	48 h EC ₅₀	1.09	1.09	1.05	1.05	1.13	1.09
	95%置信区间	1.00~1.19	0.99~1.19	0.96~1.15	0.96~1.15	1.03~1.23	0.99~1.19
	LID	192	192	192	192	192	192
5	48 h EC ₅₀	1.01	1.01	1.01	1.05	1.01	1.05
	95%置信区间	0.92~1.12	0.92~1.12	0.92~1.12	0.96~1.15	0.92~1.12	0.96~1.15
	LID	192	192	192	192	192	192
6	48 h EC ₅₀	1.05	1.01	1.05	1.09	1.01	1.01
	95%置信区间	0.96~1.15	0.92~1.11	0.96~1.15	1.00~1.19	0.92~1.11	0.92~1.12
	LID	192	192	192	192	192	192
注：48 h EC ₅₀ 及 95%置信区间单位为%，LID 无量纲							

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	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
2	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
3	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
4	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
5	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
6	192	192	192	192	192	192	192	0.00	0.0%
$\bar{x}_i$	192								
S'	0.0%								
RSD_i	0.0%								

附表 9 工业废水样品精密度验证结果（48h EC_{50} ）

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	1.05	1.09	1.01	1.09	1.05	1.09	1.06	0.03	3.07%
2	1.05	1.05	1.01	1.05	1.05	1.05	1.04	0.02	1.57%
3	1.01	1.05	1.05	1.05	0.98	1.05	1.03	0.03	2.90%
4	1.09	1.09	1.05	1.05	1.13	1.09	1.08	0.03	2.78%
5	1.01	1.01	1.01	1.05	1.01	1.05	1.02	0.02	2.02%
6	1.05	1.01	1.05	1.09	1.01	1.01	1.04	0.03	3.15%
$\bar{x}_i$	1.05								
S'	0.02								
RSD_i	2.14%								

6 家实验室对不同浓度重铬酸钾模拟样品（1.20 mg/L、4.80 mg/L、19.2 mg/L）进行了大型蚤急性活动抑制的测定，每个样品测定 6 次。低毒模拟样品（1.20 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 3.36%（附表 10）；中毒模拟样品（4.80 mg/L）LID 为 8~12，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 4.19%（附表 11）；高毒模拟样品（19.2 mg/L）LID 为 32~48，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 4.38%（附表 12）。

附表 10 低毒模拟样品精密度验证结果（1.20 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	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
2	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
3	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
4	2	2	2	2	2	3	2.17	0.41	18.8%
5	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
6	2	2	2	2	2	2	2.00	0.00	0%
$\bar{X}_i$	2.03								
S'	0.07								
RSD_i	3.36%								

附表 11 中毒模拟样品精密度验证结果（4.80 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	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
2	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
3	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
4	8	8	8	8	12	8	8.67	1.63	18.8%
5	8	8	8	8	8	8	8.00	0.00	0%
6	12	8	8	8	8	8	8.67	1.63	18.8%
$\bar{X}_i$	8.22								
S'	0.34								
RSD_i	4.19%								

附表 12 高毒模拟样品精密度验证结果（19.2 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	32	32	32	32	32.0	0.00	0%
2	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0%
3	32	32	32	32	32	32	32.0	0.00	0%
4	48	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
5	32	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
6	32	32	32	32	32	32	34.7	6.53	18.8%
$\bar{X}_i$	33.3								
S'	1.46								
RSD_i	4.38%								

A.1.3 正确度

6 家实验室对《水质 急性毒性的测定 大型蚤活动抑制法》的正确度进行验证，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 1.20 mg/L、4.80 mg/L 和 19.2 mg/L 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（1.20 mg/L、4.80 mg/L 和 19.2 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 2.28%±4.47%、3.60%±4.02%、4.00%±3.76%。

附表 13 低毒模拟样品（1.20 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	2	2	2	2	2.03	2.28% ± 4.47%
2	2	2	2	2	2	2		
3	2	2	2	2	2	2		
4	2	2	2	2	2	3		
5	2	2	2	2	2	2		
6	2	2	2	2	2	2		

附表 14 中毒模拟样品（4.80 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	8	8	8	8	8	8.22	$3.60\% \pm 4.02\%$
2	8	8	8	8	8	8		
3	8	8	8	8	8	8		
4	8	8	8	8	12	8		
5	8	8	8	8	8	8		
6	12	8	8	8	8	8		

附表 15 高毒模拟样品（19.2 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	32	32	32	32	33.3	$4.00\% \pm 3.76\%$
2	32	32	32	32	32	32		
3	32	32	32	32	32	32		
4	48	32	32	32	32	32		
5	32	32	32	32	48	32		
6	32	32	32	48	32	32		

A.1.4 有效性与敏感性

6 家验证单位对《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》的有效性进行验证，使用标准稀释水阴性对照样品和重铬酸钾参比物进行测定。结果见附表 16 和附表 17，所有阴性对照大型溞活动抑制率均为 0%，重铬酸钾 24 h EC_{50} 均在 0.6~2.1 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

实验室号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	范围	结论
1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	—	符合活动抑制率 $\leq 10\%$ 的要求
2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	—	
3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	—	
4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	—	
5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	—	
6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	—	

附表 17 方法有效性及敏感性验证数据表（参比物：重铬酸钾）

实验室号	24 h EC_{50}	95%置信限	结论
1	1.09	0.99~1.21	符合 0.6~2.1 mg/L 范围内要求
2	1.17	1.06~1.30	
3	1.13	1.02~1.25	
4	1.13	1.02~1.26	
5	1.17	1.06~1.29	
6	1.06	0.96~1.17	

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，进行了大型蚤急性活动抑制的测定，每个样品测定6次。LID均为148 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%。

6家实验室分别对工业废水（江苏某农药厂排水），进行大型蚤急性毒性的测定，每个样品测定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%。

6家实验室对不同浓度重铬酸钾模拟样品（1.20 mg/L、4.80 mg/L、19.2 mg/L）进行了大型蚤急性活动抑制的测定，每个样品测定6次。低毒模拟样品（1.20 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3.36%；中毒模拟样品（4.80 mg/L）LID为8~12，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4.19%；高毒模拟样品（19.2 mg/L）LID为32~48，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4.38%。

A.2.2 正确度

6家实验室对《水质 急性毒性的测定 大型蚤活动抑制法》的正确度进行验证，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1.20 mg/L、4.80 mg/L和19.2 mg/L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17~表19），不同浓度（1.20 mg/L、4.80 mg/L和19.2 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2.28%±4.47%、3.60%±4.02%、4.00%±3.76%。

A.2.3 有效性及敏感性

6家实验室对阴性对照稀释水进行了6次重复测定：新生幼蚤活动抑制率均为0%，满足≤90%的要求。

6家实验室分别对参比物（重铬酸钾）进行了测定：24 h EC₅₀均在0.6~2.1 mg/L范围内，符合质控要求。