

附件五：

《用鱼和海水双壳类软体动物进行生物浓缩试验》

（征求意见稿）编制说明

《用鱼和海水双壳类软体动物进行生物浓缩试验》编制组

二〇一二年六月

目 录

1	项目背景.....	1
1.1	任务来源.....	1
1.2	工作过程.....	1
2	标准制修订的必要性分析.....	1
3	国内外相关分析方法研究.....	2
4	标准制订的基本原则和技术路线.....	2
5	方法研究报告.....	2
5.1	方法研究的目的.....	2
5.2	方法原理.....	3
5.3	试剂和材料.....	3
5.4	仪器和设备.....	12
5.5	分析步骤.....	15
6	标准主要技术内容的解释.....	19

《用鱼和海水双壳类软体动物进行生物浓缩试验》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

本标准列入环境保护部计划为 2007 年，计划编号为 20071506-T-467，项目统一编号为 1207.25，下达计划的文件号为环办函【2008】368 号。

本标准的承担单位为深圳出入境检验检疫局、国家环境保护总局环境标准研究所。

1.2 工作过程

2007 年 9 月 26 日，根据全国环境监测方法标准化技术委员会的要求，中华人民共和国深圳出入境检验检疫局（以下简称“深圳检验检疫局”）负责承担“用鱼和海水双壳类软体动物进行生物富集试验”的标准起草工作，国家环境保护总局环境标准研究所参与标准的起草。深圳检验检疫局组织有关制标单位成立了标准起草小组，制定标准的实施方案。先后召开 2 次会议，对试验标准方法的框架、内容进行了讨论。形成初稿后又请深圳检验检疫局对标准（草案）稿进行认真的修改，最终形成了标准的征求意见稿。

2 标准制修订的必要性分析

随着我国改革开放的不断深入，国际贸易不断发展，国外化学品的进口，国内化学品的出口，都需要国际认可的毒性鉴定资料。长期以来，我国化学品毒性鉴定机构采用的实验方法大多沿用早期俄、日、美、欧洲的实验方法。近十年来，随着国际上新方法、新技术的应用，极大的提高了化学品毒性鉴定的科学性、可行性和方法的规范化等。国内的许多化学品毒性鉴定机构也借鉴学习了不少国外的先进技术和方法，但由于没有统一要求的试验标准方法，互相之间存在着不少差异，造成在评价化学品毒性时往往因采用方法不一致，造成鉴定与评价结果的偏差，极大地阻碍了我国化学品的市场竞争力和开拓国际市场的发展。

为规范我国化学品毒性鉴定工作，提高化学品毒性鉴定的质量水平，使我国化学品毒性鉴定工作与国际接轨，根据《中华人民共和国职业病防治法》、《危险化学品管理条例》、《化学品毒性鉴定管理规范》（卫法监发[2000]420 号）规定，参考了 ASTM 制定的相关文件，结合我国开展化学品毒性鉴定工作的实际情况，特制定本标准。

3 国内外相关分析方法研究

当前生物浓缩试验的主要标准方法有 OECD TG 305-1996: BIOCONCENTRATION: FLOW-THROUGH FISH TEST, 以及依据该标准形成的国标GB/T21800-2008: 化学品 生物富集 流水式鱼类试验, GB/T21858-2008: 化学品 生物富集 半静态式鱼类试验ASTM E 1022 – 94 (Reapproved 2007): Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Mollusks。

上述几个标准的试验原理基本是一致的, 主要为在吸收阶段, 试验动物暴露在有意添加了一些特定浓度受试物的稀释水中, 直至达到表观稳定态; 在清除阶段, 试验动物暴露于无添加任何受试物的稀释水中。试验的两个阶段中, 试验动物和水样品定时从试验槽中移出并进行分析, 从而通过组织液和水样品中的受试物的浓度计算得到表观稳定态和预期稳定态的生物浓缩系数 (BCF) 以及吸收和清除速率常数。其区别主要在于 OECD TG 305-1996 是经济合作与发展组织化学品测试的导则(英文版), 主要是利用鱼类作为生物浓缩试验的动物, 进行浓缩试验的研究。国标 GB/T21858-2008 和 GB/T21858-2008 基本是等同采用其方法, 只是使用了流水式和半静态式两种方式。ASTM E1022 是利用海水鱼、淡水鱼以及双壳类软体动物作为试验动物, 进行生物浓缩试验, 相比而言, 其原理类似, 但内容更全面。

4 标准制订的基本原则和技术路线

本标准的制定是通过生物浓缩试验积累受试物从而获得关于受试物和水物种的信息。其基本路线包括:

试验条件的控制—包括稀释水的盐度、硬度、pH值、溶解氧、离子氨浓度以及不同试验动物的温度条件、光照条件等。

试验动物的选择和喂养—依据不同的试验目的, 选择合适的试验动物, 进而根据其不同的特点进行喂养、疾病的处理等。

受试物的选择—根据试验的目的, 选择适当的受试物, 并根据预试验或者其它依据选择合适的试验浓度。

试验结果的分析—准确判断其吸收阶段和清除阶段的时间, 按要求分析对照组和试验组试验溶液的浓度以及动物组织。

数据处理—对试验中得到的多个数据进行分析, 对其有效性进行判定。

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目的

通过生物浓缩试验可以直接从水中积累受试物从而获得关于水生物种的信息。这个指南本标准为设计测试材料化学品性能的生物富集生物浓缩试验提供指导,以便于每种材料化学品都能低本高效地进行测试。

5.2 方法原理

实验分为两个阶段:吸收阶段和清除阶段。两组同种生物体试验动物的一组作为处理对照组,放在一个没有测定物质但其他条件都和两组实验组相同的条件下,用来作为“背景”。两个阶段中的生物体试验动物暴露在没有添加任何受试物的稀释水中,这种处理方法提供了可以得到实验生物体试验动物的质量的可行性试验方法,并且提供合适的稀释水、食物、测试条件、处理程序方法等。在另一种处理中,生物体试验动物(a)吸收阶段的生物体试验动物暴露在有意添加了一些特定浓度受试物的稀释水中,至少达到表观稳定态或是28天后;(b)清除阶段的生物体试验动物暴露于无添加任何材料受试物的稀释水中。试验的两个阶段中,典型的生物体试验动物和水样品定时从每个试验槽中移出,并作为测试材料受试物进行分析。表观稳定态和预期稳定态的生物富集生物浓缩系数(BCF)以及吸收和清除速率常数通常可以由组织液和水样品中的受试物中测量到的浓度计算得到。假如想判断生物富集生物浓缩系数和速率常数是否和水中的受试物浓度有关,就要在吸收阶段中使用不同浓度的受试物作额外处理。

5.3 试剂和材料

该试验用到的主要试剂和材料为:稀释水、受试物、试验动物,具体而言,其要求为:

5.3.1 稀释水

5.3.1.1 要求—稀释水应(a)供应充足;(b)能被实验生物体试验动物接受;(c)性质一致;并且不会不必要地对试验结果造成影响。

5.3.1.1.1 稀释水不会对生物体试验用动物有不利影响,对生物富集生物浓缩试验来说,稀释水用于生物体试验动物可接受的最小准则是生物体在健康试验中生物体试验动物在适应环境和试验期间能够幸存,并没有受到刺激惊扰的征兆,如变色或有不同寻常的行为。另外,水不应影响生物体试验动物吸收和清除受试物的能力。因此,接受稀释水用于生物体试验动物试验的一个较好准则则是至少有一种水生动物物种能够在其中满意地生存、成长和繁殖。除非稀释水的可接受性已经在之前数年被证明,稀释水应在试验期间证明有以下表现,要么(a)至少一种水生动物物种能够在实验室环境或在生命周期毒性试验(见指南E 1191, E 1193, E 1295)中能够生存、成长和繁殖,要么(b)至少一种鱼类将在部分生命周期或早期生命阶段毒性试验(见指南E 1241)中表现出可接受性。

5.3.1.1.2 稀释水不应因为如吸附或络合受试物等原因不必要地影响生物富集生物浓缩试验结果。因此，除非如5.3.1.1.3所述，总有机碳量（TOC）和颗粒物质的浓度在鱼的试验中不应超过5 mg/L，海盐水双壳软体动物的试验不应超过20 mg/L。

5.3.1.1.3 稀释水的品质在试验中应保持一致。在淡水中进行实验时，水的硬度范围不应超过5 mg/L或平均水平的10%，无论哪一个更高。在盐水中进行实验时，盐度不应超过2 g/kg或平均水平的20%，无论哪一个更高。

5.3.1.1.4 如果想在生物富集生物浓缩试验结果中研究环境因素的影响如TOC、颗粒物或溶解氧，需要使用自然或人工的高TOC或颗粒物或低溶解氧的水。如果使用这种水，对水的特性进行适当的分析就用于描述水的特性是非常重要的，并且通过应用或实施与更多的稀释水的对比试验，促进得到特殊用水结果的解释。

5.3.1.2 来源

5.3.1.2.1 虽然可以使用再生水（见指南E 729），但一般不在生物富集生物浓缩试验中使用，因为需要的水量很大。另外，当再生水使用时，再生水很难提供盐海水双壳软体动物足够数量的可接受食物。

5.3.1.2.2 如果使用天然水，天然水应从未受污染、质量保持一致的水源获得。对淡水来说，井水和泉水优于地表水。如果使用地表水作为淡水或盐海水，取水位置应将质量波动和受污染的可能性降至最小，使得硫化物和铁的浓度最大。

5.3.1.2.3 对海水双壳类软体动物生物富集生物浓缩试验来说，需要在浮游生物最多的位置取水以维持生物的生长和生存。

5.3.1.2.4 不能使用，或准备使用氯化的水作为稀释水，因为所有的余氯和氯产生的氧化剂对水生动物的毒性很大。脱氯水应仅作为不得已的选择最终手段使用，因为脱氯通常都不会完全。亚硫酸氢钠在用于水脱氯时好于亚硫酸钠，但两者都比碳过滤器更可靠，尤其是在除氯胺的时候。一些有机氯胺，无论如何都会缓慢地与亚硫酸氢钠反应。除了余氯以外，市政饮用水通常含有无法接受的高浓度铜、铅、锌和氟化物，而且质量易变。当必要时，额外浓度的大多数金属离子通常需要用螯合树脂去除。如果脱氯水用于稀释水或在其中作为预备水使用，则那要么（1）稀释水的可接受性在试验中必须被得到证明，或者要么（2）它必须在每一周在不连贯的时间天数内3次中展示满足（a）或（b）3次，在稀释水中的新鲜样品是（a）指的是在稀释水中的新的）汤氏纺锤水蚤，糖虾（一种动物释放不超过30h，能够在没有食物时存活48小时），双壳类软体动物幼虫，或第一龄期水蚤在没有食物时存活48小时。或是（b）是所有余氯在淡水中浓度或氯产生的氧化剂在盐水中浓度小于8 µg/L。

5.3.1.3 处理

5.3.1.3.1 稀释水在加入试验物之前应使用气泡石、表面曝气机或体积曝气机集中曝气。足够的曝气将提高 pH 值，使和溶解氧浓度和其他气体达到成为平衡态空气，并将氧和挥发物浓度降到最小。稀释水中溶解氧浓度的饱和度应在 90-100%之间，这将帮助确保试验池试验槽中溶解氧浓度是可接受达到适宜的值的。应避免溶解气体的过度饱和导致稀释水发热，这将防止气泡病的发生。

5.3.1.3.2 在双壳类软体动物试验双壳类软体动物时，通常使用未过滤和未杀菌过的天然海水通常被使用，以尽可能多地提供天然浮游生物食品。

5.3.1.3.3 除可能的双壳类软体动物试验之外，其他试验可以通过使用沙、短袜、袋子、深入型套筒过滤，保持颗粒物在可接受适宜的较低浓度并作为通过紫外杀菌或通过一个出色的过滤器过滤的预处理，或两者都都适使用。

5.3.1.3.4 除双壳类软体动物试验之外除可能的双壳类软体动物试验，其他试验可能需要地表水源的盐水通过一个 15 μm 或更小的过滤器进行有效过滤，以除去寄生虫。

5.3.1.3.5 除可能的双壳类软体动物试验之外，其他试验用，稀释水可能被不需要的微生物污染，这就可能需要一个通过合适的并配备强度计和流量对照的紫外杀菌器，或通过一个 0.22 μm 或小于该孔径的过滤器。

5.3.1.3.6 如添加物证明对生物体试验动物没有有害影响，通过添加适当的试剂级化学品、海盐、酸、碱和去离子水或蒸馏水，可以对硬度，盐度，pH 值进行调节。

5.3.1.4 表征一下述的项目每年应测量两次或两次以上，其前提就是如果使用了地表水或两年内这些中以下项目没有测量没有隔半年进行测定一次或使用了地表水：以下项目每年应至少测量两次：

5.3.1.4.1 所有的水—碱度，pH 值，电导率，颗粒物，总有机碳，总有机磷农药，有机氯剂（或总有机磷农药加多氯联苯），氯化苯氧除草剂，氨，氰化物，硫化物，溴，氟，碘化物，硝酸盐，磷酸盐，硫酸盐，钙，镁，钾，铝，砷，铍，硼，镉，铬，钴，铜，铁，铅，锰，汞，钼，镍，硒，银和锌。

5.3.1.4.2 淡水—硬度，氯化物和钠。

5.3.1.4.3 盐水—盐分。

5.3.1.4.4 对每种使用的方法，检测限应低于（a）在稀释水中的浓度，或是（b）已证明对实验生物体试验动物有不利影响的最低浓度。

5.3.2 受试物

5.3.2.1 **概要**—受试物应为试剂级或更高级别，除非是特定需要的试验研究，才会使用商用产品，或技术等级或使用级物质。试验开始前，要了解关于受试物的以下信息内容应已知：

5.3.2.1.1 主要成分和主要杂质的特性和浓度，例如，杂质构成超过约 1% 的物质。

5.3.2.1.2 在稀释水中的溶解性和稳定性。

5.3.2.1.3 预期稳定状态的 BCF。这可能从具有相同或不同的物种的相同或类似物质的试验结果中得到。作为有机化学品，这些可以从已报导的稳定状态 BCFs 和这些物理化学性质如辛醇-水分配系数和水中溶解度之间的相关性得到。

5.3.2.1.4 表观稳定状态的评估时间。

5.3.2.1.5 实验生物体试验动物的急性毒性（需要慢性毒性的测量和评估）。

5.3.2.1.6 计划用水浓度和预期的稳定状态组织中的浓度，其中的十分之一预期的稳定状态组织中的浓度的分析方法的精度和偏差。

5.3.2.2 **放射性同位素示踪实验原料**—放射性同位素示踪实验原料偶尔在努力简化分析试验溶液和实验生物体试验动物时用到。这些物质的有效性极大地被两个严重大的复杂情况所限制：(a) 许多放射性同位素原料包含超过 1% 的放射性同位素杂质，少量的杂质具有很高的 BCF，这将极大地影响具有较低 BCF 的化学品的表观 BCF，并且 (b) 放射性同位素化学品充分地实验生物体试验动物内彻底产生代谢变化，一种或多种代谢物会有放射性，化学品的表观 BCF 将会非常高。克服这两个难题的唯一方法是验证验证在组织中和水中的放射性与母化学品相联合关。象薄层色谱这样的技术在证明放射性与母化学品未联合不相关上比验证代谢物与母化学品相联合相关更有用。通常需要使用气相色谱进行检测核查通常需要使用气相色谱，这意味着在决确定有关的 BCF 时，长远而言，使用放射性同位素示踪试验原料并不节省资源。

5.3.2.3 **储备溶液**—在一些情况中，试验系统中受试物能被直接添加入稀释水，但通常受试物都是溶解在溶剂中以形成储备溶液，之后再在试验系统中加入稀释水。如果使用了储备溶液，受试物在溶液中的浓度和稳定性应在开始试验之前就已决确定了。如果受试物会发生光分解，储备溶液应避光。

5.3.2.3.1 除了分析可能试验可水解性、易氧化性、可还原的物质外材料，试验中首选溶剂是稀释水，虽然可试验能中需要过滤或除菌（或是两者都需要），首选溶剂是稀释水。如果稀释水的硬度或盐分不受影响，可使用蒸馏水和去离子水。已经特别开发了几种技术用于准备微溶性材质的水性储备溶液。在准备水性储备溶液时，可以使用最少量的强酸和碱，但这些试剂可能对试验液的 pH 有一点影响。使用更多的可溶性受试物，如氯化物或硫酸盐的有机

胺，钠或钾盐的酚类和有机酸，金属的氯化物或硝酸盐（而非碳酸盐或氢氧化物），可能对pH值的影响超过使用所需最少剂量的强酸或碱。

5.3.2.3.2 如果使用除稀释水以外的溶剂，其浓度在试验液中应保持最小并不应降低试验物种的生长和生存。三甘醇因为其对水生动物的低毒性、低波动性和对有机化学品的强溶解能力，在准备储备溶液时往往是一个很好的有机溶剂。其他与水混溶的有机溶剂，如甲醇，乙醇、丙酮也可以使用，但它们可能会刺激生长不良的微生物，并且丙酮也相当不稳定。如果使用一种有机溶剂，应使用试剂级或更高级别，其浓度在任何试验液中不应超过0.1mL/L。在准备储备溶液时不能使用表面活性剂，因为它们可能会影响受试物在试验液中的形态（这些限制并不适用于任何成分的混合物，配方设计物质，或商业产品，除非这一额外数量的溶剂是用来准备储备溶液）。

5.3.2.3.3 如果使用除稀释水以外的溶剂，可以操作同时用两种无不相关的化学溶剂或两种不同浓度的同一溶剂进行试验，以获得溶剂对试验结果可能影响的信息。

5.3.2.4 试验浓度—几种因素可能影响到试验浓度的选择：

5.3.2.4.1 受试物在试验液中的浓度必须不能使生物体试验动物受到会应力刺激，否则会对试验期间生物体试验动物试验期间有不利影响。通过一个适当的急性—慢性速率，最好可接受高可接受试验浓度通常通过调节适当的急—慢性比值能够评估得到，对鱼类来说，96-h LC50，对双壳类软体动物，48-h EC50，这个数值是基于晶胚和幼虫的存活和发展生长得出的，有通常能够区别评估，对鱼类来说，96-h LC50，对双壳类软体动物，48-h EC50。一些材料化学品的速率值是3左右，但也有少数在100以上。

5.3.2.4.2 为了在吸收阶段和在90%被清除后的实验生物体试验动物中，溶液中受试物的浓度在试验溶液中能被精确的测量，试验浓度必须足够高。因此，试验溶液的浓度应等于或高于最高的（a）稀释水背景的3倍；（b）在稀释水中分析方法检测限的3倍；（c）除以预期稳定状态的BCF实验生物体试验动物中的背景的30倍；以及（d）除以预期稳定状态的BCF组织中的分析方法检测限的30倍。

5.3.2.4.3 受试物应溶解在试验液中；受试物不应该存在其他一些形式，如胶体，颗粒，或乳剂除非这些都是试验物的内在性质。因为在接近饱和溶液时通常会遇到这些问题，试验浓度通常不应超过试验物在稀释水中溶解性度的一半。

5.3.2.4.4 如果能够评估起在天然水中的预期浓度，并能如其满足以上条件时，应使用其此浓度作为试验浓度。

5.3.2.4.5 如果需要确定是否吸收、清除和BCF与水的浓度无关，应在试验浓度进行生物富集

生物浓缩试验，其覆盖范围因子将至少是因子为10。

5.3.3 生物体试验动物

5.3.3.1 物种—只要可能和合适，试验应使用表1所列物种进行。选择这些物种是基于以下因素：其易得；商业，娱乐和生态的重要性；过去的成功运用，以及在实验室中便于处理。鼓励使用这些物种以增加结果的可比较性，以及少量物种具有的较多信息而不是许多物种具有的少量信息的实用性。如果所需物种难以获得，应使用表中所列的物种。仅当特别关注时才使用特殊种属品系物种。使用物种的学名应使用合适的分类学索引进行核实。如果淡水鱼材料的结果可行，同时需要海水动物的结果，通常用一只海水鱼类试验时有一只海水双壳类软体动物会更好，因为，与双壳类软体动物和两者任一种类鱼类之间相比，BCFs将更近似于淡水鱼和海水鱼类之间。

表 1 物种和试验温度

物种 ^A	试验温度， °C
淡水类：	
虹鳟鱼， <i>Salmo gairdneri</i> Richardson	12
黑头呆鱼， <i>Pimephales promelas</i> Rafinesque	17, 22
斑点叉尾鮰， <i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque)	17, 22
蓝鳃太阳鱼， <i>Lepomis macrochirus</i> Rafinesque	17, 22
海水类：	
紫贻贝， <i>Mytilus edulis</i> Linnaeus	环境温度
扇贝， <i>Pecten</i> spp.	环境温度
牡蛎， <i>Crassostrea gigas</i> Thunberg C. virginica Gmelin	环境温度
杂色鲮， <i>Cyprinodon variegatus</i> Lacepede	22
底鲮， <i>Fundulus heteroclitus</i> (Linnaeus)	22
小鳍底鲮， <i>Fundulus parvipinnis</i> Girard	17
三刺鱼， <i>Gasterosteus aculeatus</i> Linnaeus	17
钉头鱼， <i>Lagodon rhomboides</i> (Linnaeus)	22
斑鱼， <i>Leiostomus xanthurus</i> Lacepede	22
海鲷， <i>Cymatogaster aggregata</i> Gibbons	12

A 使用物种的学名应使用合适的分类学索引进行核实

5.3.3.2 尺寸—所有在试验中使用的生物体试验动物尺寸的和年龄应一致。

5.3.3.2.1 鱼—除非需要特殊生命阶段的数据，应使用幼鱼进行试验，确切地说，幼年后期或更大大一点些的、会积极进食的，但未不是性成熟、产卵或最近产了卵的鱼。在任一单一试验中，所有的鱼都是应来自统同一年龄段，最长的鱼的标准体长（鼻尖至有尾部肉柄）不超过最短的鱼的 2 倍。这有利于用相对较小的鱼（小于 10 克），在惯用尺寸正常大小的试验

池槽中要容纳所需数量的鱼，用相对较小的鱼（小于 10 克）是有利的中容纳所需数量的鱼。鱼实验生物体可接受的最小尺寸决定于其试验物组织中试验物的测量定能力，因为鱼需要足够大达到以允许满足在每一生物体条鱼中能进行受试物的测定，甚至和如有必要时还要在其肌肉组织中进行测定测量受试物。

5.3.3.2.1.1 同一物种的成年雌鱼或雄鱼有时具有不同的脂肪含量。因此，在利用有机化学品试验中有机化学品或要求（a）鱼在试验期间任何时候都未性成熟，或（b）在分析的任何时候，每种鱼的性别都应决定和记录，并且雌性和雄性两者的脂肪含量度应单独分别测量。通常可通过降低温度和缩短日长光周期或两者种方式都使用来防止性成熟的过程。

5.3.3.2.2 双壳类软体动物—使用相对较大的软体动物（壳嘴尖部到远端瓣边缘距离大于 60mm）会造成正常大小的试验池试验槽很难中容纳所需数量的软体动物的困难。但软体动物也应足够大（壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离大于 40mm），能达到在动物体中使得测定受试物的要求，深圳能够在生物体单体中和如需要的话，还要在扇贝闭壳肌中能够测量。在任何单一试验中，所有软体动物应来自统同一年龄段，同时最大的软体动物壳嘴尖部到远端瓣边缘距离应不超过最小的软体动物的 1.5 倍。

备注 1：壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离是最客观的定义，通常会在生物浓缩实验中使用到这个参数，也容易测试双壳类软体动物物种活体具有易于进行测量的有用特点的话，通常会在生物富集实验中使用。一些物种可能需要三维测量。最需要测量的是软组织的重量，但在试验前不能测量，应在试验结束后进行。

5.3.3.2.2.1 在试验期间应禁止双壳类软体动物产卵。使用性未成熟动物和已知抑制产卵的试验温度都是可接受用的预防措施。应每天检查试验池试验槽的底部是否有如白色晶胚膜的产卵迹象。

5.3.3.3 来源-试验中所有生物动物应为同一来源。实验室培养的诸如黑头呆鱼和杂色鲮通常提供的背景资料、年龄、大小、性质应是众所周知的，并在所有实验室是类似的。其它淡水鱼一般来源于私人或国家、联邦孵化所。任何时候使用的鲑鱼或鳟鱼，他们应证明已证明无病，例如传染性的传染性胰脏坏死，疥疮病，肾脏疾病，肠遭红嘴病，眩晕病。证明认证的要求各个地方不同，各个物种也不同。其它推荐的物种通常从相对无污染的野生群体中获得。进口和收集允许证从当地和政府机构获得。

5.3.3.4 照顾和处理—生物应该妥善照管和处理，使它们免受惊扰刺激。

5.3.3.4.1 每当水生试验动物被带入一个设施，它他们必须被隔离 14 天，或更长时间，直至它们至少看起来来无任何疾病。生物体试验动物或水从一台隔离箱向其他箱体转移时应不可

使用抄网、清洁用品及其它设备、生物体或水从一台隔离箱向其他箱体转移。

5.3.3.4.2 保持试验水生动物状况良好，避免受到不必要的惊扰刺激，它们不应拥挤或承受温度或水质的快速变化。一般来说，在 12 小时内水温改变不应超过 3 °C 以上，最好是 72 小时内变化不超过 3 °C，溶解氧的浓度应保持 60 和 100 % 饱和度之间，更理想的是加上连续轻柔曝气。总溶解气体浓度的应少小于 105% 饱和度。可能除双壳类软体动物外，被某些微生物污染的水可经过合适的并配备强度计和流量对照的紫外杀菌器，或通过一个 0.22 μm 或小于该孔径的过滤器。在放置及适应箱体中非离子氨浓度应小于 20 μg/L。

5.3.3.4.3 放置及适应箱应该按需要擦洗或刷涂。不同组别试验生动物使用之间，箱体应用碘消灵载体消毒或者用 200mg 毫克/L 的次氯酸的消毒 1 h，一个小时内刷洗完，然后冲洗干净好。

5.3.3.4.4 生物体试验动物应尽量少处理。当必须处理时，应该轻柔，小心，并要求快速，以免生物体试验动物受到惊扰。在处理过程中生物有受伤或跌落，鱼有接触到干面时，都应该抛弃。处理大于 0.5 克鱼的最好的方式是抄网。这种鱼网是商业市场现有的，也可从小型网状尼龙网、尼龙或蚕丝（绢）筛布、浮游生物网、或类似无结材料织成。处理鲶鱼时网最好涂敷聚氨酯树脂。用来处理鱼设备的在使用之期间应用蒸汽或碘消灵或者 200mg 毫克/升 L 次氯酸钠消毒。。处理或喂养之前应该洗手。

5.3.3.4.5 在隔离，放置和适应期间，每日应仔细观察生物体试验动物，观察其受扰受刺激，物理损害，死亡率，疾病和外来寄生虫的迹象。损伤至死的、异常的个体都应该抛弃。用探头接触打开的双壳类软体动物而它不关闭时应该抛弃这些动物。双壳类软体动物从未打开或不存没有粪便或类似粪便物时也应该抛弃。如果肉眼可见鱼有不进食或者翻动、闪动、不规律游动、瘦弱、在水面气喘吁吁、过度换气，出血，产生过量粘液，或显示不正常颜色等这些行为和外部表象，其导致原因应被排除查明。如果生物体试验动物表示出任何的疾病或有外部寄生虫病，应采取适当措施。

5.3.3.5 喂食：

5.3.3.5.1 应确定受试物在食物中的浓度。

5.3.3.5.2 鱼类至少每天喂食一次，以供其生存，生长和繁殖。食物必须达到以下要求才能使用在本试验中，（一 a）一批食物能维持至少一种水产动物的生存，生长和繁殖，或（b）有机氯的浓度不超过 0.15 μg/g 的（湿重），或有机氯农药（含多氯联苯）的总浓度不超过 0.3 μg/g 的（湿重）。

5.3.3.5.3 对于双壳类软体动物，应提供含有充足食物的足量的水，以维持其生存和生长。如果使用未加入海藻的未经消毒和未经过滤的天然海水，至少每小时每只动物需要有 1 升水，这通常是壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离为 40 至 60 毫米的软体动物所需要的最小量，如果流速或食物浓度过低，或两者都过低，稀释水中可添加海水绿藻，如巴夫金藻或等鞭金藻，或硅藻如海链藻可添加到稀释水中。

5.3.3.6 疾病处理-鱼可能是经过化学处理治疗或使用适当的方法（见（ 28 ）和指南 E729）来预防某些疾病。如果他们都受到严重病变，更好的是立即丢弃整批鱼。有其他疾病的鱼和其他所有患病动物应立即丢弃，因为系统的细菌感染通常不能有效治愈，没有深入的治疗内部寄生虫不能除去，病毒性传染病就也不能得到治疗，而且无脊椎动物几乎不可能得到有效的处理。诊疗后至少 10 天之内不能进行试验，试验中生物体试验动物不允许进行治疗。一般来说，因为在收集或运输期间的可能受到刺激或药物处理的缘故，生物体试验动物不应将在到达一个设备头之前的 16 小时进行处理，。这是因为在收集或运输期间的可能受扰或药物处理。然而在某些情况下，有必要立即进行预防性治疗是必要的，如在热天时治疗蓝鳃太阳鱼的柱状病。

5.3.3.7 放置—试验动生物应被置于未被污染的，温度恒定、水质恒定的并水汽不断的水中，水处于流动系统中，鱼每天至少补充两次大量的水，每个双壳类软体动物（壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离为 40 至 60 毫米）要补充 1 升水/小时；如果流速更快将更理想。实验生物体试验动物应置于该稀释水中，设置温度为处于接受试验的温度上。表 1 所列温度对放置各物种总体上是好的。但是对于长时间放置，一般而言来说，保持低于表 1 的温度将会更容易和更安全，因为其代谢率和数量以及疾病暴发程度就会降低。

5.3.3.8 适应-防止测试生物体试验动物因为试验室中水质或温度的瞬时变化而受扰受刺激，开始试验前几天，适当数量的类似大小的生物应当从放置箱转移到适应池，适应池中鱼每天至少补充两次大量的水，每个双壳类软体动物（壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离为40至60毫米）要补充1升水/小时。水在适应箱体也应逐步改变，两天或两天以上时间内从100%放置水到100%稀释水。同样地，水温也应逐步改变，以72 h内之内不超过3°C的速度变化，直至最后达到试验温度。所有动生物在放到试验室之前必须喂养在稀释水中，在试验温度下保持至少48小时。倘若未得到充分的实验确定，适应期可能要花更长的时间。因此，可能时使用长于最低指定值的适应期。

5.3.3.9 性质-所有用在测试中的生物体试验动物应在可接受的性质范围内。

5.3.3.9.1 损伤、死亡、异常、及生病的动生物应按照5.3.3.4.5和5.3.3.6处置。

5.3.3.9.2 动生物应该 (a) 用水和食物来养殖，食物至少能支持试验动物种水生物的生存，生长，繁殖； (b) 从未排放加料和化学处理的水体中获得以及用满足以上要求的水和实食物喂养；或 (c) 分析表明： (1) 不含有高浓度的化学物质，这些化学物是它们可能接触的 (2) 或者有机氯的浓度不超过0.15 µg/g的 (湿重) 或有机氯农药总浓度 (含多氯联苯) 不超过0.3µg/g的 (湿重)。对(c)来说，一批生物中分析几个有代表性的生动物足够了；不必要分析每一批生动物物或者每一个试验前都分析。

5.3.3.9.3 对于试验材料化学品，应分析几个代表性的生物体试验动物。如果测试样品浓度超过10%的预期稳定状态的浓度，生物体试验动物在稀释用水中保持一段时间或使用得到供其他测试用其它生物体试验动物可能是合适可取的。

5.3.3.9.4 到达实验室后，软体动物至少4天、鱼类至少14天才能用于试验。

5.3.3.9.5 试验动物一组生物如果有个别看起来是染病的或以其他方式显示异常，或者在测试前48小时之内超过3%的生物立即死亡，那么这组动物应弃而不用。如果某一生动物种群不能符合这些标准，所有动物个体都不能使用应弃而不用，或进行进行了额外的10天处理，有必要的时候再进行适应试验。

5.4 仪器和设备

5.4.1 设备：流动储水池应有利于待测生物体试验动物驯养，放置，适应。抬高装稀释水的水箱或流浆箱，或两者均抬高，稀释水可由无压给料进入保持适应水池或测量系统，这一系统用于准备测试液和将测试液转送至测试槽。供水系统应带有过滤器和鼓气装置。试验槽应置于恒温，循环水条件下。流浆箱，放置、驯养、适应水箱需要通风，控温。通风的空气应无油、烟、水，需过滤去除油和水，最好使用0.22µm细菌过滤器过滤空气。在放置，适应，测试期间，应使用遮挡物或分割区保护生物体试验动物免受干扰，防止不必要的惊扰。实验室必须通风良好，空气无烟。为了进一步降低测试材料化学品和其他物质，特别是挥发性物质对实验生物体试验动物的污染，放置、驯养、适应水箱不能放置于进行生物富集生物浓缩或毒性试验的房间，也不能置于准备储备液，测试液以及设备清洗的场所。16小时光照，8小时黑暗的光照周期通过计时设备可方便控制，但更理想的是12小时光照-12小时黑暗或者14小时光照-10小时黑暗的光照周期，因为这样会延缓生物体试验动物的生长。当光开启时，最好有15-30分钟的过渡期，以降低生物体试验动物因突然的光照而受到惊扰刺激；当光关闭时也最好有过渡期。

5.4.2 构架材料一：可能接触储备液，测试液以及生物用水的设备或设施不能含有化学物，这些化学物可能是通过水溶液渗透或溶解进入，进而反作用于生物体试验动物。另外，这些

设备和设施应选择能减少受试物从水中的吸附的材料。优先选择使用玻璃、316号不锈钢、尼龙和氟塑料等材料，以尽量减少物质的渗透、稀释、吸附，有一个特例就是在海水下测试金属时不应使用不锈钢。混泥土和硬塑胶（未添加增塑剂）可用来制作成驯养，放置，适用环境的水箱和再生水系统，在使用前须用流动的稀释水浸泡数天。再生水系统不应该在海水条件下使用铸铁管，因为胶体铁将被加入到稀释水，滤网需要清除铁锈粒子。特别设计系统通常是从天然水源中取得海水（见指南E 729），在储备液和待测液测试之前或测试过程中，紫铜、黄铜、铅、镀锌金属和天然橡胶不应接触稀释水。氯丁橡胶及以上没有提及的材料不应该被使用，除非是一个敏感水产品种，生存时间为48或96个小时（见指南E 729），在使用那些材料前应在静水中浸泡。

5.4.3 测量体系统

5.4.3.1 测量系统必须有测试类别、测试浓度、测试流速的设计；系统可以重复提供待测物质的选定浓度的设计。组合各种洗涤器、“浸渍鸟”、虹吸管、泵、螺线管、阀等的各种测量系统已成功被使用（见指南E 729）。由于生物富集生物浓缩试验通常有一个对照处理和受试物的浓缩，测试系统通常由以下部分组成，一个测量受试物溶液的设备，两个测定稀释水的装置和两个小型混合槽（或分离槽，如果需要使用两个试验槽），混合槽用于在进入试验槽前混合各自的测试溶液。

5.4.3.2 在每个试验前，测试系统应该进行校准，校准通过测试经过每个试验槽的流速和测量在每个槽中受试物的浓度或在测量系统中每个部分的体积进行。在整个测试过程中，应该每天上下午目测测量系统运转情况。必要的时候在测试期间要调整测量系统。

5.4.3.3 每个试验槽中的流速至少要达到每24小时5倍体积增加物，根据容纳量的情况可能更大。在双壳类软体动物的试验中，最小必须流速还取决于在稀释水中食物供给的数量。通常使用至少每24小时10倍体积增加物的流速比较理想，尤其在试验的初始阶段当吸收最大的时候，但是较高的流速会增加稀释水和使用的受试物的数量。如果由微生物降解、水解、氧化、光解、还原、吸附或挥发作用使得受试物快速流失，达到使用一个较高的流速也是比较理想的。在试验的任一特定时间里，通过任两个试验槽的流速差别不能超过10%。假如相同数量的实验生物体试验动物从所有的容器中移出，在所有试验槽中，只要流速保持在至少每24小时5个倍体积增加物，而且容纳量和温度保持在合理范围，溶液的深度或者流速，或者两者会等量减少。

5.4.4 试验槽

5.4.4.1 在一个对水生物的毒性测试中，一个试验槽应是一个最小的物理单元场所，并且要

无水源。不过，每个试验槽里面可以用屏风和杯子来制造两个或两个以上的隔间。这样溶液就可以从一个隔间流到另一个隔间，为了保证精确度，不能从一个试验槽到另一个试验槽。因为试验中溶液可以在同一个试验槽内的不同隔间中流动，这些同一试验槽的隔间中的溶液温度、试剂的浓度、病原菌含量和外界污染情况就会比同样试验条件下不同试验槽的隔间之间的情况更相近。试验槽应该被保护起来，这样才可以防止外来细菌以及降低试剂和受试物的蒸发。在测试中，所有的试验槽和隔间必须完全一致。

5.4.4.2 试验槽通常由焊接的（非软焊）不锈钢或胶合双倍强度或更强的含有机硅粘合剂的窗户玻璃构成。塞子和硅树脂粘合剂会吸附一些很难去除的有机氯和有机磷农药。因此，试验溶液应尽可能避免与塞子和胶粘剂接触。如果实在需要额外的胶粘剂，它们也应位于容器之外，而不是容器内部。

5.4.4.3 最小尺寸的试验槽和最小深度的试验溶液依赖于各试验生物的规模及容纳量。试验槽的最小的横向尺寸应至少是最大的试验生物的最大横向尺寸的 1.5 倍。鱼的试验溶液的深度应该至少是最大的实验生物体试验动物高度的 3 倍；此外，对于超过 0.5 克（湿重）的鱼，试验溶液的深度至少应为 150 毫米，对于较小的鱼，试验溶液的深度至少应为 50 毫米。对于扩充至 150 毫米的容器，顶部有时需要加盖，以防止鱼跳出。对于双壳类软体动物，在整个试验过程中试验溶液应该彻底淹没该生物。对于壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离小于 60 毫米双壳类软体动物的试验，以及对于小鱼（少于 10 克）的试验也常常使用 300 毫米深的全玻璃试验槽以及 30 升的溶液。在试验槽中使用了过量的溶液将不必要地增加稀释水和试验使用的材料受试物的量或者平均保持时间，或两者都不必增加。

5.4.4.4 清洗——测量系统，试验槽以及用于准备和贮存稀释水、储藏溶液以及试验溶液的设备应清洗后才能使用。新的设备应该用洗涤剂冲洗，用水、水混溶的有机溶剂、酸的水溶液（如 10% 的浓盐酸）漂洗，并至少两次由蒸馏水、去离子水稀释水漂洗。（某些有机溶剂，可能留下不溶于水的薄膜。）重铬酸钾—硫酸清洁液，可用于同时含有有机溶剂和酸的地方，但它也可能会损坏有机硅粘合剂，因此需要特殊的处理技巧。在每次试验结束后，所有设备若要再次使用，应立即（a）清空，（b）用水漂洗，（c）按适当的程序清洗，以去除受试物（如，使用酸以消除金属及碱；使用洗涤剂、有机溶剂或活性炭以去除有机化学品），（d）用蒸馏水、去离子水或稀释水冲洗至少两次。酸用于去除矿物质，每升 200 毫克的次氯酸用于去除有机物和消毒。（含有每升 200 毫克的 OCl^- 可通过通过将 6 毫升液体家用含氯漂白剂加 1 升的水中获得的。氯酸盐对于大部分水产动物来说是有毒的（14），并且其它很难从材料上冲洗掉。这它常常是通过与硫代硫酸钠、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠反应，或通过蒸馏水中

20分钟的高温消毒，或通过干燥设备并放置至少24小时后才开启使用来去除。)测量系统和试验槽应在使用之前用稀释水清洗。

5.4.5 可接受性——新的放置、适应以及试验设施应进行毒性试验后才能开启使用。

5.5 分析步骤

试验的主要步骤包括试验设计、预试验、试验的吸收阶段、清除阶段以及分析阶段。进行一个预备实验去完善决定性实验的实验条件是很有好处的，比如，选择测定物质的浓度，聚集阶段和释放阶段的持续时间，但预试验非必须步骤。其具体说明如下：

5.5.1 试验条件

5.5.1.1 溶解氧浓度保持在60%到100%饱和度之间

5.5.1.2 离子氨的浓度不应超过 20 $\mu\text{g/L}$;

5.5.1.3 温度：

推荐研究者选择表 1 所列温度作为鱼浓缩试验的试验温度，在测试过程中，温差不超过 2 $^{\circ}\text{C}$ 。海水双壳类软体动物生物富集生物浓缩试验一般温度控制在 8-28 $^{\circ}\text{C}$ 之间，温差必须小于 10 $^{\circ}\text{C}$ ，并保持尽可能低的温度以抑制产卵。

5.5.1.4 容纳量：

容纳量用试验槽每升溶液中的生物体试验动物的克数（鱼类的全身，双壳类软体动物的整个软组织；体湿需吸干）表示。鱼类和软体动物双壳类的生物浓缩试验，低容纳量和高流速是比较合适的。鱼类容纳量在 24 小时内不超过 1 克/L 升，且测试期间任何时候都不能超过 10 克/L 升。双壳类软体动物的最大容纳量主要取决于在稀释水中食物的数量，通常。如果补充的海水藻类不会添加到稀释水中，其从壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离为 40 至 60 毫米距离，容纳量为每小时通过试验槽的每升溶液应不超过一个生物体试验动物。

5.5.1.5 试验设计

生物浓缩试验设计的重点包括每一次处理的的试验池试验槽的数目，吸收和清除阶段的持续时间，每个阶段采样点的数目和间隔，每个采样点样本数量和分析的样本数量。适当的采样程序可参见表2。设立同种生物体试验动物的处理对照组，包括一个吸收阶段和一个清除阶段，在对照处理中，两个阶段中的生物体试验动物暴露在没有添加任何受试物的稀释水中。

表2 最少生物采样程序

物质	1	2	3	4
Log K _{ow} ^A	3.13	5.01	5.73	5.89 ^B
S ^C (days)	2	12	24	28 ^B
吸收阶段 ^D				
Initial	0	0	0	0
S/16	0.13	0.75	1.5	1.8
S/8	0.25	1.5	3	3.5
S/4	0.5	3	6	7
S/2	1	6	12	14
附加 ^E	18	21
S	2	12	24	28
S+I ^F or S + S/12 ^G	3	13	26	... ^H
U=S+2 ^F or S+S/6 ^G	4	14	28	... ^H
清除阶段				
U+D/4	4.5	17	4.5	35 ^J
U+D/2	5	20	5	42 ^J
U+3D;/r	5.5	23	5.5	49 ^J
U+D	6	26	6	56 ^J

A K_{ow}=辛醇-水分配系数。

B 或更高。

C S=预计表观稳定状态的天数（在这些例子中，S从K_{ow}估算出）。

D U 吸收阶段长。

E 额外中期采样点，使任何两个连续的点多余七天。

F 当S少于12天时。

G 当S在12至24天之间。

H 吸收阶段不超过28天。

D 清除阶段=S的长度。

J D=S=U=28天。

5.5.1.6 吸收时间的选择

吸收时间应该持续至达到表观稳定状态或到了28天，实现表观稳态的标准就是采取适当的间隔的三套样本（鱼的全身及双壳类软体动物的总软组织）的BCFs无显著差异（ $\alpha = 0.05$ ）。

以S表示表观稳定状态的天数。

5.5.1.7 吸收阶段生物体的采样方法

除对照组外，吸收阶段至少有 5 个采样时间点，5 个采样点应接近 $s/16$ ， $S/8$ ， $s/4$ ， $s/2$ 和 s 。经过 $S/4$ 时间，测试样品的浓度不应低于 20%。

5.5.1.8 清除时间的选择—清除阶段应该持续至测试生物体试验动物样品中受试物浓度小于百分之十的稳定状态浓度或低于检出限。

5.5.1.9 清除阶段的生物体抽样方法—除对照组外，清除阶段至少有 4 个采样点，四个取样点依次为 $D/4$ 、 $D/2$ 、 $3D/4$ 和 D 。

5.5.1.10 水样的采样方法—清除阶段采集生物体试验动物样品时，至少采集两个样本，样品的测试溶液也应在清除阶段开始的 24 和 48 小时之前进行收集，并在清除阶段至少每三天收集一次。

5.5.1.11 对照组—对照组生物体试验动物的取样应在清除阶段开始和结束的时候，对照处理的溶液样品也是如此。

5.5.2. 试验

5.5.2.1 将测试生物体试验动物放置在已达到稳定浓度的测试溶液中，客观随机地分布在各试验槽中。鱼至少每天喂食一次，试验槽每天抽吸清洗一次。测试期间每天都应该观察每次处理生物体试验动物后其患病、受扰受刺激、刺痛和其他不利影响等的迹象。

5.5.2.2 试验动物的取样

按要求采集试验动物的样品。鱼样以其不受影响的方式取走，每一次处理使用一个不同的网。鱼样取出后，用蒸馏水漂洗，如有杂质污染需吸干，用解剖针插入大脑杀死或用剪刀切断脊髓以上区域。鱼的重量（体湿需吸干）和标准长度(从鼻尖到尾椎蒂)应该在取样后 15 分钟内测定，如果鱼性成熟，则要确定雌雄。整个身体的分析应在 8 小时完成，否则用适合受试物的方式保存。

双壳类软体动物取样后要测量从壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离。贝壳要通过切断闭壳肌打开，不切开动物，摇动软体动物3次，以消除多余的水，并去除顶部壳。余下的闭壳肌，应从下面壳上所有软组织完好无损地切断拆去除。称重整个软组织，并且在8小时内分析，否则用适合受试物的方式保存。

在鱼类和扇贝测试中，4 个肌肉的样品（有或没有皮肤）或内收肌从其它生物体试验动物的可食性组织中获得，取样时间是在吸收阶段结束时。

鱼性成熟或者有双壳类软体动物产生，应对雄性和雌性的脂肪含量分别测量。对照生物

体试验动物中的脂肪含量以及受试物浓度在吸收开始和结束阶段测定。

如使用放射性受试物质，有时需要分析组织样本。

所有被测试生物体试验动物应该在测试结束时销毁。

5.5.2.3 试验溶液的测量：

5.5.2.3.1 水质—在测量开始时、进行中和完成时需检测稀释水和试验用盐水的硬度、碱度、pH 值和电导率。对照组每周检测一次。盐水的盐度需每天测量。最高测试浓度时的碱度和 pH 值需测定。在双壳类软体动物试验过程中，应该每周测试试验槽中的颗粒物和有机碳总量；如果受试物是一个中性有机化工品，其 log Kow 大于 4，应该每周测量溶解性有机碳。

5.5.2.3.2 温度-温度至少每小时监控一次或者每天测定一次最大和最小温度。此外，测试的开始时、进行中和完成时开始，期间和结束时，在所有的测试槽中必须调节温度。

5.5.2.3.3 受试物：

5.5.2.3.3.1 按要求对溶液中受试物的浓度进行测量。水样应从测试槽中距离顶部、底部和侧面的中间点用滴管或虹吸管或氟烃塑料软管吸取，确保不含有任何液体表面的泡沫或者是从底部或侧面搅起的物质。容器和吸管或虹吸管应该在收集样品前用试验溶液润洗。水样应该收集在合适大小的容器内，以便于受试物可以直接被清除或分析。如果存在于试验溶液的固体颗粒含量大于 5mg/L，需取两个样品，一个样品做上述处理，另一个样品在取样和分析前进行过滤或者离心处理，以确定受试物与固体颗粒相关的百分比。

5.5.2.3.3.2 在吸收阶段期间获得的最高测定含量除以最低值必须小于 2。否则，测量系统应被校正，并且应分析从正常的试验槽得到的其他样品，以确定究竟是抽样不当还是分析方法是不恰当。

5.5.2.4 分析

5.5.2.4.1 除了母材受试物，通常也要测定在水样和组织样品中其他主要产物物质。

5.5.2.4.2 通常在 48 小时的采集时间内对组织样品和水样进行分析。假如样品不能立即分析，它们应该作适当的处理和储存。

5.5.2.4.3 各数据的获取，应尽可能依据相关的国家标准。当测量项目没有相关的国家标准或标准不够充分详细，选取其他可信赖的来源。非离子化的氨浓度可以从 pH、温度和氨的浓度通过计算而得到。

5.5.2.4.5 放射性物质的分析：

5.5.2.4.5.1 当生物富集生物浓缩测试通过放射性同位素标记时，组织样品可以通过使用一种组织增溶剂来制备，以方便计算。不过然而，通常通过燃烧样品后捕获生成的含放射性同位

素标记的二氧化碳，这种方法更为简单。

5.5.2.4.5.2 当生物富集生物浓缩测试通过放射性同位素标记有机物质时，总的放射性应该对所有样品测量。此外，所选的水样和组织样品应该被检测，以确定与杂质、反应和生物降解产物有关的放射性的百分率，这通常用气相或液相色谱的方法。

6 标准主要技术内容的解释

为叙述方便，本标准将试验中所用试剂和材料部分、仪器和设备部分作为附录列在标准中，同时对试验的可接受性规定如下：

当下列一种或多种情况发生时，一个生物富集生物浓缩测试通常应被认为是无效的，除非，例如温度被测量了无数次、只出现高于 6℃ 的一次温差的情况可以例外。但是，如果温度测量只进行了最少允许次数的测量，有一次高于 6℃ 的温差一次温差就可能表明意味着，如果继续进行多次测量，就会有更多的这种温差情况已经被检测了。

6.1 测试进行时，生物体试验动物在防病菌处理或治疗后为防病菌放置时间在 10 天内，或者有机物处理在测试阶段试验开始进行。

6.2 在它们试验动物被放置于试验槽之前，最后的 48 小时内，在测试温度下测试的生动物体不能在稀释的水溶液中喂养至少 48 小时。

6.3 吸收阶段在明显到达平衡态之前或没到达 28 天之前即被终止。

6.4 在任何处理中，超过 10% 的生物体试验动物死亡或者出现明显症状的疾病、受扰受刺激或者其他不良的特征。

6.5 在鱼类的试验中所测的最高和最低测试温度相差超过了 6℃，或者在双壳类软体动物的试验中相差超过了 10℃。

6.6 在任何试验槽中测量溶解氧浓度的加权平均值少于饱和值的 60%。

6.7 在试验溶液中溶液的浓度没有按 5.5.1.10 的要求测试。

6.8 在吸收阶段中，受试物测定的最高浓度达到了同一试验槽中测定的最低浓度的 2 倍以上。

6.9 当使用放射性同位素标记受试物时，水样和组织样品中与杂质相关的放射性百分率并不是通过气相或液相色谱确定的。

6.10 需要对生物体试验动物、和对照试验中的水以及（在对照试验中和食物中的水，中受试物的浓度的显著性影响进行评估。

6.11 所有组织分析结果要立足基于湿组织重量，如果结果基于干组织重量，要确定干湿重量比率。

6.13 每种分析方法的精确值与偏差应该由恰当的基质来决定，即那就是，具有价值的相关的组织，即从含有测试生物体试验动物的稀释水溶液中提取的样品以及食物。在适当的时候，试剂空白、回收率和认证的相关标准应该在分析样品时被考虑。