

中华人民共和国国家标准

水质 物质对蚤类(大型蚤) 急性毒性测定方法

GB/T 13266—91

Water quality—Determination of the acute toxicity
of substance to *Daphnia* (*Daphnia magna* straus)

本标准参照采用国际标准 ISO 6341—1982《水质——大型蚤运动抑制的测定》。

本标准用大型蚤(*Daphnia magna* straus (Cladocera Crustacea))为试验生物。测定物质或废水的半数抑制浓度,半数致死浓度(24 h-EC 50、24 h-LC 50 或 48 h-EC 50、48 h-LC 50),用于判断物质或废水的毒性程度。

1 适用范围

本标准适用于以下范围:

- a. 在试验条件下可溶的化学物质(包括工业原料和产品、食品添加剂、农药、医药等)。
- b. 工业废水。
- c. 生活污水。
- d. 地表水、地下水。

2 原理

2.1 24 h-EC 50、48 h-EC 50

指在 24 或 48 h 内百分之五十的受试蚤运动受抑制时被测物的浓度。

2.2 运动受抑制(Immobilization)

反复转动试验容器,15 s 之内失去活动能力的大型蚤,被认为运动受抑制。即使其触角仍能活动,也应算做不活动的个体。

2.3 24 h-LC 50、40 h-LC 50

指在 24 或 48 h 内百分之五十的受试蚤死亡时被测物的浓度,以受试蚤心脏停止跳动为其死亡标志。

3 试验材料

3.1 试验生物为大型蚤[(*Daphnia magna* straus)(甲壳纲,枝角亚目)]。

保持良好的培养条件,使大型蚤的繁殖被约束在孤雌生殖的状态下(见附录 A)。

选用实验室条件下培养 3 代以上的、出生 6~24 h 的幼蚤为试验蚤。试验蚤应是同一母体的后代。

3.2 试验用水:

3.2.1 配制人工稀释水为试验用水。新配制的标准稀释水 pH 为 7.8 ± 0.2 ,硬度 250 ± 25 mg/L(以 CaCO_3 计)Ca/Mg 比例接近 4:1,溶解氧浓度在空气饱和值的 80%以上,并不含有任何对大型蚤有毒的物质。

人工稀释水用电导率 $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ ($1 \text{ mS}/\text{m}$)以下的蒸馏水或去离子水(以下简称水)按下述方法配

制。

a. 氯化钙溶液

将 11.76 g 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于水中稀释至 1 L。

b. 硫酸镁溶液

将 4.93 g 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)溶于水中稀释至 1 L。

c. 碳酸氢钠溶液

将 2.59 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶于水中稀释至 1 L。

d. 氯化钾溶液

将 0.25g 氯化钾(KCl)溶于水中稀释至 1 L。

各取以上四种溶液 25 mL 混合,稀释至 1 L。必要时可用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节 pH 值,使其稳定在 7.8 ± 0.2 。标准稀释水应容许大型蚤在其中生存至少 48 h,并尽可能检查稀释水中不含有任何已知的对大型蚤有毒的物质。例如:氯、重金属、农药、氨或多氯联苯。

3.2.2 如果所进行的试验需要使用其他稀释水或改变稀释水的 pH,应在试验报告中注明所用稀释水的性质。要求稀释水的硬度在 150~300 mg/L(以 CaCO_3 计)范围内,Ca/Mg 比例接近 4:1。pH 不得低于 6.5 或不得高于 8.5,同一试验 pH 波动不得大于 0.5。

3.3 重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$),分析纯。

4 试验液的制备

4.1 试验物质溶液的配制

4.1.1 试验物质可以是可溶于水的固体、液体或气体,但要求组分一定,具有代表性、重复性。

4.1.2 易溶于水的试验物质可直接加到稀释水里,也可以溶解在蒸馏水或去离子水中配成贮备液加入到稀释水中配成试验液,每升稀释水中的贮备液要少于 10 mL。贮备液应当低温保存。

4.1.3 难溶于水的物质,可用适当的方法,将其溶解和分散。包括使用超声波装置及其他低毒溶剂增溶。如果使用溶剂,溶剂在试验液中的浓度不应超过 0.5 mg/L,并应在试验的同时设两个对照组,一组用稀释水,另一组用最大浓度的溶剂。

4.2 工业废水试验液的制备

4.2.1 样品的采集及处理:采集废水样品时,应将采样瓶充满水样,不留空气。样品采集后应立即进行试验。如果样品采集后 6 h 之内不能进行试验,则必需将水样冷冻保存($0 \sim 4^\circ\text{C}$),并应尽可能缩短水样在试验前保存的时间。

4.2.2 生产流程用水不稳定的工业废水,应在 24 h 之内,每隔 6 h 瞬时采样一次,分别测定每个样品,求得其最大毒性。

4.2.3 废水样品可以用稀释水稀释配成不同浓度的试验液。

5 试验容器和仪器

5.1 试验容器可采用 100 mL 小烧杯或结晶皿等玻璃制品,加盖表面皿。为防止玻璃容器对试验物质的吸附,试验前可用低浓度试验溶液浸泡一天。试验结束后立即倒空容器,刷洗、消除任何微量的试验液。

5.2 量筒、容量瓶、移液管、吸管、玻璃缸、尼龙筛网等器皿。

5.3 溶解氧测定仪、pH 计、温度计、电导仪。

6 环境条件

6.1 试验温度要求基本稳定,变化不超过 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。试验前的培养温度要求与试验温度基本一致。毒性试验在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 或 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下进行。

- 6.2 实验在没有对大型蚤有害的气体、粉尘的大气条件下进行。
- 6.3 试验在自然光照或相当于自然光照下进行(避免阳光直射)每天光照 10 h 左右。
- 6.4 大型蚤在试验前应与其试验条件一致的环境中驯养 7~10 d。
- 6.5 试验操作及试验过程中蚤类不能离开水,转移时要用玻璃滴管。

7 预试验

- 7.1 正式试验之前,为确定试验浓度范围,必须先进行预备试验。预备试验浓度间距可宽一些(如 0.1、1、10)每个浓度至少放 5 个幼蚤,通过预试验找出被测物使 100% 大型蚤运动受抑制的浓度和最大耐受浓度的范围,然后在此范围内设计出正式试验各组的浓度。
- 7.2 预试验中应了解毒物的稳定性,在标准稀释水中是否会出现沉淀、pH 等理化性质的改变。以便确定正式试验是否需要采取流水或更换试验液及改变稀释水 pH 等措施。

8 正式试验

- 8.1 试验浓度的设计,根据预试验的结果确定正式试验的浓度范围,按几何级数的浓度系列(等比级数间距)设计 5~7 个浓度(如 1、2、4、8、16 等比级系数为 2;又如 1、1.8、3.2、5.6、10 等比级数系数为 1.778)。试验浓度要设计合理,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。
- 8.2 试验用 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。一组试验液设一空白对照,内装相等体积的稀释水。试验前要用化学方法测定试验液的初始浓度。
- 8.3 试验开始后应于 1、2、4、8、16 及 24 h 定期进行观察,记录每个容器中仍能活动的水蚤数,测定 0~100% 大型蚤不活动或死亡的浓度范围,并记录它们任何不正常的行为。在计算试验蚤的不活动或死亡的百分数之后,立即测定试验液的溶解氧浓度。
- 8.4 检查大型蚤的敏感性及其试验操作步骤的统一性,定期测定重铬酸钾的 24 h- EC_{50} ,目的是验证大型蚤的敏感性。在试验报告中报告 24 h- EC_{50} 。重铬酸钾的 24 h- EC_{50} 为 0.5~1.2 ppm(20℃ 条件下)。

按照第 8 章所叙述的步骤进行验证检查,如果重铬酸钾的 24 h- EC_{50} 在 0.5~1.2 ppm 以外,则应检查使用试验步骤是否严格,并检查大型蚤的培养方式。如有必要,使用新的符合敏感要求的大型蚤品种。

9 数据结果的处理及有效性

9.1 $EC_{50}(LC_{50})$ 的估算

试验结束,计算每个浓度中不活动的大型蚤或死亡蚤占试验总数的百分比,用概率单位目测法,计算 EC_{50} (或 LC_{50}) (见附录 C)。也可用计算机 EC_{50} (或 LC_{50}) 程序处理(寇氏修正法),获得 EC_{50} (或 LC_{50})。

9.2 结果的表示

以 24 h- EC_{50} 或 48 h- EC_{50} 表示物质在相应时间内对大型蚤运动受抑制的影响。以 24 h- LC_{50} 或 48 h- LC_{50} 表示物质在相应时间内对大型蚤生存的影响。当浓度间距过近仍不能获得足够数据时,可采用使 100% 大型蚤活动受抑制或心脏停止跳动的最低浓度和使 0% 大型蚤活动受抑制或心脏停止跳动的最高浓度来表示毒性影响的结果。

检测排水时,以百分数或毫升/升表示。

检测化学物质时,以毫克/升表示。

9.3 试验结果的有效性

符合下列条件的试验为结果有效。

- a. 对照组试验未出现不活动大型蚤。
- b. 重铬酸钾的 24 h-*EC*50 在 20℃时为 0.5~1.2 ppm 的范围内。
- c. 试验结束时溶解氧浓度必须大于或等于 2 mg/L。
- d. 必须经检测证明被测定的试验物质浓度保持于试验全过程(至少应为计划配制浓度的 80%)。

如果浓度偏差>20%，应以测试浓度结果为准。

10 试验报告

试验报告要求包括以下几个方面：

- a. 实验蚤的种名、来源、数目、蚤龄、饵料、驯养时间，对照组是否发生死亡。
- b. 被测物质的化学性质、来源、样品的保存方法、保存时间及前处理方法。
- c. 实验用稀释水的性质。
- d. 试验环境、水温、pH、DO、电导等情况。
- e. 试验条件下大型蚤的任何不正常行为，包括中毒症状。
- f. 实验结果、数据处理、结论、讨论。
- g. 方法依据及参考文献。

附录 A
大型蚤的培养繁殖方法
(补充件)

A1 试验蚤的选育

试验蚤(*Daphnia magna*)可以从其他试验室已有的纯培养中挑取、引种,也可以从野外采集。野外采集的蚤要经分离、纯化,在显微镜下鉴定后,选择体大、健康的母体数个,用 50 mL 小烧杯单个培养。选择繁殖量最大的一代为母蚤,单克隆化,使之成为纯品系。

A2 饵料

雌性的大型蚤可以在 20℃ 生存 4 个月之久。蚤类喜食藻类、细菌、酵母及有机物碎屑等。藻类的营养价值高于其他食物,本方法推荐用实验室培养的栅藻为大型蚤的饵料。栅藻的培养方法见附录 B。

A3 容器

单个培养母蚤可用 50 mL 小烧杯,繁殖培养用 2 000 mL 大烧杯,储备培养用 30 cm×30 cm 圆玻璃缸,或类似大小的水族箱。

A4 喂养

用不含无机培养剂的栅藻扩大培养液喂养大型蚤。可以采用每周 3 次全部更换水蚤培养液的办法,也可以每天追加一次浓缩悬浮藻液。培养液中栅藻的浓度不宜过高,一般在 10^6 个/L 左右,藻液的颜色以淡苹果绿色为宜。否则晚间缺氧会引起大型蚤的死亡。

A5 培养条件

氧气对大型蚤生存不利,培养用水可选用经自然曝气三天以上的自来水或人工配制的稀释水,大型蚤生存的适宜温度为 $17\pm 25^\circ\text{C}$,适宜的 pH 为 6.5~8.5。大型蚤的密度以每升水中培养 50 个左右母蚤为宜。过分拥挤,会造成大型蚤停止孤雌生殖。大型蚤对氧有较强的适应能力,培养液中可保持 2mg/L 以上的溶解氧。

A6 实验蚤的分离

大型蚤的生长是间歇性的、生长与脱壳交替进行。每脱壳一次,增加一龄,前后脱壳的时间叫龄期。性成熟前的龄期为幼龄蚤,性成熟后的为成龄蚤。大型蚤有 4~6 个幼龄期,幼龄蚤比成龄蚤对毒物更敏感。运动受抑制试验一般选用实验室条件下培养 3 代以上的、出生 6~24 h 的幼蚤,最好为同一母体后代。

采用下述方法可以获得出生后 6~24 h 的幼蚤。试验前从实验室储备缸中挑取 20~30 个怀卵母蚤,放在一个 2 000 mL 烧杯中单独培养。18 h 后取走母蚤,幼蚤仍在原繁殖缸中培养,24 h 时,此繁殖缸中的幼蚤即为出生 6~24 h 的幼蚤。

为保证大型蚤的良好繁殖,采用下述方法分离母蚤。用孔径 1 000 μm 尼龙网缝制成一个杯形的网袋(略小于繁殖缸)套在繁殖缸内壁,将母蚤放入网内,定期提出装有母蚤的尼龙网。放入另一个盛有斜生栅藻培养液的培养缸中。也可采用使繁殖缸的液体通过上、下套合在一起的两个筛网的方法获取试验蚤。上层筛网的孔径为 800~1 000 μm ,下层筛网的孔径为 450~500 μm 。母蚤被阻止在上层粗网上,幼蚤被阻止在下层细网上。用新鲜斜生栅藻扩大培养液,将滤得的水蚤分别冲入繁殖缸内。试验期间每天

分离一次,注明幼蚤的出生日期,便得到出生不同时间的幼蚤。定期淘汰老母蚤。

附录 B

斜生栅藻的培养技术

(补充件)

斜生栅藻具有较丰富的营养价值。实验室实践证明,用斜生栅藻喂养大型蚤,蚤的生长快,个体大,繁殖量高。保持实验室内斜生栅藻的良好生长是养好大型蚤的关键。

B1 培养基

实验室要经常保持一定数量的斜生栅藻藻种,可采用各种适用的培养剂,本方法推荐用水生4号培养剂。

培养基成分(配1 000 mL)如下:

硫酸铵($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0.200 g
过磷酸钙($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot (\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$)饱和液	1 mL
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.080 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	0.100 g
氯化钾(KCl)	0.025 g
氯化铁(FeCl_3)1%(m/m)	0.15 mL
土壤浸出液	0.500 mL

B2 藻种的培养

斜生栅藻可在摇床上振动培养,也可在流动通气条件下连续培养,最简单的培养方法是用水生4号培养液,装300~400 mL培养液,或者用3 000 mL三角瓶装1 000 mL培养液,接种藻种使成淡绿色。瓶口加松软棉团以防污染,温度在15~25℃,光照在3 000~4 000 lx连续静止培养。可采用40 W日光灯人工光照,灯源距离约2 m,也可用自然光照,避免阳光直射,日光照6~10 h。每天摇动5~6次,经几天培养后藻液变为深绿色。培养好的藻液可做为扩大培养用,也可经离心浓缩,或自然沉淀浓缩制成浓缩液,贮于冰箱备用。藻种培养当中要经常镜检,检查是否有杂藻、纤毛虫和轮虫。藻种要经常转接,以防止老化。转接的时间视藻种生长的情况而定,一般每周1~2次,藻液发深绿色即要转接。老化藻在显微镜下可明显见到聚集成团的藻群、色素变黄,摇动振荡后,仍出现大量沉淀。

B3 斜生栅藻的扩大培养

为获得培养大型蚤的足够饵料,可在实验室内进行斜生栅藻的扩大培养。扩大培养采用30 cm×30 cm的圆玻璃缸,或类似大小的水族箱。在玻璃缸中加入培养好的栅藻液(B2),用经自然曝气的自来水稀释成淡绿色。扩大培养中不加任何营养盐。可放置10~20条斑马鱼(其他不食斜生栅藻的鱼也可),每天照旧投鱼饵。鱼可以起搅拌作用。其排泄物也有利于栅藻的生长。扩大培养的栅藻液可直接喂大型蚤。

附录 C

废水或一种物质(储备液浓度为 1 000 mg/L)对大型
蚤(*Daphnia magna*)运动受抑制测定实例
(补充件)

C1 预试验结果(每个浓度 5 个大型蚤)(24 h)

表 C1

浓 度, %	活动的大型蚤数目
3.5	0
1	0
0.35	5
0.1	5

正式试验的浓度范围为 0.35%~1%。

C2 正式试验

C2.1 试验结果

24 h 的试验结果如表 C2。

表 C2

浓 度		24 h 活动的 大型蚤个数	不活动大型蚤	
百分浓度	浓度对数值		百分比	概率值
0	-1	30	0	
0.35	-0.45	25	16	4.0
0.46	-0.33	18	40	4.75
0.60	-0.22	10	67	5.43
0.77	-0.11	6	80	5.84
1.0	0	2	93	6.47

C2.2 计算 24 h-EC50

采用概率单位图解法(见图 C1), 24 h-EC50 是 0.55%, 对排放废水, 这可表示为: 24 h-EC50 = 0.55% 或 5.5 mg/L。对储备液浓度为 1 000 mg/L 的化学物质, 此结果可表示为:

$$24 \text{ h-EC}50 = 0.55 \times 1\,000 = 5.5 \text{ mg/L}$$

概率单位图解法的计算程序如下:

a. 将浓度换算成浓度对数值, 作为横坐标; 不活动蚤百分数换成概率值作为纵坐标, 在算术坐标纸上绘图。(若用对数-概率纸可不必进行上述换算, 直接作图), 由于概率单位尺度达不到 0 和 100, 作图时, 若是需要这样的数值, 可以使用箭头表示这些点的真正位置。

b. 顺着各点的分布趋势, 用直尺作出一条最接近各点的直线。作直线时应多照顾靠近概率单位为“5”处的各点。

c. 从纵轴概率单位为“5”处, 引一水平线与直线相交, 再从交点作垂线与横轴相交, 即可读出 EC50 的对数值, 此值的反对数即是用目测法求得的 EC50 值 LC50 的计算方法相同。

C2.3 计算机计算 EC50(或 LC50) 及 95% 置信限

程序采用 BASIC 语言, 将寇式修正法公式输入 PB-700 型便携式计算机或其他类型计算机进行操

作。

C2.3.1 寇式修正法公式：

$$\lg LD_{50} = Xk - d(\sum P_i - 0.5) \dots\dots\dots (C1)$$

式中：Xk —— 最大对数剂量；

d —— 相邻两组对数剂量之差数；

P_i —— 各组死亡率；

i —— 组号。

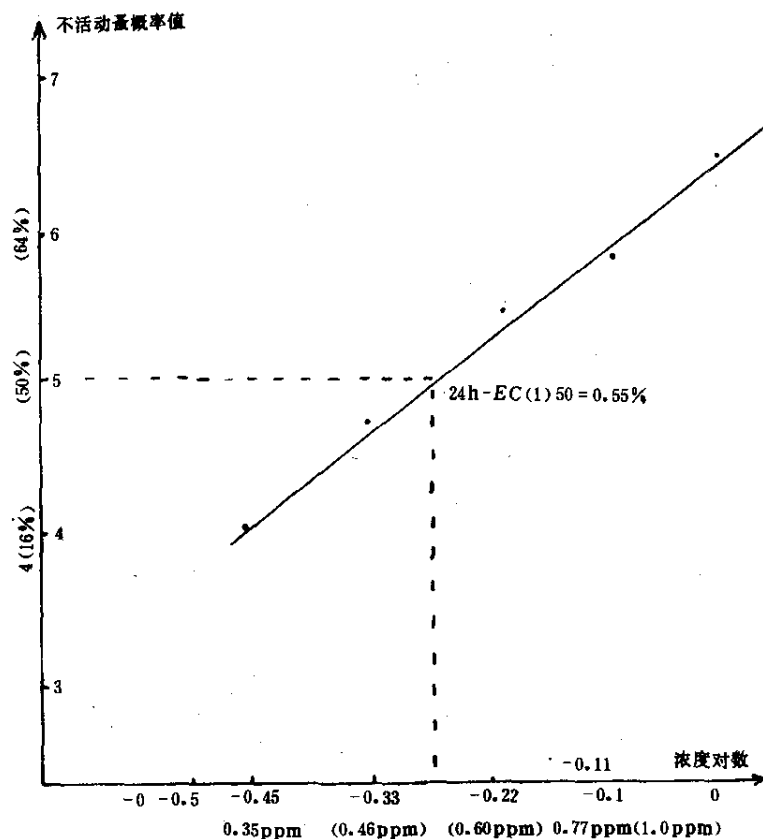


图 C1

附加说明：

本标准由国家环境保护局科技标准司提出。

本标准由北京市环境监测中心、北京市环境保护研究所负责起草。

本标准主要起草人谢凤君、乔佩文、向琍云、邹文梅。

本标准由国家环境保护局负责解释。