



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ□□□-201□

水质 用单细胞绿藻进行淡水藻类生长 抑制性试验

**Water quality-Freshwater algal growth inhibition test
with unicellular green algae**

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

环 境 保 护 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 试剂和材料..... | 2 |
| 6 仪器和设备..... | 3 |
| 7 分析步骤..... | 3 |
| 8 质量保证和质量控制..... | 5 |
| 9 结果计算与表示..... | 5 |
| 10 精密度..... | 7 |
| 11 试验报告..... | 7 |
| 附录 A（资料性附录）本标准章条编号与 BS EN ISO 8692:2004 章条编号对照..... | 9 |
| 附录 B（资料性附录）本标准与 BS EN ISO 8692:2004 的技术性差异及其原因..... | 10 |
| 附录 C（规范性附录）废水中绿藻生长抑制试验的快速筛选方法..... | 11 |

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，规范水中生物类监测分析方法，制定本标准。

本标准规定了测定水或废水中含有的物质和混合物对单细胞绿藻生长抑制的试验方法。

本标准的技术内容为等同采用《水质—用单细胞绿藻进行淡水藻类生长抑制性试验》（BS EN ISO 8692:2004）。附录A给出了本标准章条编号与BS EN ISO 8692:2004章条编号的对照一览表，附录B给出了本标准与BS EN ISO 8692:2004的技术性差异及其原因。

本标准为首次发布。

附录A和附录B为资料性附录，附录C为规范性附录。

本标准由环境保护部科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：广东出入境检验检疫局、环境保护部化学品登记中心。

本标准环境保护部 201□年□□月□□日批准。

本标准自 201□年□□月□□日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 用单细胞绿藻进行淡水藻类生长抑制性试验

1 适用范围

本标准规定了测定水或废水中含有的物质和混合物对单细胞绿藻生长抑制的试验方法。

本标准适用于易溶于水的物质进行单细胞绿藻生长抑制试验。本标准参照 ISO 14442 和 ISO 5667-16 进行修改后,也可适用于难溶解的有机物和无机物、挥发性化合物、重金属进行单细胞绿藻生长抑制试验。

附录 A 给出了废水中绿藻生长抑制试验的快速筛选方法。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件中的条款。

ISO 5667-16:1998 水 采样 样品生物试验指南 (Water-Sampling-Part 16:Guidance on biotesting of samples)

ISO 14442:1999 水质 用难溶性物质、挥发性化合物、金属和废水进行藻类生长抑制试验指南 (Water quality-Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials ,volatile compounds ,metals and waste water)

BS EN ISO 8692:2004 Water quality Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae (水质 用单细胞绿藻进行淡水藻类生长抑制性试验)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

细胞浓度 cell density

指每单位容积培养基中的细胞数量,通常用每毫升中的细胞数表示浓度,以 x 表示。

3.2

比生长率 specific growth rate

指单位时间内细胞浓度的增长比率,以 μ 表示。计算公式为: $\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$ 。

式中:

μ ——比生长率, d^{-1} ;

x ——细胞浓度,细胞数/ml;

t ——时间,用 d 表示。

3.3

生长培养基 growth medium

混合水 (5.2) 和营养物质组成的培养基,绿藻细胞在其中培养生长,主要用于前期培养和空白对照。

3.4

测试样品 test sample

指水溶性样品 (如废水)、化学物质或混合物,用于测定其对海藻的生长抑制作用。

3.5

测试培养基 test medium

由水、营养物质和测试样品混合组成。

3.6

测试组 test batch

指由水、营养物质和测试样品组成的测试培养基（3.5）与海藻一起培养。

3.7

对照 control

指不含测试样品，由水和营养物质组成的生长培养基（3.3）与绿藻一起培养。

3.8

效应浓度 effective concentration

相对于对照，引起绿藻细胞比生长率降低 x%时的测试样品浓度。建议用符号“ErCx”表示。

4 方法原理

测试样品中含有的化学物质或混合物浓度不同，会对藻类生长产生不同程度的抑制效应。接种处于对数生长期的单细胞绿藻细胞，绿藻细胞在含有一定浓度测试样品的培养基（该培养基由混合适当量的生长培养基和测试样品组成）中培养生长几个世代。培养 72h，至少每隔 24h 测一次每个测试组中的细胞浓度。在相同的培养条件下，测试组相对于对照组细胞生长率的降低来表示海藻细胞生长抑制作用。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯化学试剂，

5.1 试验生物：可使用以下任意一种浮游的淡水海藻物种，在海藻酸微胶囊中可保存几个月，并且很容易从中释放出来用于进行毒性试验。

5.1.1 近具刺链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*(86.81 SAG))

5.1.2 羊角月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*(Korshikov)Hindak(ATCC 22662,CCAP 278/4 或 61.81 SAG))

注 1：这两种浮游海藻属于绿球藻目（绿藻门，绿藻纲），通常是单细胞培养。

注 2：可以按照 5.3 和 7.1 中的培养基进行贮存培养。然而需要经常进行传代培养（每周一次）以防止生长失败。贮存培养物在丰富的藻类培养基中能延长保存时间。

5.2 水：去离子水或同等纯度的水（电导率 $<10\mu\text{S}/\text{cm}$ ），用于制备生长培养基和溶解试验物质。

在配制和贮存过程中需要避免被无机或有机物质污染，而且不能使用铜制设备。

5.3 营养物

按照表 1 配制四种溶于水的营养物贮备液。加以稀释可配制测试溶液中的最终营养物浓度（见 7.1 和 7.4），也可将常量营养物质直接加入水中获得。

用 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜过滤贮备液除菌，或使用高温高压灭菌（ 120°C ，15min）。该贮备液应于黑暗 4°C 下保存。

表 1 测试溶液中的营养物质质量浓度

| 贮备液 | 营养成分 | 贮备液质量浓度 | 测试溶液中的最终营养物质质量浓度 |
|---------------------------|---|----------|------------------|
| 贮备液 1: 常量元素- 营养物 | NH ₄ Cl | 1.5g/L | 15mg/L |
| | MgCl ₂ ·6H ₂ O | 1.2g/L | 12mg/L |
| | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1.8g/L | 18mg/L |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1.5g/L | 15mg/L |
| | KH ₂ PO ₄ | 0.16g/L | 1.6mg/L |
| 贮备液 2: Fe-EDTA | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 64mg/L | 64μg/L |
| | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 100mg/L | 100μg/L |
| 贮备液 3: 微量元素 | H ₃ BO ₃ ^a | 185mg/L | 185μg/L |
| | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 415mg/L | 415μg/L |
| | ZnCl ₂ | 3mg/L | 3μg/L |
| | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 1.5mg/L | 1.5μg/L |
| | CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0.01mg/L | 0.01μg/L |
| | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 7mg/L | 7μg/L |
| 贮备液 4: NaHCO ₃ | NaHCO ₃ | 50g/L | 50mg/L |

注 a: 加入 0.1mol/L 的 NaOH 可以溶解 H₃BO₃。

注 3: 为了防止 NaHCO₃ 的挥发损失, 贮备液 4 不要进行高温高压灭菌, 但可以通过膜过滤除菌。

6 仪器和设备

所有接触测试培养基的设备均应由玻璃材质或其他化学惰性物质制成。

6.1 温控箱或温控室: 具持续均衡照明的白色荧光灯。

6.2 绿藻细胞浓度测量仪: 最好是粒子计数器, 或显微镜和计数板。测量细胞浓度最低可达 10⁴ 细胞/ml, 能识别细胞生长和干扰因素 (如存在颗粒物和色度)。分光光度仪具有足够的灵敏度和足够长的光程长度 (最高可达 10cm), 可以测量 10⁴ 细胞/ml。然而, 当细胞浓度较低时, 悬浮物质和色度会对测定产生干扰。

注: 如果荧光计足够灵敏度且荧光值与细胞浓度具有很好的相关性时, 绿藻细胞浓度也可以使用荧光计 (例如体外用荧光测定或体内用二氯苯二甲脒 (DCMU) 标记后再用荧光测定) 作为一种间接的方法进行测量。

6.3 培养瓶: 具透气瓶塞的 250ml 锥形瓶。

6.4 膜过滤器: 孔径为 0.2μm 滤膜。

6.5 高压灭菌锅。

6.6 pH 计。

6.7 一般实验室常用仪器和设备。

7 分析步骤

7.1 生长培养基的制备

在约 500ml 水中加入 10ml 的贮备液 1 (5.3)、1ml 的贮备液 2 (5.3)、1ml 的贮备液 3

(5.3)、1ml 的贮备液 4 (5.3)，然后用水定容至 1000ml，混匀。

该生长培养基用碳酸氢盐和充气 CO₂ 进行缓冲。参照 ISO 14442 的规定，通过改变 HCO₃ 和/或充气 CO₂ 的浓度（要求密闭容器）得到不同的 pH 值。在不同的 pH 值条件下进行测试，应记录 pH 值的更改及更改依据。

注 1：如果生长培养基需要进行高温高压灭菌，那么应在灭菌后加入贮备液 4 (5.3)。

注 2：生长培养基应在使用前接触空气过夜平衡，或通入过滤空气鼓气 30min。达到平衡后，必要时，用 1mol/L 盐酸溶液或 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.1±0.2。

7.2 预培养和接种藻细胞

在正式测试开始前 2~4d 进行预培养试验。为了在正式测试时得到处于指数生长期的藻细胞，生长培养基 (7.1) 应接种较低细胞浓度（如 5×10³ 细胞/ml~10⁴ 细胞/ml 经过 3d 的预培养）。预培养应按照与 7.6 步骤相同条件下进行。

处于指数生长期的预培养藻细胞作为测试时的接种源。为了计算所需要的接种量，在接种前应立即测量预培养的藻细胞浓度。

7.3 测试样品浓度的选择

绿藻细胞应当暴露于比率不超过 3.2 的不同测试样品浓度系列中（如 1.0mg/L、1.8mg/L、3.2mg/L、5.6mg/L、10mg/L）。测试样品浓度应选择能够至少获得一个低于 E_rC_x 的抑制浓度和一个高于 E_rC_x 的抑制浓度。另外，为了回归分析数据，测试样品浓度应至少包含两个处于 10%和 90%之间的抑制水平。

仅用一个浓度水平来证明没有毒性的限度试验，应在限度浓度水平至少重复测定 6 次。

注：通过浓度范围预试验来确定合适的浓度范围，其预试验应覆盖几个数量级的测试浓度。在预试验中不用重复测定。

7.4 测试样品和贮备液的准备

根据样品性质和测试目的，如果测试样品是水溶液（如废水），应考虑进行前处理（如过滤或离心），在样品中加入营养贮备液 (5.3)，见 7.1。对于非水溶液测试样品，通常需要准备贮备液。基于测试样品的属性，仔细选择贮备液的配制方法。贮备液的准备通常是将测试样品溶于生长培养基中。当测试样品不易溶于培养基中时，应进行相应的调整，详见 ISO 14442 和 ISO 5667-16。

一般情况下，在加入测试样品后，试验中不用调节培养基的 pH 值。但是对于一些物质可能由于强酸或强碱性而表现出毒性作用。为了测定样品的毒性不受 pH 值影响，可以使用 1mol/L 盐酸溶液或 1mol/L 氢氧化钠溶液（见 ISO 5667-16）调节水溶液样品或贮备液（在系列稀释前）加入到培养基后的 pH 值。

7.5 测试准备和对照组

准备测试和对照组：混合适当体积的测试样品或测试样品贮备液于生长培养基中，接种 (7.2) 于培养瓶中。在所有培养瓶中的总体积、加入的生长培养基营养物质和细胞浓度均应相同。

为了在对照培养中能进行指数生长，初始的细胞浓度不能超过 10⁴ 细胞/ml，而且其 pH 值变化不超过 1.5 个单位（参见 8）。

每个测试样品浓度至少要重复测定 3 次。仅加入培养基和接种绿藻细胞而不加测试样品

的测试瓶，作为对照组并重复测定 6 次。必要时，准备仅加入某一浓度的一系列测试样品的培养瓶，不接种绿藻细胞作为细胞测定时的本底。

如果增加测试样品浓度数量和减少浓度区间，基于统计学考虑（见 ISO/TS 20281），可以减少每个浓度的重复测试次数。

同时，测量每个对照组和测试组的 pH 值。

7.6 培养

测试瓶应盖好，避免空气污染和降低水分蒸发。但不能完全密封，要保证 CO₂ 进入瓶中（可以开一个小孔）。在 23℃±2℃ 和持续光照条件下进行培养。使用合适的接收器，当光合作用测定波长范围为 400nm~700nm，测试培养基光强度的平均水平应在 60μmol/m²·s~120μmol/m²·s 之间，其变化要求保持在±10%范围内。

测量方法，尤其是接收器（收集器）类型会影响测量结果。球形接收器（从测量平面上方和下方的各个角度对光进行响应）和弧形接收器（从测量平面上方的各个角度对光进行响应）都属于单向性接收器，较为合适。这些接收器对注释中提到的多点类型光源提供了更高的读数。

注：上述描述的光强度可通过 4 个到 6 个通用白色（自然色）荧光灯获得（例如：标准色彩 2 的色彩等级，4300K 的色彩温度）。荧光灯距培养基的最佳距离大约是 0.35m。

对于灯光测量仪器用 lux 单位，对测试而言等同范围 6000lux 到 10000lux 都是可行的。

ISO 14442 中描述了有颜色的测试溶液进行特殊校正。

为了保持细胞处于悬浮状态、使 CO₂ 进入水中和防止 pH 的降低，培养过程中应不停地摇晃、振荡培养瓶或进行曝气。

7.7 测量

至少每 24h 测量一次每个测试瓶（包括对照组）中的绿藻细胞浓度。测量时从培养瓶中移出的部分最好不要放回原培养瓶。

初始绿藻细胞浓度可以作为最初的细胞浓度，因此，不必测量最初的绿藻细胞浓度。试验应至少持续 72h±2h。

试验结束后，测量每个样品培养瓶（7.5）和对照培养瓶（7.5）中的 pH 值，并用显微镜确认绿藻细胞的外观和试验生物的特性。

8 质量保证和质量控制

如果未出现下述情况，可认为试验无效。

8.1 对照绿藻细胞平均生长率最少为 1.4d⁻¹。该生长率指在 72h 内绿藻细胞浓度的增加量。

8.2 对照生长率的变异系数不超过 5%。

8.3 测试期间 pH 的增加会显著影响试验的结果，对照培养基 pH 值的增量与生长培养基的 pH 值增量相比，应不超过 1.5 个单位。

试验中 pH 的增加可以显著影响试验的结果，因此，设置了 1.5 个单位的限量。pH 的变化应该在试验结束时保持在尽可能低的水平，比如，可在试验中不停摇动。如果达不到上述控制指标，应核实试验方法，必要时从通过其他方法获取所用的绿藻细胞接种源。

9 结果计算与表示

9.1 绘制生长曲线

根据试验测试样品培养基中绿藻细胞浓度或与细胞浓度有关参数和测量时间绘制图表。

绘制每个试验浓度和对照的生长曲线，以细胞浓度对数和试验时间画坐标图。线性生长曲线表明处于对数生长期，而平稳曲线表明细胞生长进入稳定期。

在暴露期末期，如果对照培养显示生长率下降，测试样品抑制绿藻细胞培养的生长率可能与对照培养保持一致，则错误地表明测试样品生长抑制作用降低。在这种情况下，应根据对照细胞对数生长期内的最后一次测量结果计算生长率和生长抑制作用。

9.2 计算抑制百分率

每一组试验的平均比生长率 μ ，按照公式（1）进行计算。

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0} \quad (1)$$

式中：

t_0 —— 试验开始时的时间；

t_L —— 试验结束时的时间（或对照细胞对数生长期内的最后一次测量时的时间（9.1））；

x_0 —— 最初接种的细胞浓度；

x_L —— 在测量时间 t_L 时测量的细胞浓度。

平均生长率也可以从细胞浓度对数和时间的回归曲线斜率中获得。

分别计算每批次试验样品和重复对照的 $\bar{\mu}$ 。每一批次测试样品的抑制率，按照公式（2）进行计算。

$$I_{\mu_i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100 \quad (2)$$

式中：

I_{μ_i} —— 测试浓度 i 的抑制率（生长率）；

μ_i —— 测试浓度 i 的平均生长率；

μ_c —— 对照试验的平均生长率。

9.3 测定 $E_r C_x$ (如 $E_r C_{10}$ 和 $E_r C_{50}$)

用在每个测试浓度下的抑制率和测试浓度在对数刻度上作图和表。如果数据点的分散过大，用重复测定的标准偏差绘图。

用合适的非线性模型对试验数据进行拟合回归分析（示例参见 ISO/TS 20281 的参考文献[9]和[10]），测定 $E_r C_x$ 值和置信区间。

作回归分析时，如果数据太少或者数据不确定，或者抑制率与相应浓度呈现不规则浓度关系（比如拐点），那么需要用到作图法。在这种情况下，绘制一条肉眼感觉平滑的剂量-效应曲线，从此图中读出 $E_r C_x$ 值。如果测试物质浓度中观察到特别离群的数据，应考虑使用毒物刺激作用模型。

9.4 结果表示

可用 $E_r C_{10}$ 和 $E_r C_{50}$ 表示生长率的 EC_{10} 和 EC_{50} 值。也可以用测试时间如 ErC_{50} (0-72h) 来明确表示。通常用 mg/L 或 ml/L 和置信区间注明 $E_r C_{10}$ 和 $E_r C_{50}$ 。

测试废水要依据稀释因子 D 和最低无作用稀释 LID，即最高测试浓度的培养基抑制率低于 5%，稀释因子用废水体积分数的倒数表示。例如，废水体积是测试培养基的 1/4（25% 体积比），则稀释因子为 D=4；详见 ISO 5667-16 的附录 A。

9.5 结果解析

EC_{10} 和 EC_{50} 值作为毒理数据来源于在确定的标准条件下的实验室试验结果，说明是一种潜在危害，不能直接用于预测其对自然环境的影响。当在解析说明 EC_{10} 和 EC_{50} 值时，要考虑生长曲线的形状。该曲线的某些特性（比如初始生长的延迟、具有良好生长初期但没有一直保持这种生长状态）能显示所关注毒物的作用方式。

10 精密度

用 $K_2Cr_2O_7$ 和 3, 5-二氯苯酚作为参考物质，结果见表 2。参考测试综述表明：测试用的菌株敏感性经过多年没有发生明显变化。

表 2 实验室间 E_rC_{50} 测试结果

| 测试生物和测试物质 | 参加实验室数量 / | 异常值 | 平均值 (mg/L) | 标准偏差 (mg/L) | 变异系数 (%) |
|--|----------------|-----|---------------|----------------|-------------|
| 近具刺链带藻 (<i>Desmodesmus subspicatus</i>) | | | | | |
| $K_2Cr_2O_7$ | 20 | 4 | 0.84 | 0.12 | 14 |
| 3, 5-二氯苯酚 | 18 | 2 | 6.42 | 2.38 | 37 |
| 羊角月牙藻 (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) | | | | | |
| $K_2Cr_2O_7$ | 9 ^a | 4 | 1.19 | 0.27 | 23 |
| 3, 5-二氯苯酚 | 9 ^a | 4 | 3.38 | 1.30 | 38 |

注 a: 羊角月牙藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 作为测试藻类的试验中出现较高数量的异常值，是因为用了不同的生长培养基（培养基的 pH 值不同）。偏离该标准规定 pH 值的生长培养基试验结果已经被剔除。

为了证明试验体系的有效性，建议至少测试一种参考物质（例如当试验仅使用了一种藻细胞株，或改变了试验条件的情况下）。结果应与表 2 中数据进行比较。

注：在此实验室间比对试验中，近具刺链带藻 (*Desmodesmus subspicatus*) 对照生长率为 $1.74d^{-1}$ （变异系数 CV 为 27%），羊角月牙藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 对照生长率为 $1.91d^{-1}$ （变异系数 CV 为 23%）。这些生长率表明细胞浓度的增加至少是 150 个/ml。

11 试验报告

试验报告应当包括下列信息：

- a) 参考本标准；
- b) 识别测试样品的所有数据；
- c) 测试生物：种、来源、株号、培养方法；
- d) 试验细节：
 - 试验开始日期和持续时间；
 - 样品和试验培养组的准备方法；
 - 测试浓度；
 - 培养基组成；

- 培养设备和培养步骤；
- 光照强度和质质量；
- 温度；
- 试验开始和结束时测试溶液（包括对照试验）的 pH 值；
- 测量细胞浓度的方法，并用背景值进行校正。

e) 结果：

- 每一培养瓶测定点的细胞浓度；
- 在每一测量时间点，每一测试浓度（包括对照试验）的平均细胞浓度；
- 生长曲线（细胞浓度的对数与时间的关系）；
- 用表和图代表的浓度和作用（对应浓度的抑制百分率）之间的关系，例如用抑制率和浓度对数作拟合；
- $E_r C_x$ 值，例如包括测定方法的 $E_r C_{10}$ 和 $E_r C_{50}$ ；
- 观察到的其他效应，如绿藻细胞的漂白。

附录 A
(资料性附录)

本标准章条编号与 BS EN ISO 8692:2004 章条编号对照

附表 A.1 给出了本标准章条编号与 BS EN ISO 8692:2004 章条编号对照一览表。

附表 A.1 本标准章条编号与 BS EN ISO 8692:2004 章条编号对照

| 本条编号 | 对应的 BS EN ISO 8692:2004 标准章条编号 |
|--------------|--------------------------------|
| 1 | 1 |
| 2 | 2 |
| 3.1~3.8 | 3.1~3.8 |
| 4 | 4 的第一、二段 |
| 5 第一段 | 5.3 第三段 |
| 5.1 | 5.1 |
| 5.1,1 | 5.1 a) |
| 5.1,2 | 5.1 b) |
| 5.2 | 5.2 |
| 5.3 注 3 | 5.3 第五段 |
| 6 | 6 |
| 6.1~6.6 | 6.1~6.6 |
| 6.7 | 6 的第二句 |
| 7.1 第一段 | 7.1 的 1~7 段 |
| 7.1 第二段 | 7.1 的末段 |
| 7.1 的注 1、注 2 | 7.1 的第 8、9 段 |
| 7.2 | 7.2 |
| 7.3 | 7.3 |
| 7.4 | 7.4 |
| 7.5 | 7.5 |
| 7.6 | 7.6 |
| 7.8 | 7.8 |
| 8.1~8.3 | 8 的 a、b、c |
| 9.1~9.3 | 9.1~9.3 |
| 9.4 | 10 |
| 9.5 | 11 |
| 10 | 12 |
| 11 | 13 |

附录 B
(资料性附录)

本标准与 BS EN ISO 8692:2004 的技术性差异及其原因

附表 B.1 给出了本标准与 BS EN ISO 8692:2004 的技术性差异及其原因一览表。

附表 B.1 本标准与 BS EN ISO 8692:2004 的技术性差异及其原因

| 本标准的章 条编号 | 技术性差异 | 原因 |
|--------------|------------------------------|--------------------------|
| | 删除文本前“警告”内容 | 不是本文的技术内容。 |
| 2 | 增加了引用文件“BS EN ISO 8692:2004” | 本文是依照该文件编写,因此增加了此文件。 |
| 4 | 将原标准的二段合成一段 | 为了更符合我国中文的表述。 |
| 5 | 未引用原标准对商业公司的推荐; | 符合我国标准的要求。 |
| 5.3 | 将贮备液 4 的内容以注的方式表达 | 更符合我国标准的表述。 |
| 6 | 将荧光计的内容以注的方式表达 | 更符合我国标准的表述。 |
| 9 | 将原标准“结果计算”该为“结果计算与表示” | 更符合我国标准的表述。 |
| 9.4 和 9.5 | 将原标准的 10、11 的内容改为 9.4、9.5 | 增加标准文本结构的紧凑性,更符合我国标准的表述。 |

附录 C

(规范性附录)

废水中绿藻生长抑制试验的快速筛选方法

C.1 通则

本标准适用于测定污水、废水和其他水环境样品，规定了在进行筛选试验对不同试验容器的要求，如培养皿。

C.2 样品的采集和保存

样品采集回来后应该尽快进行测试，或冷冻、解冻、过滤、离心等。在进行废水测试前，建议先参照 ISO 14442 和 ISO 5667-16 要求。

C.3 培养器皿

可以使用适当容积的烧瓶、培养瓶、培养皿。测试容器的材质选择应避免下列因素：

- a) 释放潜在的有毒物质；
- b) 从测试培养基中吸收成分；
- c) 蒸发损失废水中的重要组成成分；
- d) 在重复操作和处理过程中透光不均匀。

C.4 测试浓度的选择

按照 C.5 步骤稀释待测水环境样品。稀释系列应当能覆盖预期反应的数量级范围。如果使用培养皿和自动化设备，为了确保与要求的一致性，需要增加测试稀释液的数量。通过浓度查找试验来确定稀释系列。

除非对不同的试验方案有充分的技术校正，每一组试验（包括对照）最好做至少 3 次重复和 5 个浓度。基于数学统计的考虑，通过增加浓度数量和减少浓度区间能减少每一浓度的重复测定次数。

C.5 试验培养组的准备

按同样的方式准备系列培养测试组，以确保得到相同浓度的营养物质和接种绿藻。按照 7.1 步骤向试验水环境样品中加入营养贮备液（5.3），然后用适当体积的生长培养基和接种藻体混合该测试水溶液。该操作允许测试浓度达到约 98%。

C.6 对照本底值

测定不加绿藻的废水稀释液，以判断绿藻浓度测量时可能存在的干扰，以及允许背景校正值和选择合适的测量方法。

测试结束时，本底对照应当不干扰绿藻细胞的生长。

C.7 参考物质

推荐定期间隔使用测定参考物质（见第 9 章节）进行质量保证和检查绿藻细胞的敏感性。如果该生长抑制试验仅进行了两次测试（在试验最初和结束时）；或者如果使用了初始细胞浓度，仅在试验结束时进行一次测定，参考物质试验可以简化操作步骤。

C.8 试验生物

使用近具刺链带藻（*Desmodesmus subspicatus*）和羊角月芽藻（*Pseudokirchneriella subspicatus*）（5.1）。

C.9 测量绿藻细胞浓度

用显微镜或电子计数方法测量，也可以使用非直接的方法，如浊度计、光度计或荧光计进行测量，但应具有足够的灵敏度和很好的相关性。如果测试样品是浑浊的，建议使用荧光计测量，并且尽量减少浊度产生的干扰。

C.10 测试周期

测试周期最短 48h，最长可超过 72h。

C.11 测试频率

一般建议每天测量细胞浓度。对于废水样品，可以仅在试验开始和试验结束时测量细胞浓度。如果初始细胞浓度作为最初接种的细胞浓度，在这种情况下可以仅测量试验结束时的细胞浓度即可。

C.12 测量 pH 值

在试验结束时可以仅测量对照瓶的 pH 值。在培养皿测试中，pH 值可以共享对照重复试验的测定值。

C.13 抑制百分率的计算

由于抑制生长百分率（9.2）与生物量水平、生长条件和试验周期无关，因此可以作为本筛选试验的终点。

C.14 测定 $E_r C_x$ 和 LID

按照 7.3 步骤计算 $E_r C_x$ 值，也可通过直线图插值法计算 $E_r C_x$ 值。 $E_r C_x$ 单位为 ml/L 或废水占测定培养基百分比（体积比）。也可以用 LID 值（最低无作用稀释因子，见 ISO 5667-16:1998）来表示试验结果，LID 表示产生影响的最低稀释比应低于 5%。

C.15 质量控制

第 8 章节中的质量控制也适用于本附录，还应满足以下附加的措施（C.6）。在测试结束时，绿藻细胞在空白对照中的生长应当不被干扰。

C.16 试验报告

除 10 章节中要求的数据外，试验报告还应当包括测试样品的自然特性（废水、污水、沥出液等），来源、登记、样品方法、采样日期、保存、暴露时期、外观、前处理方法（放置、过滤、离心和 pH 值调节）、试验终点和计算方法。