

附件7

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法（征求意见稿）》
编制说明

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》

标准编制组

二〇二五年九月

项目名称：水质 急性毒性的测定 发光细菌法

项目统一编号：993

承担单位：江苏省常州环境监测中心、中国环境监测总站

编制组主要成员：陈桥、沈丽娟、沈伟、张小琼、金小伟、

潘晨、吴旦、徐东炯、张海燕

生态环境部南京环境科学研究所管理负责人：吉贵祥

生态环境监测司项目负责人：仇鹏

目 录

1 项目背景	1
1.1 任务来源	1
1.2 工作过程	1
2 标准制订的必要性分析	3
2.1 环境毒性物质的危害及理化监测面临的挑战	3
2.2 相关生态环境管理标准和重点工作的需要	3
2.3 相关法律法规要求	5
2.4 现行环境监测分析方法标准的实施情况和存在问题	6
3 国内外相关分析方法研究	7
3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究	7
3.2 国内相关分析方法研究	9
3.3 文献资料研究	11
3.4 国内外分析方法比较及与本标准的关系	12
4 标准制订的基本原则和技术路线	16
4.1 标准制订的基本原则	16
4.2 标准制订的技术路线	17
5 方法研究报告	18
5.1 方法研究的目标	18
5.2 术语和定义	19
5.3 方法原理	21
5.4 试剂和材料	22
5.5 仪器和设备	26
5.6 样品	32
5.7 分析步骤	37
5.8 结果计算与表示	46
5.9 方法特性指标	49
5.10 质量保证和质量控制	53
5.11 测试报告	57
6 方法比对	57
6.1 方法比对方案	57
6.2 方法比对过程及结论	57
7 方法验证	59
7.1 方法验证方案	59
7.2 方法验证过程	60

8 与开题报告的差异说明	62
9 标准征求意见稿技术审查情况	62
10 标准实施建议	62
10.1 支撑生态环境管理方面	62
10.2 监测业务推广应用方面	63
11 参考文献	64
附件一 方法验证报告	68

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法（征求意见稿）》 编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2009年3月16日，原环境保护部印发了《关于开展2009年度国家环境保护标准制修订项目工作的通知》（环办函〔2009〕221号），下达了“《水质 发光细菌抑制作用测定方法》（修订 GB/T 15441—1995）”项目计划，项目统一编号为993，任务承担单位为原常州市环境监测中心站（垂管改革后，于2018年6月更名为江苏省常州环境监测中心）。

2020年10月27日，生态环境部法规与标准司和生态环境监测司在北京组织召开2016年及以前立项标准结题论证会，由江苏省常州环境监测中心继续承担该标准制修订工作，参与单位为中国环境监测总站，标准更名为《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组，开展前期研究及试验

2009年5月～12月，接到本标准编制任务后，承担单位立即组织成立标准方法制修订编制组（以下简称“编制组”）。编制组根据国家环境保护标准制修订工作的相关要求，检索收集了国内外基于发光细菌方法测定水质急性毒性的相关标准和文献资料，梳理该方法在国际上发展、改进和应用情况，分析国内现行标准方法的应用情况及存在的主要问题，结合相关污染物排放标准及环境管理的需求，拟定标准制修订的基本原则和技术路线。2010年1月～10月，编制组进行标准方法制修订工作的前期研究及试验，编写标准草案和开题论证报告。

1.2.2 召开开题论证会

2010年11月，由原环境保护部科技标准司组织专家在北京召开标准开题论证会并通过论证，明确了技术路线、标准编写的内容和方法验证方案，专家提出的具体意见和建议包括：

(1) 方法名称修改为《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》；(2) 标准适用范围包括地表水、地下水、工业废水、生活污水、海水、垃圾渗滤液；(3) 标准文本中增加菌种来源、技术指标要求和适用范围等内容的规范性附录；(4) 明确生物发光光度计的技术规格指标；(5) 通过筛选确定包括氯化汞在内的参考物质；(6) 完善质量保证和质量控制内容；(7) 以参考物质、代表性样品或基体模拟样品开展方法验证，实验室间验证采用统一样品。

1.2.3 开展方法验证试验

2010年12月～2015年4月，根据开题论证意见，编制组按要求深入开展试验研究，确立了标准方法最佳条件参数、参比物与受试菌种的毒性响应关系及质量控制指标等内容，组织了6家实验室进行方法验证，编写完成了《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》标准征求意见稿和编制说明初稿。2015年5月，召开了专家研讨会，形成会议意见如下：（1）编制说明补充国内外相关分析方法中的主要技术内容和指标；完善方法研究报告中的适用范围、试剂和材料、仪器和设备、样品、分析步骤、结果计算、海水样品、QA/QC 和参考物质的研究讨论内容；根据多家实验室验证结果确定 QA/QC 内容；比较现有标准与修订方法的结果与表示的结果；（2）在标准文本中明确菌种及配套试剂质量控制要求、生物发光光度计技术指标；（3）选择1类～2类制药行业排放废水开展实验室内方法验证。随后，编制组根据专家意见开展补充试验研究，进一步完善标准征求意见稿和编制说明。

2025年4月，编制组将本标准制修订进展情况和存在的问题向新调整明确的技术管理单位生态环境部南京环境科学研究所相关负责人进行专题汇报，进一步明确技术路线和方法要求，以明亮发光杆菌T3作为受试菌种，氯化汞作为参比物，同时参考ISO等标准技术方法，完善标准文本及编制说明。2025年5月～6月，根据实验室内研究结果及实验室间验证结果，在总结分析国内外相关标准关键技术参数的基础上，编制组完成了《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（征求意见稿）及编制说明，提交技术管理单位生态环境部南京环境科学研究所审查。

1.2.4 征求意见稿技术审查

2025年7月，生态环境部南京环境科学研究所组织3名专家对标准征求意见稿及编制说明进行函审，主要函审意见和建议总结如下：（1）补充完善生物发光光度计技术要求；（2）补充自制参比物模拟试样LID测定结果，核实实验室间验证数据及重复性限和再现性限的计算方法；（3）补充说明本方法对现有管理的支撑完善，删除仪器供应商等内容，并补充方法推广的现有基础；（4）补充完善方法的干扰消除内容；（5）完善分析步骤、质量控制等内容。标准编制组收到专家函审意见后，立即开展逐条研究和修改，进一步完善了标准文本和编制说明中的相关内容。

2025年8月4日，生态环境部生态环境监测司组织召开了标准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。主要修改意见包括：（1）适用范围明确使用明亮发光杆菌测定水质急性毒性；（2）补充硫酸锌作为参比物以及敏感性测定结果；（3）EC₅₀试验部分补充限度试验相关内容；（4）按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168—2020）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。

会后，编制组立即着手按照专家意见进一步开展补充试验和标准征求意见稿及编制说明的修改完善，具体落实情况如下：（1）在适用范围内明确受试菌种为明亮发光杆菌；（2）在氯化汞的基础之上增加硫酸锌作为参比物，补充开展实验室内和实验室间验证，确定其对明亮发光杆菌T3的敏感响应范围；（3）效应浓度测试部分增加限度试验相关内容；（4）按照HJ 168和HJ 565要求，结合技术审查会专家对文字表述等相关意见，对标准文本及编制说

明进行了系统的编辑性修改。完成初步修改之后，邀请审查专家审核，并进一步修改完善后提交公开征求意见稿。

2 标准制订的必要性分析

2.1 环境毒性物质的危害及理化监测面临的挑战

水环境中的毒性物质具有类型多样、成分复杂、存在相互作用等特点，按照类型可将其分为重金属、非金属无机物质、有机物质等，其中重金属包括毒性危害相对较小的铜、锌等以及毒性危害相对较大的汞、镉、铅等，非金属无机物质包括氰化物、氟化物等，有机物质主要包括石油化工产品及人工合成的有机物质（如杀菌剂、杀虫剂、除草剂、多环芳烃等）。随着化学合成工业的快速发展，有毒有害化学物质的种类进一步日益增多，比如美国化学物质环境管理重要法规《有毒物质控制法》（TSCA）^[1]中所涉及的有毒有害化学物质约有 850 00 种之多，我国生态环境部发布的《中国现有化学物质名录》（2013 版）^[2]就收录了 45612 种化学物质，且每年均有多种新的化学物质不断增补其中。近年来，全氟化合物、抗生素、邻苯二甲酸酯类、氯化石蜡类、多溴二苯醚类等新污染物也逐步受到关注。这些化学物质在水环境中达到一定的浓度时将会产生急性毒性效应，直接影响水质安全和水生生物群落的生长演替等，即使浓度较低时，长期暴露条件下也会产生其他类型的毒性效应，如慢性毒性、遗传毒性等。因此，亟需对水环境中的毒性物质及其环境效应加以重点关注。

如此纷繁复杂的有毒有害物质及其在实际水环境中存在的多种关联作用，这给水环境管理带来了前所未有的挑战。我国目前的水环境管理以污染物指标及其浓度限值管控为主，管控指标的数量总体有限。即使所有检出毒性物质的浓度均较低或者达标，混合后仍可能对水生生物造成显著毒性，不能确保其水质是安全无害的^[3-5]。因此，亟需寻找一种能够高效反映水环境毒性物质影响效应的监测方法，支撑水环境管理提质增效。

生物综合毒性监测技术方法具有综合判断水质毒性效应的特点，可以通过生物急性毒性试验，直观反应水质急性毒性水平，有效补充理化监测在应对海量毒性物质监测方面的短板，为污染排放监管、受纳水体质量评估、饮用水安全、突发污染事故应急处置等方面的水环境管理工作提供支撑。水质发光细菌急性毒性测试方法所需的受试菌种、试剂和仪器设备等均已商品化，获取方便，并且样品测试时间较短，测试所需经济成本相对较低，批量化测试可进一步降低检测成本，具有简便、快速和成本低廉等特点，是开展水环境毒性物质的急性毒性效应测试的理想方法之一，可有效助力水环境毒性物质的监测与管理。

2.2 相关生态环境管理标准和重点工作的需要

2.2.1 环境管理标准的需求

水质综合毒性指标的管控是部分发达国家和地区实施排水管理的主要内容之一，是保障水生态健康的重要支撑。为监控和识别排水中有毒物质对水生态系统的潜在综合影响，一些国家和区域组织采用生物毒性指标评价排水和受纳水体的综合毒性，并建立了生物毒性测试标准规范方法。比如美国、新西兰、韩国采用 WET（whole effluent toxicity，排水综合毒性）^[6]，英国、澳大利亚采用 DTA（direct toxicity assessment，直接毒性评价）^[7]，加拿大采用

EEM (environmental effects monitoring, 环境效应监测) [8]进行排水综合毒性管控; OSPAR (欧洲大陆国家组织《保护东北大西洋海洋环境公约》国家) 和 COHIBA (波罗的海有害物质控制项目国家) 进一步提出了 WEA (whole effluent assessment, 排水综合评价) [4]。一组理想的排水综合毒性测试标准方法的受试生物通常应包含具有代表性的微生物(分解者)、植物(生产者)、无脊椎动物(消费者)和鱼类(消费者) [5,8]。发光细菌毒性便是以微生物作为受试生物的毒性测试方法的代表, 德国、加拿大、OSPAR 及 COHIBA 均在其排水综合毒性测试标准体系中包含了发光细菌毒性测试方法^[5]。长期以来, 我国的水环境管理以理化指标浓度达标管理为主, 近年来虽然呈现出逐步将综合毒性指标纳入废水排放和水生态环境评估管理的趋势, 但是相关监测分析方法支撑体系尚不完善。2008 年, 原环境保护部发布的六个制药行业排放标准首次将发光细菌急性毒性指标纳入我国的污染物排放标准体系, 明确了毒性当量排放限值^[9-14]。《国家水污染物排放标准制订技术导则》(HJ 945.2—2018) 明确要求“对于排放有毒有害水污染物种类较多的行业, 应考虑设置综合毒性指标, 反映排放污水对生态环境的综合影响”。另外, 发光细菌急性毒性也逐步被应用到水生态环境评估之中, 2020 年发布的《生态环境损害鉴定评估技术指南 总纲和关键环节第 2 部分: 损害调查》(GB/T 39791.2—2020) 将发光细菌毒性作为水生态系统损害调查内容之一^[15]。然而, 由于现行国标方法《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB15441—1995) 存在主要试剂材料和仪器设备缺少关键技术控制指标, 样品前处理及测试过程不合理, 结果计算与表征较落后, 质量控制要求不完善等突出问题, 方法可操作性不高, 在制订相关水环境管理标准时, 发光细菌毒性指标或被搁置, 或被取消, 或被已发布标准方法的其他毒性指标取代。因此, 倡导进行系统性修改完善, 制订科学、合理、可操作性较强的发光细菌急性毒性测定标准监测方法, 进一步完善综合毒性测试方法体系, 有效支撑我国水环境管理从单一的浓度管理向兼顾浓度和综合毒性效应管理转变。

国内涉及发光细菌急性毒性的现行污染物排放标准见表 1。

表 1 国内应用发光细菌急性毒性控制的污染物排放标准汇总

编号	排放标准	毒性指标	限值
1	发酵类制药工业水污染物排放标准 (GB 21903—2008)	急性毒性 (HgCl ₂ 毒性当量)	$\leq 0.07 \text{ mg/L}$
2	化学合成类制药工业水污染物排放标准 (GB 21904—2008)		
3	提取类制药工业水污染物排放标准 (GB 21905—2008)		
4	中药类制药工业水污染物排放标准 (GB 21906—2008)		
5	生物工程类制药工业水污染物排放标准 (GB 21907—2008)		
6	混装制剂类制药工业水污染物排放标准 (GB 21908—2008)		

2.2.2 生态环境重点工作的需求

随着我国水环境管理方式的逐步转型升级，除排放标准和水生态环境评估标准外，一些生态环境的重点工作对发光细菌急性毒性也提出了明确需求，在突发污染事故环境应急、重大环境卫生事件监测保障、饮水安全、生态环境科技创新等方面具有广泛的应用前景。其中，在突发污染事故环境应急方面，2020年生态环境部印发的《重特大突发水环境事件应急监测工作规程》（环办监测函〔2020〕553号）^[16]对生物毒性项目提出了要求，为了满足应急监测需要，仪器设备应“优先采用便携式生物毒性分析仪”；另外，为了指导各地生态环境部门加强生态环境应急监测能力建设，生态环境部印发了《生态环境应急监测能力建设指南》（环办监测函〔2020〕597号）^[17]，明确水质生物指标监测设备中需有“生物毒性检测仪”。这些设备便是用于发光细菌毒性测试的主要仪器生物发光光度计。在实际的环境应急监测工作中，也有大量的案例将发光细菌急性毒性作为判断事故范围内水质是否安全的重要依据之一，比如2008年汶川和2010年青海玉树抗震救灾及环境应急监测、2015年天津港爆炸事故应急监测、2017年江苏常州泽源化工火灾事故应急监测、2019年江苏响水天嘉宜化工有限公司“3·21”特大爆炸事故应急监测、2024年安徽滁河突发水质污染事件等。在重大环境卫生事件监测保障方面，发光细菌急性毒性也逐步得到重视和应用，2020年生态环境部印发了《应对新型冠状病毒感染肺炎疫情应急监测方案》^[18]，组织开展发光细菌急性毒性监测。在饮水安全方面，常将发光细菌急性毒性检测作为保障一些重大活动和重大工程饮水安全的手段，比如2008年北京奥运会、2010年广州亚运会及上海世博会饮水安保工作，引滦入津、南水北调等重大工程输水保障等。在生态环境科技创新方面，发光细菌急性毒性的研究和应用需求也日益增加，科技部联合生态环境部、住房和城乡建设部、气象局、林草局印发了《“十四五”生态环境领域科技创新专项规划》（国科发社〔2022〕238号）^[19]，针对工业废水污染防治、新污染物治理等方向对生物毒性技术体系提出了明确需求，包括“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”“发展高通量/高内涵毒性测试技术，构建基于本土生物的毒理测试与毒性通路的多层次整合评估技术体系”等，发光细菌毒性测试方法具有快速、便捷、综合等特点，具有较大的推广应用前景。此外，随着环境管理在风险管控方面的需求日益迫切，“说得清潜在环境风险”是新时期下生态环境保护工作赋予环境监测的新任务新要求，发光细菌毒性测试也具有一定的应用潜力。

2.3 相关法律法规要求

《中华人民共和国环境保护法》第十七条规定“国家建立、健全环境监测制度。国务院环境保护主管部门制定监测规范，会同有关部门组织监测网络，统一规划国家环境质量监测站（点）的设置，建立监测数据共享机制，加强对环境监测的管理”；第三十二条规定“国家加强对大气、水、土壤等的保护，建立和完善相应的调查、监测、评估和修复制度”。《中华人民共和国水污染防治法》第二十五条规定“国家建立水环境质量监测和水污染物排放监测制度。国务院环境保护主管部门负责制定水环境监测规范，统一发布国家水环境状况信息，会同国务院水行政等部门组织监测网络，统一规划国家水环境质量监测站（点）的设置”。《中华人民共和国海洋环境保护法》第二十三条规定“国务院生态环境主管部门负责海洋生态环境监测工作，制定海洋生态环境监测规范和标准并监督实施，组织实施海洋生态环境质

量监测，统一发布国家海洋生态环境状况公报，定期组织对海洋生态环境质量状况进行调查评价”。

因此，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》《中华人民共和国海洋环境保护法》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规范水质发光细菌急性毒性的测定方法，有必要开展水质急性毒性发光细菌法标准的制订。

2.4 现行环境监测分析方法标准的实施情况和存在问题

我国首个利用发光细菌测定水质急性毒性的国家标准《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)^[20]由原国家环境保护局于1995年8月1日颁布实施，对国内水环境毒理学监测技术方法的发展起到了极大的推动作用，为环境管理提供了重要技术支撑。但该标准已施行30年，某些环节显得较陈旧，可操作性低，很多监测单位已经放弃使用该标准方法，与当前的生态环境质量标准、生态环境风险管控标准、污染物排放标准等也不适配，无法有效支撑环境管理需求。

经梳理分析，该标准方法存在如下主要问题：

(1) 受试发光细菌来源及质控指标体系不完善。受试生物是生物毒性实验的基础及关键，其来源及质量对测试结果具有直接的影响。现行标准中对受试菌种的来源和质量方面均缺少系统的质量控制技术指标。

(2) 主要仪器设备未明确关键性能要求。生物发光光度计是水质发光细菌急性毒性测试所需的最为关键的仪器设备，与受试发光细菌具有同等重要的地位，然而由于微弱发光检测无法进行校准检定，缺少统一的性能控制要求。

(3) 样品前处理及测试条件不完善。现行标准中未给出受试发光细菌的pH值最适范围，仅针对部分特定废水进行了pH值调节说明，可操作性低；测试过程中发光细菌测试液的取样量仅10 μL，操作误差较大，容易引起测量结果较大的波动；测试过程中每个样品读取的初始发光强度和终止发光强度并不是同一个发光细菌测试液，忽略了相互之间的差异。

(4) 结果计算与表达方式与技术发展及管理需求不匹配。现行标准中主要以氯化汞毒性当量浓度表征水质急性毒性水平，该结果表示方法在国内外水质毒性监测与评估领域已基本停用，需要补充目前较为常用的最低无效应稀释倍数(lowermost ineffective dilution, LID)和效应浓度(effective concentration, EC_x)等毒性表征指标。此外，标准中给出的浓度效应关系为线性关系，仅针对氯化汞等毒性较强的化学物质或者样品才能成立，不具有普适性。

(5) 质量保证和质量控制不完善。现行标准中仅规定了样品平行偏差和参比物敏感响应范围，缺少对水质急性毒性测试阳性对照、阴性对照等过程控制措施和要求，对受试菌种的稳定性、生物发光光度计技术指标及测试条件等也缺少系统性控制要求。

在《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)的基础之上，结合管理需求和监测技术发展趋势，重新制订生态环境领域的水质发光细菌急性毒性分析方法，将为我国水生态环境安全提供了科学的监测方法依据，同时规范不同实验室、不同监测部门之间的测试方法依据，以提高数据有效性和可比性。本标准的制订，对于提升废水中有毒有害污染物的排放控制和受纳水体环境质量，保护水生态环境安全、健康，具有重要的现实意义。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

3.1.1 国外标准分析方法发展历程

20世纪80年代初，Bulich^[21-22]首先报道了采用发光细菌进行废水毒性商业化检测的可能性，后来发展为成套的发光细菌毒性测试（Microtox Test）技术。目前，经过不断改进和优化，该方法在全球范围被广泛应用。为了支撑“国家污染物减排计划（National Pollutant Discharge Elimination System, NPDES）”，美国国家环保局（USEPA）1994年颁布的“全废水毒性控制方案（Whole Effluent Toxicity Control Policy）”中虽没有将发光细菌毒性测试（Microtox Test）列入正式测试方法，但指出了生物毒性检测是水质控制的重要方面，并且认为该方法可以作为一种毒性筛选试验的手段，是有效的毒性检测方法^[23]。美国材料与试验协会（American Society for Testing and Materials, ASTM）、美国公共卫生协会（American Public Health Association, APHA）和国际标准化组织（International Standard Organization, ISO）等均在发光细菌毒性测试（Microtox Test）技术发展的基础之上制订了相应的标准方法（表2）。ASTM于1996年颁布了《基于海洋发光细菌急性毒性测试的水和土壤化学污染评估标准测试方法》（《Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium, D5660》）^[24]，应用于评价被污染水和土壤修复的效果。该方法分别于2004年、2009年进行了修订，但由于在工业行业使用较少，于2014年撤销（详见撤销公告<https://www.astm.org/DATABASE.CART/WITHDRAWN/D5660.htm>），其制修订过程及其技术参数的演变可为本标准制订提供一定的借鉴。APHA于1999年将发光细菌测试方法（Bacterial Bioluminescence Test, BBT）编入《水和废水标准检测方法（第20版）》（《Standard methods for the examination of water and wastewater, 20nd》），但仅为原则性说明，在随后2005年的21版、2012年的22版以及2017年的23版^[25]对该方法进行了补充完善。1998年，ISO颁布了发光细菌水质急性毒性检测的首个国际标准《水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定》（《Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)》，ISO 11348—1998），该标准依据菌种保存方法的不同分为3个部分：①使用新鲜制备细菌法（Part 1: Method using freshly prepared bacteria）；②使用液体干燥细菌法（Part 2: Method using liquid-dried bacteria）；③使用冻干细菌法（Part 3: Method using freeze-dried bacteria）。自该标准颁布实施后，欧洲一些国家及欧盟均参照ISO标准颁布了其国家和欧盟的标准（表2）。2007年12月，ISO在样品采集与保存、测试条件等方面做出了修订，随后欧盟相关国家标准也相应做出了修订^[26-28]。目前，该方法已经在国际上广泛用于水质生物急性毒性检测。可以发现，国际上ISO方法为水质发光细菌急性毒性测试的主流方法；受试发光细菌虽受微生物命名的变化有所差异，但根据其保藏号可以确定为同一种，即费氏弧菌，最新的拉丁名为*Aliivibrio fischeri*。

表 2 国外水质发光细菌急性毒性测试相关标准及制修订情况

标准制修订主体	标准名称	受试发光细菌	发布及制修订时间
ISO	Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria (ISO 11348 - 3) 水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分：使用冻干细菌法 (ISO 11348 - 3)		1998年首次颁布, 2007年修订
欧盟	Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria (EN ISO 11348 - 3) 水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分：使用冻干细菌法 (EN ISO 11348 - 3)		1998年首次颁布, 2008年修订
德国标准化学会	Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria (DIN EN ISO 11348 - 3) 水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分：使用冻干细菌法 (DIN EN ISO 11348 - 3)	费氏弧菌 <i>Vibrio fischeri</i> (保藏号 NRRL B-11177), 已更名为 <i>Aliivibrio fischeri</i>	1999年首次颁布, 2009年修订
英国标准学会	Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria (BS EN ISO 11348 - 3) 水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分：使用冻干细菌法 (BS EN ISO 11348 - 3)		1999年首次颁布, 2008年修订
法国标准学会	Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria (NF T 90 - 320 - 3) 水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分：使用冻干细菌法 (NF T 90 - 320 - 3)		1999年首次颁布, 2009年修订
APHA	Standard methods for the examination of water and wastewater, method 8050: Bacterial Bioluminescence Test 水和废水标准检测方法, 方法 8050: 发光细菌测试方法	费氏弧菌 <i>Vibrio fischeri</i> (曾用名 明亮发光杆菌, formerly <i>Photobacterium phosphoreum</i>)	1999年首次颁布, 2005年21版修订, 2012年22版修订, 2017年23版修订
ASTM	Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium	名明亮发光杆菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i>	1996年首次颁布, 2004年第一次修订, 2009

标准制修订主体	标准名称	受试发光细菌	发布及制修订时间
	(D5660) 基于海洋发光细菌急性毒性测试的水和土壤化学污染评估标准测试方法 (D5660)	strain NRRL B-11177	年第二次修订， 2014 年取消

3.1.2 国外相关分析方法的应用趋势

随着监测手段的革新及环境管理需求的提升,水质发光细菌急性毒性监测从实验室样品分析逐渐向在线监测技术迅速发展,实现了水质急性毒性的实时、连续、高频监控。欧洲国家的相关技术发展和设备研发相对领先,并广泛应用于欧洲重要水体的水质毒性监控,较为知名的发光细菌在线监测设备包括荷兰的 MicroLAN、以色列的 CheckLight 和比利时的 AppliTek 等。在线设备的广泛应用极大地发挥了水质发光细菌急性毒性测定方法在水质监控预警、污染排放管理、环境应急等方面的重要作用,同时也充分体现了该方法在快速、便捷以及商品化转化等方面的优势。

此外,国际上围绕发光细菌毒性测试方法构建了丰富的毒理学基础数据库,如美国环保署 (United States Environmental Protection Agency, US EPA) 的生物毒性 ECOTOX 数据库 (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>)、《生态毒理学数据手册: 化学品对明亮发光杆菌的生态毒性》(《Handbook of Ecotoxicological Data: Ecotoxicity of Chemicals to *Photobacterium phosphoreum*》^[29]) 以及 TerraBase 公司的毒理数据库 (<http://www.terrabase-inc.com//tbr-6.htm#Pricing>) 等,并且这些数据库在不断更新和完善之中,为生态风险评估、基准和标准的推导及生态环境风险管理提供支撑。

3.2 国内相关分析方法研究

3.2.1 国内分析方法发展历程

国内在水质发光细菌急性毒性方面的研究及应用相对也较广泛(表 3)。现有的国家标准、行业标准、操作规程等主要包括:原国家环境保护局于 1995 年颁布了国标方法《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995);原国家环境保护总局于 2002 年编制出版了《水和废水监测分析方法(第四版)》^[30],分别基于国标方法和国内本土菌种(青海弧菌 Q67)测试方法,介绍了两种发光细菌的急性毒性试验方法;2015 年原国家海洋局参考 ISO 标准颁布了《污水生物毒性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试 费歇尔弧菌法(试行)》(海环字〔2015〕29 号)^[31];2019 年海关总署参考国标方法,制订发布了《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》(SN/T 5103—2019)^[32]。另外,生态环境部于 2020 年立项的生态环境行业标准《水质 综合毒性的测定 现场快速监测发光细菌法》(2020-L-77)正在制订中。

我国部分省份及学会团体等也根据一些特定的应用需求,开展了水质急性毒性方法的制订。已经颁布的省级地方标准主要包括:2017 年台湾颁布了《水样急毒性检测方法 细菌冷光法》(NIEA B301.10C)^[33];2020 年黑龙江省和山东省分别发布了地方标准《水质 生

物毒性的测定 发光细菌快速测定法》(DB23/T 2050—2020)^[34]、《绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法》(DB37/T 4298—2020)^[35]，但是黑龙江省的地方标准目前已废止；2023年河南省发布了地方标准《饮用水水源地水质生物毒性(发光细菌法)在线监测技术规范》(DB41/T 2403—2023)^[36]。已经颁布的学会团体标准包括：2023年上海市环境科学学会、江苏省环境监测协会、浙江省环境监测协会联合发布了《水质 急性毒性 高通量发光细菌测试方法》(T/SSES 6—2023)^[37]；2025年中关村材料试验技术联盟发布了《水质 急性毒性现场快速监测 发光细菌法》(T/CSTM 01433—2025)^[38]。除了毒性测试分析方法，广东省和中国质量检验协会还制订了用于毒性在线测试设备的技术要求，分别为《生物毒性水质自动在线监测仪技术要求 发光细菌法》(DB44/T 1946—2016)^[39]和《发光细菌法水质生物综合毒性在线监测仪技术要求和应用指南》(T/CAQI 188—2021)^[40]。

通过对比国内相关分析方法的主要内容可以发现，其方法参考依据主要分为三类，相关费氏弧菌测试方法主要参考ISO标准，明亮发光杆菌测试方法主要参考国标方法，青海弧菌测试方法使用较少，主要测试过程修改自明亮发光杆菌国标方法。总体而言，国内的方法相对均较简单，在受试发光细菌、生物发光光度计及质量控制和质量保证等方面的具体要求欠缺较多，比如2019年海关总署发布的行业标准方法中仅规定了重复测定结果的相对偏差，未设置阳性参比物质控要求，对测试过程的温度控制也非常宽泛(±5℃)，测试结果仅以相对发光率表示等。

表3 国内水质发光细菌急性毒性测试相关标准及受试发光细菌

标准类型	方法制订主体	标准名称	受试发光细菌
监测分析方法标准	原国家环境保护局	《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)	明亮发光杆菌 T3
	原国家环保总局	《水和废水监测分析方法(第四版)》	明亮发光杆菌 T3 青海弧菌 Q67
	原国家海洋局	《污水生物毒性的监测技术规程 发光细菌急性毒性测试 费歇尔弧菌法(试行)》(海环字〔2015〕29号)	费氏弧菌
	海关总署	《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》(SN/T 5103—2019)	明亮发光杆菌 T3 及其他等效产品
	生态环境部	《水质 综合毒性的测定 现场快速监测发光细菌法》(2020-L-77)，制订中	明亮发光杆菌 T3 费氏弧菌
	台湾	《水样急毒性检测方法 细菌冷光法》(NIEA B301.10C)	费氏弧菌
	黑龙江省	《水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法》(DB23/T 2050—2020)，已废止	青海弧菌 Q67
	山东省	《绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法》(DB37/T 4298—2020)	费氏弧菌
	河南省	《饮用水水源地水质生物毒性(发光细菌法)在线监测技术规范》(DB41/T 2403—2023)	不限
	上海市环境科学学会、江苏省和浙	《水质 急性毒性 高通量发光细菌测试方法》(T/SSES 6—2023、T/JSEMA 3—2023、T/ZJEM	费氏弧菌

标准类型	方法制订主体	标准名称	受试发光细菌
	江省环境监测协会	A 2—2023)	
	中关村材料试验技术联盟	《水质 急性毒性现场快速监测 发光细菌法》(T/CSTM 01433—2025)	明亮发光杆菌 T3 费氏弧菌
仪器设备 标准	广东省	《生物毒性水质自动在线监测仪技术要求 发光细菌法》(DB44/T 1946—2016)	/
	中国质量检验协会	《发光细菌法水质生物综合毒性在线监测仪技术要求和应用指南》(T/CAQI 188—2021)	/

3.2.2 国内相关分析方法的应用趋势

近十年来，发光细菌急性毒性检测在国内的应用范围不断扩大，但是由于国标方法相对陈旧、适用性较差等问题，使用越来越少，甚至被搁置，取而代之的是部分行业、省份及学会团体等纷纷开始相关测试方法的制订（表 3），同时该方法测试过程中最重要的试剂（受试发光细菌）和仪器设备（生物发光光度计）等的生产供应商也愈发增多。其中，受试发光细菌除明亮发光杆菌 T3 (*Photobacterium phosphoreum* sp. strain T3)、费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 和青海弧菌 Q67 (*Vibrio qinghaiensis*) 外，还出现了一些其他菌种（如明亮发光杆菌 502）；菌种保存状态主要包括用于现场和实验室分析用的冻干粉和在线监测用的新鲜培养菌等。生物发光光度计包括用于现场监测的便携式设备（较轻便、功能相对简单）、用于室内分析或研究工作的实验室设备（功能相对较多，包括温控、数据统计分析等功能）和用于水质监控预警的在线设备（功能较复杂，包括样品采集、处理和测试及菌种培养等）等类型。可以发现，国内的方法、重要试剂及仪器设备总体呈现“百花齐放”状态，但是由于缺乏科学、系统的性能指标和质量控制要求，用户在实际工作中对仪器设备和试剂的选择和使用方面通常无据可依，很难甄别其优劣状态，导致不同实验室、不同设备、不同受试发光细菌条件下测试结果可比性存疑，不利于水质发光细菌急性毒性测试技术在国内的广泛应用和长远发展。

3.3 文献资料研究

自 1672 年 Boyle 首次观察到发光的菌体在化学毒性物质的作用下，其发光强度会受影响之后，许多科学家便相继开展了大量的研究。1981 年 Bulich 等首先采用发光细菌进行废水毒性的商业化检测，开发出成套的发光细菌毒性测试（Microtox Test）方法^[21-22]，后来逐步发展完善为国际主流方法，并制订了 ISO 标准等，在国内外得到广泛应用。研究发现，发光细菌急性毒性测定法适用范围较广，可适用于类型多样的样品，如地表水和地下水样品^[41]、复杂废水^[42]、城市污水和沉积物^[43-44]等。美国将其应用于自然公园水质毒性及工业区废水毒性去除情况的研究，之后该技术在世界范围内得到了广泛的应用^[45-46]。随着生物综合毒性在国内环境监测中日益重视，发光细菌急性毒性在工业废水^[47-48]、城市污水^[49-50]、饮用水^[51-52]、水质污染突发事件^[53-54]的快速应急监测等方面得到广泛应用。很多学者在我国发光细菌毒性检测方法的改进和完善方面进行了深入的研究^[55-57]。比如王丽莎等^[58]对参比物进行

了重新筛选，对测试条件进行了优化；彭方毅^[59]、郑小燕等^[60-61]分别对菌种冷冻干燥条件和冷藏技术对活性的影响进行了研究；王娜等^[62]探讨了菌种细胞密度对测试的影响；孙成华等^[63]选取不同类型的环境和污染源水样开展了发光细菌毒性测试，针对不同环境管理目标，探讨了急性毒性定量表征方式；何发明等^[64]探讨了发光细菌毒性参照物的替代及坯革生态安全性的评价；林建辉等^[65]探讨了明亮发光杆菌毒性测定的不确定性及改进方法。另外，利用细菌发光特性，国内学者利用基因编辑技术和人工“重建”离体发光系统方法将细菌发光技术应用到其他检测领域^[66-67]。

3.4 国内外分析方法比较及与本标准的关系

根据以上对国内外分析方法和文献资料的研究分析，水质发光细菌急性毒性的测定在国际上已经是较为成熟的方法，可以为国内标准方法制修订提供重要参考依据和借鉴。比较 ISO、ASTM 和 APHA 等方法，ISO 标准在方法内容要素和技术细节方面相对较完善，适用范围广，可操作性强。因此，本标准将在借鉴 ISO 标准基础上，结合国标方法实施情况，在其基础之上重点完善样品采集与保存、干扰消除、测试步骤、结果计算和表示、质量控制与保证等关键技术环节，提出受试发光细菌、生物发光光度计等重要试剂及仪器设备的技术控制指标，相关方法主要技术内容的比较及其与本标准的关系见表 4 和图 1。

表 4 国内外相关方法主要技术内容比较及与本标准的关系

要素		ISO 11348—3—2007	GB/T 15441—1995	本标准方法
适用范围		地表水、地下水、废水、海水、咸水、孔隙水、浸提液和渗滤液、沉积物洗脱液、可溶于水的单一物质	工业废水、纳污水体及实验室条件下可溶性化学物质	地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水
样品容器		参照 ISO 5667-16-2017, 惰性材料、干净的容器(如聚丙烯、聚四氟乙烯、聚乙烯材质), 满瓶密封	带有聚四氟乙烯衬垫的玻璃瓶, 满瓶密封。	棕色磨口具塞玻璃瓶, 或聚乙烯、聚丙烯、聚四氟乙烯材质的塑料瓶, 容积 $\geq 250\text{ mL}$
样品保存		尽快分析, 48 h 内 2 °C~5 °C 避光冷藏, $\leq -18\text{ °C}$ 冷冻保存不超过 2 个月, 不加任何固定剂	6 h 内分析, 否则 2~5 °C 保存, 但不超过 24 h	2 °C~8 °C 冷藏避光保存, 并在 48 h 内开展测试; 如需长期保存, 将样品混匀后按每 500 mL 容量盛装 250 mL~350 mL 的量分装, 并立即置于冰箱或冷库中冷冻($\leq -18\text{ °C}$)保存, 保存期不超过 2 个月
干扰和消除	浊度	静置 1 h 或离心(5000 g, 10 min) 或过滤	离心或过滤	静置(1 h)或离心(5000 g, 10 min)
	颜色	套管, 基于朗伯比尔定律	通过套管校正, 测定样品颜色对发光细菌测试液发光强度的影响, 以此校正实际样品的初始发光强度 $\Delta L = L_1(\text{CK 管}) - L_2(\text{样品管})$	沿用原国标方法, 略做调整, 包括: (1) 增加平行测定, (2) CK 套管和样品套管中用于校正测定的发光细菌测试液使用同一个内管, 与测试步骤的修改保持一致
样品预处理	溶解氧	待测样品溶解氧需 $>3.0\text{ mg/L}$, 否则需要复氧后测定	测定包括溶解氧影响在内的急性毒性	通常不调节样品溶解氧浓度。若需排除溶解氧的影响, 可采用缓慢搅拌的方式充氧, 使样品溶解氧浓度 $\geq 3.0\text{ mg/L}$
	pH	样品 pH 需介于 6.0~8.5, 否则需使用 HCl 或 NaOH 调节, 分别测定调节前后的结果	测定包括 pH 影响在内的急性毒性, 不需调节; 若须排除 pH 影响, 主要含 Cu 水样调至 4.5, 主要含其他金属水样调至 5.4, 主要含有机化合物水样调至 7.0	通常不调节样品 pH 值; 若需排除 pH 的影响, 调节样品 pH 值至 7.0 ± 0.2 , 海水样品 pH 值调节至 7.5 ± 0.2

要素		ISO 11348—3—2007	GB/T 15441—1995	本标准方法
	盐度	调节待测样品盐度相当于 20 g/l NaCl 溶液, 最高不超过 35 g/l NaCl 溶液水平	加入 NaCl 使其浓度达到 3g/100 mL 浓度	当盐度<30 时, 用氯化钠调节样品盐度至 30±2; 海水样品通常不调节盐度, 当盐度<30 时, 用氯化钠调节样品盐度至 30±2
受试菌种	菌种	费氏弧菌 (NRRL B-11177)	明亮发光杆菌 T3	明亮发光杆菌 T3 (<i>Photobacterium phosphoreum</i> s. p. strain T3, CGMCC 1.61989 或其他等同菌株)
	冻干粉保藏温度	-18 ~ -20 °C	2 ~ 5 °C	-18 °C~ -20 °C
	数量	冻干粉活化后, 发光细菌储备液 (stock suspension) 细胞密度约 10 ⁸ cells/mL, 测试液 (test suspension) 细胞密度约 10 ⁶ cells/mL	新鲜制备的冻干粉不低于 8.0×10 ⁶ cells/g, 菌液不低于 1.6×10 ⁴ cells/mL (5 mL 测试管) 或 2.0×10 ⁴ cells/mL (2 mL 测试管)	冻干粉复苏、稀释后, 发光细菌测试液 II 的初始细胞密度约为 10 ⁴ cells/mL
	稳定性	反应 15min 或 30min, 空白的相对发光变化系数 \bar{f}_{kt} 介于 0.6~1.8	4 h 的 CK 发光量应 ≥ 400mV	反应时间 15 min 的校正因子应符合 $0.6 \leq \bar{f}_{kt} \leq 1.8$
	敏感性	每一批次菌种验收需同时满足: 暴露于 3.4 mg/L 3,5-二氯酚、2.2 mg/L Zn ²⁺ 、18.7 mg/L Cr ⁶⁺ 溶液中 30 min 引起 20%~80% 发光抑制率	氯化汞 15min EC ₅₀ = 0.10 mg/L ± 0.02 mg/L	氯化汞 15min EC ₅₀ = 0.10 mg/L ± 0.02 mg/L; 阳性对照 (氯化汞终浓度 0.10 mg/L 或 Zn ²⁺ 终浓度 1.4 mg/L) 的发光抑制率介于 20%~80%
生物发光光度计		温控 (欧美国家主流仪器较统一)	0.10 mg/L 氯化汞 15 min 的相对发光度 50% 左右, 其误差不超过 ±10%	温控 (若不具备, 温控功能, 应另外配备符合控温条件的仪器设备); 背景噪声值; 发光强度测量重复性; 有效测定光谱范围
测试条件	菌种活化温度	4 °C ± 3 °C	置有冰块的小号保温瓶	4 °C ± 3 °C
	样品测试温度	15 °C ± 1 °C	20 °C~25 °C, 波动不超过 ±1 °C	20 °C~25 °C, 波动不超过 ±1 °C
	反应时间	5 min、15 min 和 30 min	15 min	15 min, 也可同步测定 5 min 和 30 min
结果计算与表达	发光抑制率(或相对发光率)	使用校正因子修正试样测试管的初始发光强度, 通过初始和反应终止发光强度计算, 初始和反应终止发光强度测定的是同一测试管	每个试样均设置一个空白对照, 反应一定时间后, 将空白对照的发光强度作为初始发光强度, 试样的发光强度作为终止发光强度, 即初始和反应终止发光强度测定的并非同一测试管	使用校正因子修正试样测试管的初始发光强度, 通过初始和反应终止发光强度计算, 初始和反应终止发光强度测定的是同一测试管

要素		ISO 11348—3—2007	GB/T 15441—1995	本标准方法
剂量效应关系		对数线性关系，也可使用概率单位分析、逻辑斯蒂分析等其他非线性回归方法	管 线性关系	对数线性关系，也可使用采用概率单位分析、逻辑斯蒂分析等非线性回归方法计算
	结果表达	发光抑制率（或相对发光率）； 最低无效应稀释倍数（LID）； 效应浓度（EC）	相对发光度（或相对抑制率）； 参比物氯化汞毒性当量浓度； EC_{50}	发光抑制率（相对发光率）； 参比物氯化汞毒性当量浓度； 最低无效应稀释倍数（LID）； 效应浓度（EC）
质量控制（过程控制）	测试过程	用于计算待测试样最低无效应稀释倍数（LID）或效应浓度（EC）的发光抑制率的偏差不超过 3 个百分点；暴露于 3.4 mg/L 3,5-二氯酚、2.2 mg/L Zn^{2+} 、18.7 mg/L Cr^{6+} 溶液中 30 min 引起 20%~80% 发光抑制率	样品 3 次测定结果的相对偏差应不大于 15%	阳性对照（氯化汞终浓度 0.10 mg/L 或 Zn^{2+} 终浓度 1.4 mg/L）的发光抑制率应符合 $20\% \leq H \leq 80\%$ ； 阴性对照的发光抑制率应符合 $-10\% \leq H \leq 10\%$ ； 相对发光率或发光抑制率平行测定结果的相对偏差应 $\leq 15\%$

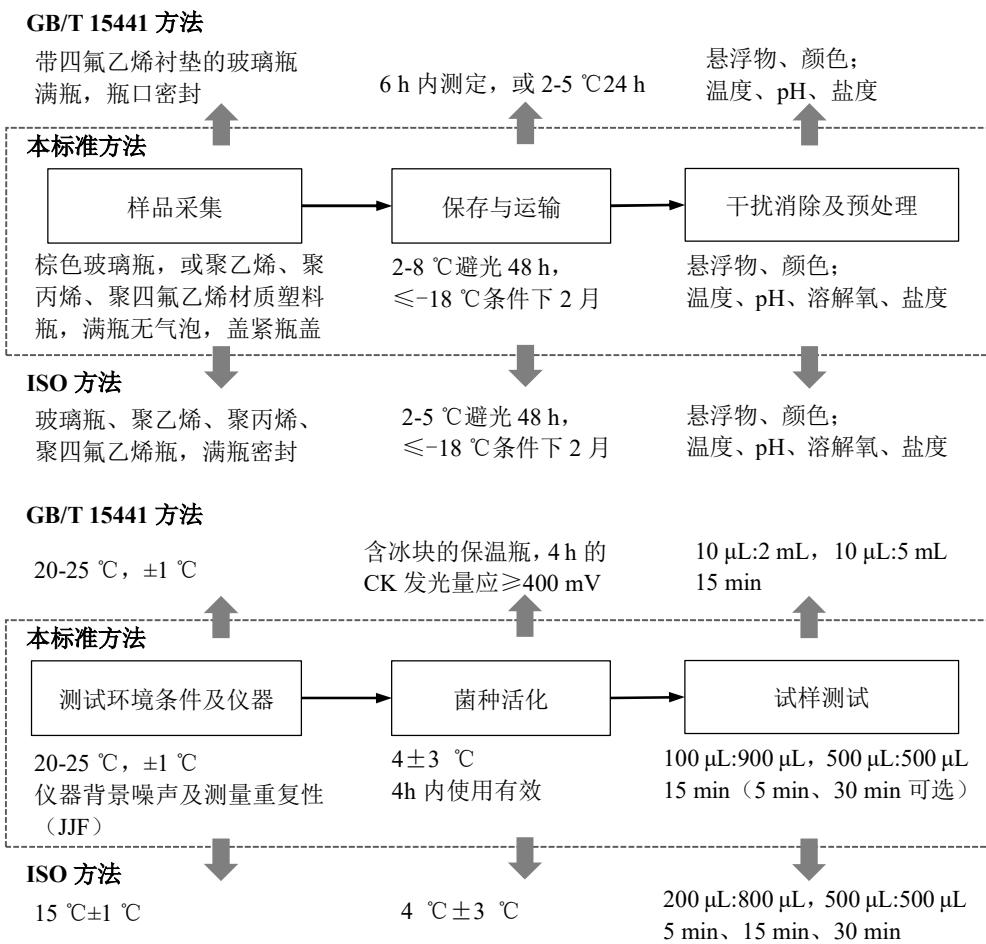


图 1 国内外相关分析方法主要技术流程比较

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

依据《生态环境标准管理办法》(生态环境部令〔2020〕17号)、《国家生态环境标准制修订工作规则》(国环规法规〔2020〕4号)和《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)等相关要求, 本标准制订以国内外最新的标准方法和相关文献研究成果为编制基础, 同时结合国内生态环境监测机构现有技术能力、管理水平、经济条件的区域差异等实际情况, 确保所编制的标准方法能够在全国范围内推广应用。

本标准制订主要遵循基本原则如下:

(1) 能够支撑管理。方法性能及结果表示方式等能够满足污染物排放标准(包括表1中的相关标准及正在修订的相关排放标准等)和生态环境环保相关工作要求。

(2) 方法准确可靠。根据国内外的技术方法发展情况, 对《水质 急性毒性的测定发光细菌法》(GB/T 15441—1995)进行全面的技术修正和完善, 筛选、优化和明确各试验环节条件参数, 完善受试发光细菌和生物发光光度计技术控制要求、样品采集与保存、干扰消除、分析步骤、结果计算以及质量保证与质量控制等各技术环节, 提高方法性能和结果可

比性，为相关管理标准制修订和环境监管工作的开展奠定准确可靠的分析方法基础。

(3) 方法普适可用。方法原理科学合理、取材方便、操作简明，易于推广使用，具有普遍适用性，适合我国各级生态环境监测机构开展日常检测工作。

(4) 方法国际接轨。方法制订需要兼顾技术先进性，测试过程、结果计算与表示等方面在一定程度上能够接轨国际主流方法，也为标准的持续改进作铺垫。

4.2 标准制订的技术路线

基于国内外相关分析方法的比较分析以及在开题论证、技术审查和专题研讨专家意见等的指导下，在满足 HJ 168—2020 中环境监测分析方法标准制修订工作通用要求的基础上，充分考虑现行国标的应用情况、存在的问题（2.4）、国内外技术进展（3.1-3.3）、目前我国环境监测的技术经济水平以及与管理标准的衔接等，开展标准制订工作，筛选、优化和明确各试验环节条件参数，重点完善受试发光细菌和生物发光光度计技术控制要求、样品采集与保存、干扰消除、分析步骤、结果计算与表示以及质量保证与质量控制等关键技术环节，提出科学、合理、可行的方法性能指标。本标准制订过程中，一些技术参数、条件等的筛选和确定将以 ISO 11348—3—2007 标准为重要参考依据。

新制订的标准在充分满足相关法律法规、生态环境保护管理标准及环境管理工作需求的前提下，在试验操作方面将体现更加趋于简便、快捷的特点，同时构建完善的质量控制体系，使结果计算和表征更加科学、可靠。目前，国内许多 2、3 级监测站配备了生物发光光度计等仪器设备和相关试剂，在实验操作等技术环节方面，只要进行针对性的培训便可以开展水质发光细菌急性毒性的检测工作，相对于其他毒性试验（如藻类、鱼类）周期长、人员专业背景和素质要求高、实验室条件要求高等特点，本方法具有一定优势，因此，标准制订后在国内生态环境行业具有较好的推广应用前景，为推动我国水质急性毒性监测技术的发展和管理应用提供了较好的支撑。

本标准制订技术路线见图 2。

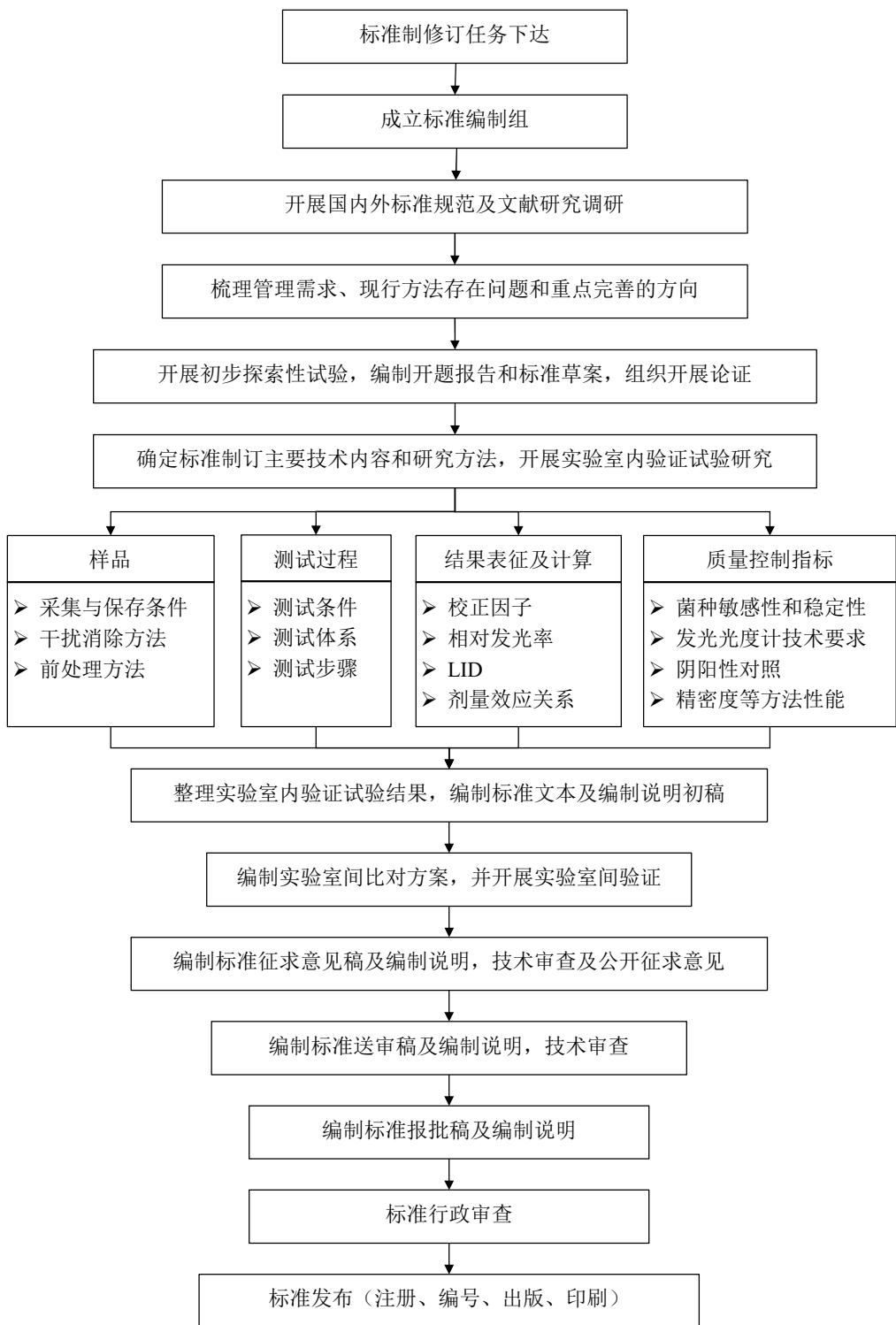


图 2 技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

(1) 本标准适用的环境要素、被测目标物

根据开题论证审查意见,本标准规定了水质急性毒性测定的发光细菌法,适用于地表水、地下水、工业废水、生活污水、海水、垃圾渗滤液的急性毒性测定。然而,由于垃圾的行政主管部门已变更为住房城乡建设部门,并且2024年修订的国家标准《生活垃圾填埋场污染控制标准》(GB 16889—2024)中直接排放和间接排放控制指标均未涉及水质毒性相关指标,因此将原适用范围中的垃圾渗滤液从本标准中予以去除。

(2) 本标准测定指标为发光细菌急性毒性的依据和理由

水质测定方法总体可以划分为理化方法和生物方法两大类,其中理化方法主要是针对物质浓度开展“量”的分析,而生物方法主要是针对污染等水环境压力“效应”的分析,两者互为补充,在国际上已得到广泛应用。水质发光细菌急性毒性检测操作简便,响应快速灵敏,并且测试成本以及对环境设施条件要求不高,广泛应用于国内突发污染事故环境应急、重大环境卫生事件监测保障、饮水安全保障等方面,可有效助力我国水环境管理提质增效。

国标方法《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)制订较早,已不能适应当前技术发展和管理需求。本标准在国标方法的基础之上,充分借鉴国际上主流的ISO标准方法相关内容,重点完善样品采集与保存、干扰消除、测试步骤、结果计算和表达、质量控制与保证等关键技术环节,提出受试发光细菌、生物发光光度计等重要试剂及仪器设备的技术控制指标,使方法测试过程更加科学、规范、简练,更加贴合环境管理的需求。

(3) 本标准拟达到的技术要求

本标准测定的并非是某一特定污染物质的“量”,而是待测试样对受试发光细菌的急性毒性效应,不适用于“检出限”“测定范围”等概念。

水质发光细菌急性毒性试验的方法性能适宜于用精密度来衡量,由于本方法毒性测定的基础结果为相对发光率,其他结果表征包括毒性当量浓度、最低无效应稀释倍数(LID)和效应浓度(EC_x)均是基于试样的相对发光率计算而得,因此,相对发光率平行测定的精密度对本方法毒性测定结果具有直接且重要的影响,可继续沿用GB15441—1995国标方法对相对发光率“平行测定结果的相对偏差不大于15%”的总体要求。同时,考虑到相对发光率在低值时的离散程度较大,高值时则离散程度较小,因此对任意试样相对发光率的平行测定给出统一的精密度控制要求并不可行。由于同一个试样同一次测定的相对发光率和发光抑制率为互补关系(两者之和为100%),避免高低值对精密度计算的影响,本方法将其修改完善为“相对发光率或发光抑制率平行测定结果的相对偏差应≤15%”,即两者之一的精密度满足要求即可。

毒性测试方法不宜使用准确度作为方法性能的指标,通常使用阴性对照(空白试样)和阳性对照(参比物溶液)是否满足正常分布区间对方法的有效性和敏感性进行质控控制,试验验证确定阴性对照的发光抑制率应符合-10%≤H_t≤10%,阳性对照(氯化汞终浓度0.10 mg/L或Zn²⁺终浓度1.4 mg/L)的发光抑制率应符合20%≤H_t≤80%,参比物氯化汞的15 min EC₅₀应在0.08 mg/L~0.12 mg/L范围内。

5.2 术语和定义

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)无此部分内容,按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)相关要求,对本标准涉及到的专用术

语加以定义说明，标准文本中增加相应内容。

(1) 试样 test sample

本标准中多处涉及“样品”和“试样”，为统一规范表述，同时明确二者之间的区别，参考《水质 词汇》(《Water quality — Vocabulary》，ISO 6107—2021) 第3节 3.563 和《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020) 第3节 3.14，增加了术语“试样 test sample”，并根据标准内容明确其定义，即“样品经稀释液稀释配成的可供测试的溶液”，当样品直接用于测试时，试样即为样品。本标准中，当直接且仅测定地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水样品时，统一表述为“样品”；当不仅要测定样品，还需要对样品进行稀释测定，或者还需测定其他模拟样（比如实验室间验证样品、参比物系列浓度溶液等）等多类型样品时，统一表述为“试样”。

(2) 相对发光率 relative luminescence rate (T_r)

本标准是以待测试样对受试发光细菌发光强度的变化影响来判断急性毒性水平，参考《水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分：使用冻干细菌法》(《Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria》，ISO 11348—3—2007) 关于相对发光率的计算和描述，将其定义为“受试发光细菌与试样反应一定时间后，其发光强度与反应前的初始发光强度（经校正）的比值，以百分数表示”。

(3) 发光抑制率 luminescence inhibition rate (H_i)

同一个试样同一次测定的发光抑制率和相对发光率之和为 100%，将其定义为“受试发光细菌与试样反应一定时间后，其发光强度的降低量与反应前的初始发光强度（经校正）的比值，以百分数表示”。

(4) 校正因子 correction factor (f_{kt})

发光细菌的发光强度会随时间变化而发生一定的变化，为了在实际测试过程中排除这种背景变化，客观反映待测试样的急性毒性效应，因此需要“校正因子”对这种变化予以修正。参考《水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分：使用冻干细菌法》(《Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria》，ISO 11348—3—2007) 中“9.1 发光细菌抑制作用 (9.1 inhibitory effect on luminescent bacteria)” 对“校正因子 (correction factor)” 的描述 “该因子用于校正待测样品的初始发光强度，并将其用作测定因水质毒性导致发光强度降低的参考值 (This factor serves to correct the initial values I_0 of all test samples before they can be used as reference values for the determination of the water-dependent decrease in luminescence.)”，结合本标准实际，将“校正因子”定义为：“受试发光细菌与空白对照反应一定时间后，其发光强度与反应前的初始发光强度的比值”。

(5) 效应浓度 effective concentration (EC_x)

参考《水质 样品采集 第16部分：生物检测样品指南》(《Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples》，ISO 5667—16—2017) 中对“效应浓度”的定义“在规定的时间内引起 x% 响应变化的水中或沉积物中的试料浓度 (concentration of the test material in water or sediment that causes x % change in response during a specified time

interval)”, 结合本标准实际情况, 将“效应浓度”定义为“在规定条件的测试周期内, 受试发光细菌发光抑制率为x%时所对应的试样浓度”。例如, 发光抑制率达到50%时所对应的试样浓度为EC₅₀(半数效应浓度)。

(6) 最低无效应稀释倍数 lowest ineffective dilution (LID)

参考《水质 费氏弧菌发光抑制作用的测定 第3部分: 使用冻干细菌法》(《Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibri fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria》, ISO 11348—3—2007)附录B中对“最低无效应稀释倍数”的定义“当采用逐级稀释法检测废水样品时, 未观察到抑制作用或仅观察到不超过临界值的轻微影响的最高浓度即为最低无效应稀释(When testing waste water by means of a graduated dilution (D), the most concentrated test batch tested at which no inhibition, or only minor effects not exceeding the test-specific variability, were observed is expressed as Lowest Ineffective Dilution)”、“平均抑制率<20%对应的最低稀释倍数即为LID(The lowest D-value tested, at which the mean inhibitory effect $\overline{H}_{30} < 20\%$, is called LID_{lb})”, 将最低无效应稀释倍数定义为“在规定条件的测试周期内, 受试发光细菌发光抑制率<20%时的最低稀释倍数”。

(7) 参比(毒)物 reference toxicants; reference materials

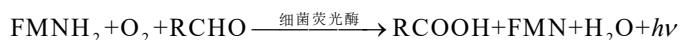
参考《水质 样品采集 第16部分: 生物检测样品指南》(《Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples》, ISO 5667—16—2017)中3.14对其的定义“用于验证方法敏感性的已知物质(known substance to verify the sensitivity of the method)”, 本标准将其定义为:“为判断测试系统有效性而使用的化学物质。可用于不同实验室之间, 同一实验室内部不同时间或不同人员之间测定结果的可比性评价”。本标准简称参比物, 选用氯化汞或硫酸锌为参比物, 一方面为了保证与现行六个制药行业废水排放标准的衔接(表1, 将氯化汞毒性当量浓度作为毒性控制指标), 另一方面也考虑逐步与国际标准的衔接, 用以衡量测试过程的敏感性和有效性。

5.3 方法原理

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)无此部分内容, 仅有“2方法提要”部分, 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)相关要求, “方法原理”为必备要素, 因此, 增加相应内容。主要从两方面阐述:①发光细菌发光机理, 参考朱文杰等研究成果及描述^[66]; ②发光细菌发光情况与水质急性毒性的胁迫响应关系。将方法原理内容整理、描述如下:

发光细菌体内细菌荧光酶催化还原型的黄素单核苷酸及长链脂肪醛发生氧化, 并放出光子, 发出在避光条件下肉眼可见的蓝绿光。在规定的测试条件下, 将受试发光细菌与不同稀释倍数的试样反应15 min, 根据发光抑制率计算氯化汞毒性当量浓度、LID或EC₅₀, 以表征样品的急性毒性。

发光细菌发光过程的简略反应方程式为:



5.4 试剂和材料

在 GB/T 15441—1995 中“3 试剂和材料”的基础上，依据 HJ 168—2020 对于“7.11 试剂和材料”的要求，对相关内容进行重新梳理，并根据实验要求做相应调整。

5.4.1 受试发光细菌

受试生物是毒性试验的关键试剂材料，对测试结果具有直接且重要的影响。根据开题论证会专家意见，须增加受试发光细菌菌种来源、技术指标要求和适用范围等内容。

(1) 受试发光细菌菌种溯源体系的建立及保存要求。为保证与现行六个制药行业废水排放标准（表 1）的衔接，本标准受试发光细菌仍选用“明亮发光杆菌 T3 小种 (*Photobacterium phosphoreum* T3 spp.)”。该菌种最早由 GB/T 15441—1995 的制订单位中国科学院南京土壤研究所引进国内、商品化开发和保存，但是一直未将其送至国内权威的菌种保藏中心进行登记保藏，国内不同供应商的菌种来源和质量无法得到保证，给广大方法用户造成较大困扰，影响了方法的使用和推广。本标准编制组与中国科学院南京土壤研究所积极沟通并得到大力支持，推进落实了菌种保藏工作。2024 年 7 月 30 日，该菌种被正式保藏至中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（China General Microbiological Culture Collection Center，简称 CGMCC），并获得了菌种保藏号 CGMCC 1.61989（图 3），为受试发光细菌的溯源提供了重要支撑。同时，为了避免产生“单一来源”等错误理解带来的执行风险，本标准增加了“其他等同菌株”的要求，即能够证明制作受试发光细菌冻干粉的菌株与 CGMCC 1.61989 为同一种即可，而不是要求必须来自于 CGMCC。因此，本标准关于受试发光细菌菌株的要求主要是为了规范“是什么”，而不是“从哪里来”，能够满足相关技术要求的菌种均可用于试验测试。由于 GB/T 15441—1995 对菌种中文名和拉丁名的表述并不规范，根据菌种保藏证明将其修改为“明亮发光杆菌 T3 (*Photobacterium phosphoreum* sp. strain T3)”（图 3）。本标准受试发光细菌的保存状态为冻干粉，保存条件参考 ISO 11348—3—2007 要求，-18 ℃～-20 ℃避光冷冻保存，有效期参考 GB/T 15441—1995 为 6 个月。此外，菌种的活性受生产工艺、保存运输条件等多种因素影响，市售商品应提供菌种来源、生产批次、生产日期、规格、保存条件及保质期等信息，按要求保存即可。但是，菌种在有效期内，并不表示其毒性测试结果一定有效，仍需按质量保证和质量控制中的相关要求进行判断。

中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)

Address: Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Datun Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China
Telephone: 86-10-64807355 Fax: 86-10-64807288 E-mail: cgmcc@im.ac.cn Homepage: www.cgmcc.net

保藏证明 CERTIFICATION OF DEPOSIT	CGMCC <u>1.61989</u>
----------------------------------	----------------------

1. Name and address of the depositor or agent

Jun Zeng
The Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences
No.298 Chuangyou Road, Jiangning District, Nanjing, China

2. Strain reference given by depositor

T3

3. Deposited microorganisms appended

- Scientific description
 Proposed taxonomic name
Photobacterium phosphoreum

4. The deposited microorganism has been received and numbered as CGMCC 1.61989
on July, 2024. The strain has been checked for viability in the CGMCC and is stored
using one of the standard methods used in the CGMCC.

5. This strain is available in the public accessible section of the CGMCC and restrictions have
not been placed on access. It will be included in the published and online catalogue after
publication of this number by the authors.

Signature of Director of CGMCC Yajing YU

Date July 30, 2024



图 3 明亮发光杆菌 T3 菌种保藏证明（中国微生物菌种保藏管委会普通微生物中心）

(2) 受试发光细菌冻干粉表观性状要求。冻干粉应真空密闭包装完好，呈白色粉末状，加入 ρ (NaCl) = 25 g/L 冷的氯化钠溶液复苏后，应迅速溶解，呈乳白色，无明显悬浮颗粒物。

(3) 受试发光细菌细胞密度量级要求。为了保证测试结果的可比性和有效性，明确受试生物的数量是毒性测试的重要条件之一，ISO 11348—3—2007 和 GB/T 15441—1995 均对受试发光细菌冻干粉按要求制成测试工作液后的细胞密度提出了要求，如 ISO11348—3—2007 中要求“复苏后的发光细菌菌悬液细胞浓度约为 10⁸ 个/毫升 (the reconstituted luminescent bacteria suspension cell concentration about 10⁸ cells per milliliter)”，GB/T 15441—1995 中要求“稀释成工作液后每毫升菌液不低于 1.6 万个细胞或 2 万个细胞”。不同来源的受试发光细菌冻干粉在首次使用之前，应随机抽取其中至少 1 个冻干粉样本，打开装有发光细菌冻干粉的包装瓶，按每 0.5 g 冻干粉 1 mL 的比例，用移液器移取一定体积预冷的 ρ (NaCl) = 25 g/L 氯化钠溶液并快速注入冻干粉瓶中，充分混匀形成复苏液，将复苏液和 ρ (NaCl) = 30 g/L 氯化钠溶液按 1: 99 比例进行混合，制成测试液。本标准参考 ISO 11348—3—2007 关于受试发光细菌测试液细胞密度的表示方法，明确前述测试液的初始细胞密度约为 10⁴ 个/mL，与 GB/T 15441—1995 为同一量级水平。

为了便于试验人员测定本实验室受试发光细菌测试液的细胞密度，对冻干粉进行验收确认，本标准增加了“发光细菌菌液细胞密度计数方法”资料性附录。具体内容如下：

稀释涂布平皿计数法是微生物数量测定的常用方法。将不同稀释倍数的发光细菌菌液样品涂布接种在固体培养基上，在特定的物理条件下培养，单细胞会生长繁殖成肉眼可见的菌落，从而计算出原菌液中的细胞密度。

➤ 试剂

明亮发光杆菌培养基。将 30 g 氯化钠、5 g 磷酸氢二钠、1 g 磷酸二氢钾、5 g 酵母浸出汁、5 g 胨蛋白胨、7 g 甘油、17 g 琼脂溶解于 1000 mL 水中，分装于玻璃容器中，经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，储存于冷暗处备用。在 5 °C±3 °C 冷藏避光条件下，保存时间不超过 1 个月。也可购买含上述成分的市售成品，按要求保存。

无菌复苏液。称取 2.5 g 氯化钠，溶于少量水中，用水定容至 100 mL。经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

无菌稀释液。称取 3 g 氯化钠，溶于少量水中，用水定容至 100 mL。经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

➤ 仪器设备

高压蒸汽灭菌器。

恒温培养箱：温度可调，温度控制偏差≤1 °C。

无菌涂布棒。

无菌平皿。

实验室常用玻璃器皿：移液管、试管等，使用前按无菌操作要求包扎，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。

➤ 分析步骤

平板制备：将灭菌后的培养基冷却至 50 °C~55 °C，倒入无菌平皿中，每个平皿约 25 mL。待培养基冷却凝固后，翻转平皿，使底面向上，放在室温无污染处备用。

冻干粉复苏：以无菌操作方式，按每 0.5 g 冻干粉 1 mL 的比例，往受试发光细菌冻干粉管内加入一定体积预冷的无菌复苏液。用力振摇 20 次~25 次，使可能存在的细菌凝团分散。

稀释：以无菌操作方式移取 100 μL 复苏后的菌液，加入盛有 9.9 mL 无菌稀释液的试管中，混匀成 1:100 稀释菌液。取 1:100 稀释菌液 1 mL 加入盛有 9 mL 无菌稀释液的试管中，混匀成 1:1000 稀释菌液。按同法依次稀释成 1:10000、1:100000 稀释菌液。移取不同浓度的稀释菌液时，每次须更换移液管。

接种：以无菌操作方式分别移取 100 μL 充分混匀的稀释菌液，分别滴加到制备好的平板培养基上，用无菌涂布棒将菌液均匀涂开，静置约 15 min，让菌液渗入培养基中，翻转平皿，使底面向上，在 23 °C±1 °C 条件下，于恒温培养箱中培养 48 h±2 h。每个菌液浓度做 2 个平皿。移取和涂布不同稀释倍数的菌液时，每次须更换移液管和涂布棒。

无菌性检验：用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿上不得有菌落生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

➤ 平皿计数

优先选择平均菌落数在 30~300 的平皿在避光条件下进行计数，若只有一个稀释倍数的平均菌落数符合此范围，以该平均菌落数带入公式（1）计算细胞密度；若有两个稀释倍数平均菌落数在 30~300 之间，分别带入公式（1）计算，当二者的结果比值<2 时，以两者的平均数作为细胞密度，当≥2 时，以稀释倍数较小的计算结果作为细胞密度。若所有稀释倍数的平均菌落数均大于 300，以稀释倍数最大的平均菌落数带入公式（1）计算细胞密度。

若所有稀释倍数的平均菌落数均小于 30，以稀释倍数最小的平均菌落数带入公式（1）计算细胞密度。若所有稀释倍数的平均菌落数均不在 30~300 之间，以最接近 300 或 30 的平均菌落数带入公式（1）计算细胞密度。

➤ 细胞密度计算

按公式（1）计算 1 mL 1:100 稀释菌液的细胞密度：

$$N = \frac{n}{V} \times d \quad (1)$$

式中： N ——1:100 稀释菌液中的细胞密度，个/mL；

n ——平皿计数结果，个；

V ——接种体积，mL；

d ——与平皿计数结果对应的稀释倍数。1:100、1:1000、1:10000、1:100000 稀释菌液的稀释倍数分别为 1、10、100、1000。

受试发光细菌冻干粉复苏稀释、培养、平皿计数在避光条件下的发光情况见图 4。

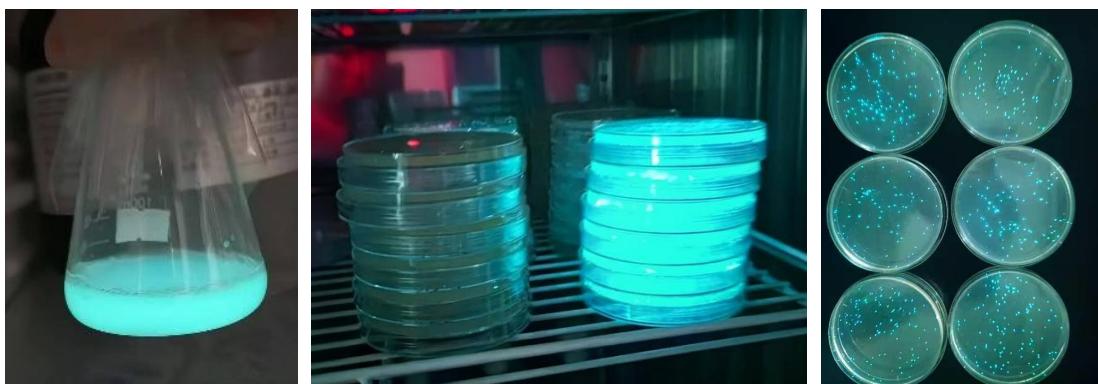


图 4 受试发光细菌复苏稀释、培养、计数示例

（4）受试发光细菌稳定性和敏感性控制要求。每批次受试发光细菌冻干粉在使用之前，应随机抽取其中至少 1 个冻干粉样本开展验证试验，校正因子、阳性对照和阴性对照测试结果应符合对应的质量控制要求。

5.4.2 试剂

（1）依据 HJ 168—2020 要求，结合试验需要，将 GB/T 15441—1995 中“3 试剂和材料”的导语“本标准所用试剂除另有说明外，均应为符合国家标准的分析纯试剂、蒸馏水或同等纯度的水”修改为“除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂，实验用水为蒸馏水。”

（2）与 GB/T 15441—1995 中“3 试剂和材料”相比，参考 ISO 11348—3—2007，一方面增加了氢氧化钠及氢氧化钠溶液 ($c = 1 \text{ mol/L}$)、盐酸及盐酸溶液 ($c = 1 \text{ mol/L}$)，主要是为了满足需要排除 pH 值影响的急性毒性测定，用以调节待测试样的 pH 值；另一方面增加了硫酸锌作为参比物，并根据测试过程配制相应的储备液（以 Zn^{2+} 计， $\rho = 1.4 \text{ g/L}$ ）、工作液（以 Zn^{2+} 计， $\rho = 28 \text{ mg/L}$ ）及参比物溶液（以 Zn^{2+} 计， $\rho_1 = 2.8 \text{ mg/L}$ ， $\rho_{II} = 1.6 \text{ mg/L}$ ）的

要求。

(3) 与 GB/T 15441—1995 中“3 试剂和材料”相比，保留氯化钠及氯化钠溶液 ($\rho_1 = 25 \text{ g/L}$ 、 $\rho_{II} = 30 \text{ g/L}$)，以此分别用于试样的盐度调节、受试发光细菌冻干粉复苏、复苏菌液及试样的稀释液。GB/T 15441—1995 中“3 试剂和材料”中要求氯化钠为化学纯，本标准参照 ISO 11348—3—2007 标准要求，将氯化钠试剂等级修改为分析纯，避免试剂中其他杂质成分对测试过程的影响。此外，除了自配试剂外，本标准亦可购买与受试发光细菌配套使用的复苏液和稀释液市售商品，并按要求保存。

(4) 为了保证标准方法的可比性和延续性，支撑现行六个制药行业排放标准（表 1），按照开题论证审查意见，保留氯化汞作为参比物，并根据本标准测试过程配制相应的储备液 ($\rho = 1 \text{ g/L}$)、中间液 ($\rho = 20 \text{ mg/L}$)、工作液 ($\rho = 2 \text{ mg/L}$) 以及参比物溶液 ($\rho_I = 0.2 \text{ mg/L}$ 、 $\rho_{II} = 0.11 \text{ mg/L}$)。参比物是方法质量保证和质量控制的重要支撑，是测试过程敏感性、稳定性及有效性控制的关键。由于氯化汞为剧毒物质，对实验室管理要求较高，对实验人员具有一定接触风险，因此，操作时应按规定要求做好防护，避免吸入呼吸道、接触皮肤和衣物。若实验室不具备购买、保存剧毒物质的资质，也可购买市售有证标准溶液，按要求进行保存和使用，既便于开展试验测试，又可降低管理和使用剧毒物质的风险。若不以氯化汞毒性当量浓度表征水质急性毒性，可选择使用非剧毒物质硫酸锌参比物溶液作为阳性对照。

5.5 仪器和设备

GB/T 15441—1995 中虽有“4 仪器”相关内容，但不符合当前生态环境监测标准制修订的要求，故按 HJ 168—2020 相关要求，系统梳理该部分内容。

5.5.1 样品采集与保存运输设备

按照 HJ 168—2020 中 5.4.1 部分增加采样设备。GB/T 15441—1995 “5.1 样品的采集和保存”中要求采样瓶使用带有聚四氟乙烯衬垫的玻璃瓶。按照《水质 样品采集 第 16 部分：生物检测样品指南》(《Water quality—sampling—Part 16: Guidance on biotesting of samples》，ISO 5667—16—2017) 的要求“用于生物检测的样品容器须具有耐低温、耐高温和耐压性能，通常使用聚丙烯、聚四氟乙烯和聚乙烯材质的采样瓶。另外，通常情况下含有有机物的水样也可使用玻璃瓶采集样品 (The sample container should be resistant to heating and freezing and it should be autoclavable and easy to clean. Polypropylene (PP), polytetrafluoroethylene (PTFE) or polyethylene (PE) containers are appropriate, but polyethylene is not autoclavable. Glass bottles are generally (but not always) suitable for organic chemical compounds and biological species.)”。我国现行有效的生态环境监测类毒性测试标准如《水质 致突变性的鉴别 蚕豆根尖微核试验法》(HJ 1016—2019)、《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》(HJ 1069—2019) 以及正在制订的《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法(征求意见稿)》均使用棕色玻璃瓶或聚丙烯、聚四氟乙烯、聚乙烯材质的容器作为水质毒性效应监测样品的容器。综合以上信息，本标准采样瓶统一为：棕色磨口具塞玻璃瓶，或聚乙烯、聚丙烯、聚四氟乙烯材质的塑料瓶，容积 $\geq 250 \text{ mL}$ 。

参照 ISO 5667—16—2017，增加冷藏箱用于转运样品。GB/T 15441—1995 中“5.1 样品的采集和保存”要求“毒性测定应在采样后 6 h 内进行。否则应在 2~5 °C 下保存样品，

但不得超过 24 h”。《水质 样品采集 第 16 部分：生物检测样品指南》(《Water quality—sampling—Part 16: Guidance on biotesting of samples》，ISO 5667—16—2017) 中关于生物毒性试验样品保存与运输的温度控制要求为“在运输过程中常用的冷藏温度为 2℃ 至 8℃ (A cooling temperature during transport of 2 °C to 8 °C has been found suitable for many applications)”。因此，本标准中仪器设备部分增加冷藏采样箱，参考 ISO 5667 将保存运输温度控制要求调整为 2 ℃~8 ℃。

5.5.2 样品常规理化指标测试仪器

GB/T 15441—1995 中对样品的测试温度控制要求为“20 ℃~25 ℃”，且“同一批样品在测定过程中要求温度波动不超过±1 ℃”。ISO 11348—3—2007 用的是温度控制器来对测试过程中的样品进行温度控制，相对比较精确“恒温控制模块使测试样品保持在 15℃±1℃，且在一次测试中温度偏差应不超过±0.3℃ (Thermostatically controlled thermo-block, to maintain the test samples at a temperature of 15 °C ± 1 °C. Within one test, the temperature deviation should be at most ± 0,3 °C.)”。考虑到受试菌种的不同以及测试过程温度控制需要，结合国内仪器设备现状情况，本标准仍沿用 GB/T 15441—1995 对测试温度的控制要求，即样品的测试温度范围为 20 ℃~25 ℃ 且同一批样品在测试过程中温度偏差不大于±1 ℃ (详见 5.7.1)。由于需要通过测定样品温度判断是否达到要求，因此本标准增配温度测量仪器，测定方法按《水质 水温的测定 传感器法》(HJ 1396)，测量范围-5 ℃~45 ℃，最小分度≤0.1 ℃。

GB/T 15441—1995 “6.1.2 pH” 规定了 pH 对发光细菌急性毒性的影响，考虑将 pH 作为毒性影响的因素，则不调节 pH；排除 pH 影响时，则需调节 pH。ISO 11348—3—2007 标准 “6.6 pH-meter” 也规定了需要 pH 计，因此本标准增配 pH 计，测定方法按《水质 pH 值的测定 电极法》(HJ 1147)，测量范围 0~14，最小分度为 0.1 pH 单位。

GB/T 15441—1995 中无测定溶解氧的相关仪器，只在 “6.1.3 溶解氧” 中规定了“只能测定包括溶解氧影响在内的急性毒性”。ISO 11348—3—2007 中则要求“待测样品溶解氧需>3.0 mg/L，否则需复氧后测定 (If the oxygen concentration of the undiluted sample is less than 3 mg/L, use adequate methods to oxygenate the sample, e.g. aeration or stirring)”，考虑到低溶解氧对毒性测试的影响，因此本标准增配溶解氧测定仪，测定方法按《水质 溶解氧的测定 电化学探头法》(HJ 506)，测量范围 0 mg/L~20 mg/L，最小分度为 0.1 mg/L。

GB/T 15441—1995 中未对样品盐度测定做出规定，但是在 “5.2.1 样品液的稀释” 中规定“取事先加氯化钠至 3 g/100 mL 浓度的样品母液……”，其目的就是调整样品的盐度，以满足明亮发光杆菌是海洋菌的属性，确保其正常发光所需的盐度水平。因此本标准增配盐度计，避免废水样品中存在一定盐度时加入过多氯化钠反而影响测定结果，盐度测定方法参考《海洋监测规范 第 4 部分：海水分析》(GB 17378.4) 相关内容，测量范围 0~80，最小分度为 0.1。

5.5.3 生物发光光度计

生物发光光度计是直接测量发光细菌发光水平的设备，对本标准至关重要，而市场上仪器设备类型繁多且无统一有效的技术要求，给检测人员带来了较大的选择困扰，也不利

于方法的推广应用。为研究科学、有效、可行的生物发光光度计技术指标及其控制要求，编制组开展了市场调研、主流仪器收集、校准规范对接跟踪以及仪器性能测试等，主要内容如下。

首先，开展国内市场仪器设备调研。编制组根据需要，设计了发光细菌测试用生物发光光度计的市场调查表，分别面向全国环境监测用户（<https://www.wjx.cn/vm/exQ1CLo.aspx>）以及仪器设备的生产供应商（<https://www.wjx.cn/vm/esOFm61.aspx>）开展调研（图 5）。累计收回 89 份有效问卷，其中监测单位 83 份，生产供应商 6 份。

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》
“微弱发光光度计”仪器调研问卷——用户版

各位专家、同仁，您好！
因《水质急性毒性的测定发光细菌法》(GB15441—1995) 标准修订工作需要，为了摸清该方法主要仪器设备微弱发光光度计国内市场和使用等基本情况，支撑仪器设备关键技术参数筛选等研究工作，标准编制组拟开展国内调研。烦请根据实际情况，填写以下调研表格。如有疑问，欢迎来电交流(联系人：沈老师，13915033836)。
不胜感激！
编制组郑重承诺：填报的信息仅供生态环境部行业标准修订工作参考。

一、使用单位基本信息

* 1. 单位名称

* 2. 是否开展“水质-急性毒性-发光细菌”实验
 是
 否

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》
“微弱发光光度计”仪器调研问卷——生产/供应商版

各生产/供应商，您好！
因《水质急性毒性的测定发光细菌法》(GB15441—1995) 标准修订工作需要，为了摸清该方法主要仪器设备微弱发光光度计国内市场和使用等基本情况，支撑仪器设备关键技术参数筛选等研究工作，标准编制组拟开展国内调研。烦请根据实际情况，填写以下调研表格。如有疑问，欢迎来电交流(联系人：沈老师，13915033836)。
不胜感激！
编制组郑重承诺：填报的信息仅供生态环境部行业标准修订工作参考。

一、生产/供应商基本信息

* 1. 调研单位名称

* 2. 单位属性
 仪器生产商
 仪器供应商

图 5 主要仪器设备市场调研问卷（部分内容）

其次，开展生物发光光度计技术指标调研及测试。编制组获悉国家计量技术规范《水质毒性分析仪校准规范》已由国家市场监督管理局成功立项后，积极与牵头编制单位中国计量科学研究院编制组对接沟通，跟踪标准研究制订进展以及仪器性能指标筛选情况。2025 年 2 月 8 日，国家市场监督管理总局正式发布了《水质毒性分析仪校准规范》(JJF 2203—2025)，并于 2025 年 8 月 8 日起实施。JJF 2203 中共提出了 7 个校准参数，包括背景噪声值、发光强度测量重复性、线性相关系数、EC₅₀时发光抑制率的相对线性误差、孔温度示值误差、孔温度稳定性、培养孔孔间温度差。其中，线性相关系数、EC₅₀时发光抑制率的相对线性误差结果受菌种、仪器及试验操作等测试全过程的影响，并非仅是生物发光光度计的影响，作为仪器性能控制指标存在菌种-仪器-测试过程循环论证的风险，不适于直接套用至本标准对仪器设备进行控制。因此拟选择温度、背景噪声值、发光强度测量重复性 3 个指标作为规范仪器性能的技术控制指标。在此基础之上，编制组根据调研结果收集了国内监测单位常用的 6 款不同品牌的生物发光光度计，购买了微弱发光管标准器（图 6），开展仪器性能测试。同时，将浓度效应拟合曲线相关系数、参比物 EC₅₀的有效浓度范围以及 EC₅₀时发光抑制率范围作为发光细菌急性毒性测试过程的控制，详见“5.8 结果计算与表示”及“5.10 质量保证和质量控制”相关内容。此外，生物发光光度计的测量范围应覆盖受试发光细菌发光光谱范围方能正常有效开展发光强度的测定。



图 6 微弱发光管标准器及其校准证书

(1) 发光有效测定范围控制

用于测定受试发光细菌发光强度及其变化的生物发光光度计可测定的光谱范围应覆盖发光细菌发光光谱范围。根据朱文杰等^[66]对发光光谱的研究发现，常见发光细菌的发光频谱范围为 420 nm~670 nm，最大发射波长在 480 nm 左右。编制组使用发光细菌测试液也进行了验证确认。因此，本标准规定生物发光光度计发光有效测定范围应覆盖波长 420 nm~670 nm 的可见光区间。

(2) 菌种复苏培养温度及样品测试温度的控制

发光细菌急性毒性测试需对冻干粉复苏培养及样品测试过程进行温控。冻干粉复苏培养温度控制方面，GB/T 15441—1995 仅使用“置有冰块的小号保温瓶”进行控温，相对较为粗放，ISO 11348—3—2007 对受试发光细菌培养的控温要求为 4 °C±3 °C，本标准参考该温度要求对冻干粉进行复苏培养。样品测试过程温度控制方面，GB/T 15441—1995 在“6.1 测定条件”中要求“20 °C~25 °C，同一批样品在测试过程中要求温度波动不超过±1 °C”；ISO 11348—3—2007 中关于样品测试的温度控制要求为 15 °C±1 °C。虽然两个标准由于受试菌种差异导致温度范围不同，但测试过程中的温度波动要求一致（±1 °C）。因此，本标准根据受试菌种情况，沿用 GB/T 15441—1995 关于样品测试温度控制要求，将样品测定的温度控制范围设定为 20 °C~25 °C，且设定为某一测试温度后，在同一批样品测试过程中温度波动不超过±1 °C。此外，当仪器本身不具备温控模块时，应另外配备符合控温条件的仪器设备，如：使用具备相应控温条件的冰箱替代控温培养模块功能，并将生物发光光度计放置在具备相应控温条件的实验室内开展试验。经过验证，在一个面积较小（如≤15 m²）且密封性较好的实验房间内通过空调控温即可在测试过程中实现温度波动不超过±1 °C 的控制要求。

(3) 背景噪声值

根据市场调研结果，选择国内市面上常用的 6 款生物发光光度计（分别编号为仪器 A、仪器 B、仪器 C、仪器 D、仪器 E、仪器 F），将与仪器配套的空测试管放至测试仓内，连续测量 10 次为一组，共测试 6 组，统计每组的背景噪声值（表 5）。

表 5 6 款不同生物发光光度计的背景噪声值统计

仪器	第一组	第二组	第三组	第四组	第五组	第六组
A	0	0	0	0	0	0
B	97	117	106	126	108	77
C	0	3	35	36	1	4
D	29	24	43	42	39	26
E	19	13	17	16	17	19
F	0	0	0	0	0	0

注 1：表格中数据均为 10 次测定的算术均值；

注 2：由于各仪器对微弱光信号的处理方式不同，因此各测量值之间不具有可比性。

通过比较各仪器的背景噪声值发现，仪器 A、仪器 F 可以通过调零操作，将背景噪声值归 0。其余 4 款仪器不具备调零功能，背景噪声值显示不为 0，将其背景噪声值与受试发光细菌测试液的初始发光强度进行对比分析（表 6、图 7）。从结果可知，仪器 B、C、D 的背景噪声值占初始发光强度 0.02% 以下，而仪器 E 的比值均在 1.5% 以上。编制组经分析比较，发现该仪器于 20 余年前研发，且使用年限较长，稳定性相对较差。

表 6 生物发光光度计背景噪声值相对于受试发光细菌初始发光强度的占比

仪器	第一组	第二组	第三组	第四组	第五组	第六组
B	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%
C	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
D	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
E	1.95%	1.54%	1.79%	1.54%	1.57%	2.33%

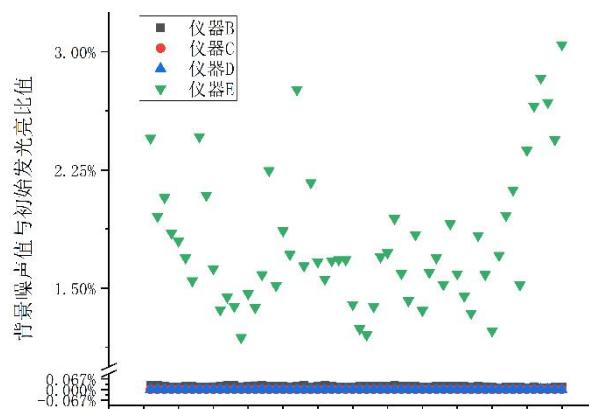


图 7 4 台仪器背景噪声值相对于受试发光细菌初始发光强度比值散点图

综合试验结果及仪器比较，对生物发光光度计的背景噪声值作出如下规定：按照 JJF 2203 方法测定的背景噪声值较低，对试样的相对发光率、发光抑制率等测定结果的影响可忽略不计。具备调零功能，通过调零操作后的背景噪声值为 0；或背景噪声值相对于发光细菌测试液发光强度值的百分比 $\leq 0.1\%$ ，即仪器背景噪声值对相对发光率的影响不高于 0.1%，对测试结果影响可忽略不计。

(4) 发光强度测量重复性

当前国内外相关仪器设备均是将光子信号经过转化处理后以电信号或其他形式来表征，但无统一规范，各仪器的测量结果存在数量级的差距。编制组根据 JJF 2203 相关要求，基于有证标准器件微弱发光管（图 6），用上述 6 款仪器进行发光强度测量重复性测试，每个仪器测 6 组，每组重复检测 10 次，10 次重复间的相对标准偏差数据见表 7。

表 7 基于微弱发光管标准器的测定相对标准偏差

仪器	第一组	第二组	第三组	第四组	第五组	第六组
A	8.70%	1.28%	1.20%	3.58%	1.56%	1.36%
B	3.08%	1.91%	0.79%	0.68%	0.60%	0.52%
C	1.86%	0.80%	0.44%	2.19%	0.39%	8.05%
D	0.94%	2.62%	0.26%	0.40%	1.38%	1.41%
E	3.66%	5.59%	2.06%	5.66%	3.58%	7.79%
F	2.88%	3.35%	3.53%	3.73%	0.99%	5.95%

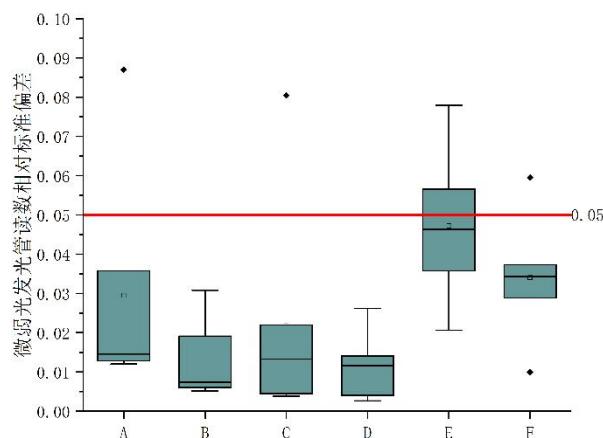


图 8 基于微弱发光管标准器的 6 款仪器测定值的相对标准偏差箱线图

测量过程中，仪器本身的波动和偏离须在可接受范围内。根据对市场上 6 款仪器的测试可知，仪器 E 稳定性略差（均值 4.7%，范围为 2.06%~7.79%），其余仪器除在个别测定前预热时间较短导致该组测定相对标准偏差较高外（如仪器 A 第一组、仪器 C 第六组、仪器 F 第六组），其他组测定的相对标准偏差均在 5% 以下，总体样本 5%~95% 分位数区间为 1.9%~3.4%。综上，本标准规定：按照 JJF 2203 方法测定的发光强度测量重复性 $\leq 5\%$ 。

5.5.4 测试管

测试管与生物发光光度计配套，玻璃材质，圆柱形，具 2 mL、5 mL 两种规格，可通过固定盖形成套管，套管示意图见图 9。

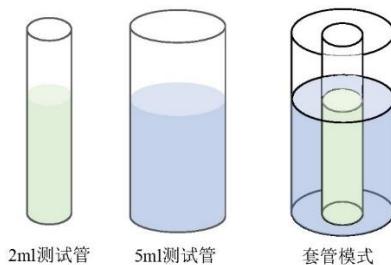


图 9 测试管示意图

5.5.5 其他设备

其余辅助设备包括：移液器， $10\text{ }\mu\text{L}\sim 100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}\sim 1000\text{ }\mu\text{L}$ 可调，配备吸液嘴（参见 JJG 646—2006），用于移取各类试剂及样品等。冰箱或冷库，具有 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下冷藏功能和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻功能，用于保存受试发光细菌冻干粉、各类试剂、样品等。实验室常用器皿和设备。

5.6 样品

5.6.1 样品采集

GB/T 15441—1995 中关于样品的采集与保存主要涉及三部分：① 采样瓶使用带有聚四氟乙烯衬垫的玻璃瓶，务必清洁、干燥。采集水样时，瓶内应充满水样不留空气。采样后，用塑胶袋将瓶口密封。② 毒性测定应在采样后 6 h 内进行。否则应在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存样品，但不得超过 24 h 。报告中应写明水样采集时间和测定时间。③ 对于含固体悬浮物的样品须离心或过滤去除，以免干扰测定。

条款③属于样品干扰消除，本标准文本拟将其调整至“干扰和消除”部分。①和②样品采集与保存部分参照相关采样技术规范和样品保存技术要求，结合实际使用需求，本标准具体内容如下：地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水样品的采样频次、采样时间以及采样位置分别按照 HJ 91.2、HJ 164、HJ 91.1 和 GB 17378.3 相关章节执行。采样时，样品沿瓶壁缓慢倒入采样瓶，注意避免冲击产生气泡，直至样品在采样瓶中过量溢出，形成凸面，盖紧瓶盖。颠倒采样瓶，观察数秒，确保瓶内无气泡，如有气泡应重新采样。宜在采样时，同步测定水温、pH、溶解氧、盐度等常规水质参数，为实验室开展发光细菌毒性测试提供参考。

5.6.2 样品保存与运输

参考《水质 样品采集 第 16 部分：生物检测样品指南》(《Water quality—Sampling—Part 16: Guidance on biotesting of samples》，ISO 5667—16—2017) 中 6.6 和 7.2 相关要求“在运输过程中常用的冷藏温度为 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A cooling temperature during transport of $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ has been found suitable for many applications.)”“若样品冷藏保存，保存时间应符合生物检测设定的有效时间范围，通常为 48 小时”(If samples are preserved by cooling, the time span between sampling and analysis (storage time) should remain within the time set for the respective biotest. Usually this storage time is 48 h.)”“若无法在 48 小时内开展

分析，则应在取样后尽快将水样在 $\leq -18^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻保存，应通过减小样品体积（即样品容器容积）以最大限度地降低冻结和解冻时间。通常情况下，1 L 容器中装 0.5 L~0.7 L 的样品，对于大体积样品，应摇匀后分样保存(Freeze down water samples to $\leq -18^{\circ}\text{C}$ as soon as possible after sampling if it is not possible to start performance of the test within 48 h. The time required for freezing and thawing should be minimized by reducing the sample volume, i.e. the size of the sample container. In general, it is appropriate to use one-liter containers for freezing (filled with max. 0.5 l to 0.7 l of sample). For tests requiring larger volumes, the sample should be homogenized and split into sub-samples)”，样品保存条件修改为“样品采集后，应立即置于冷藏箱中， $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光保存和运输。到达实验室后， $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光保存，并在采样后的 48 h 内开展测试。若不能在 48 h 内进行测试，宜采用聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质的塑料瓶保存和运输样品，到达实验室后，将样品混匀后按每 500 mL 容量盛装 250 mL~350 mL 的量分装，并立即置于冰箱或冷库中，冷冻($\leq -18^{\circ}\text{C}$)保存，保存期不超过 2 个月。”

5.6.3 样品预处理

(1) 浊度干扰的消除

样品中的悬浮颗粒物对受试发光细菌发出的光线具有遮挡、吸收、散射等作用，从而影响测定结果，测定前需要对样品中的悬浮颗粒物进行去除，以消除对测定的影响。GB/T 15441—1995 要求“对于含固体悬浮物的样品须离心或过滤去除，以免干扰测定”，但是并未明确离心或过滤去除的具体要求，不利于实际操作。因此，参考 ISO 11348—3—2007 相关要求“高浊样品应静置 1 小时或离心，如 5000 g 条件下 10 min，或过滤之后使用上清液或滤液进行测试(Strongly turbid samples should be allowed to settle for 1 h or centrifuged, for example for 10 min at 5000 g, or should be filtered. Use the supernatant or filtrate for the test.)”，本标准将样品浊度处理方法修改为“可静置沉淀(1 h)或离心(5000 g, 10 min)以消除悬浮颗粒物对测试的影响”。对于过滤去除颗粒物影响方式，ISO 11348—3—2007 中并未明确具体要求，ISO 5567—16—2017 指出沉淀、离心方式优于过滤，若用过滤处理，应使用惰性材料的滤膜并用超纯水冲洗以降低滤膜对样品的影响(The filter material should be made of inert material and the filters should be rinsed with high-purity water prior to use to reduce the risk of contamination of the test material with toxic residues)。考虑到实际水样成分可能比较复杂，避免滤膜过滤对样品产生潜在影响，且使用沉淀、离心处理的优先级高于过滤，因此标准文本中暂未考虑过滤方式去除浊度影响。按照 HJ 168—2020 的要求，将浊度影响去除相关内容调整到“干扰和消除”部分。

(2) 有色样品的校正

样品的颜色会对受试发光细菌发出的光线产生吸收、散射等作用，从而影响测定结果。发光细菌急性毒性测试方法本质上是对受试发光细菌发光强度及其变化情况的检测，有色样品必然会影响发光强度的检测，因此需要对有色样品的测定过程进行校正。本标准仍沿用 GB/T 15441—1995 中“6.2.9 有色样品测定干扰的校正”的方法，并进行适当优化。GB/T 15441—1995 中主要是分别在装有稀释液(空白对照)和有色样品的 5 mL 外套管内放置装

有发光细菌测试液的 2 mL 测试管，为了进一步避免不同发光细菌测试管间发光强度自身差异带来的影响，本标准优化为：用同一支装有发光菌测试液的 2 mL 测试管，先在空白套管中测定，再迅速拿出并擦干后放入有色样品套管中进行测定。同时，设置 2 个平行测定。由于高色度样品对受试发光细菌发光强度的测定影响较大，甚至可能导致发光强度测定值接近生物发光光度计的背景噪声值，因此无法开展有效的校正测定，此时只能测定包括试样颜色影响在内的急性毒性。

此外，参考 ISO 11348—3—2007 的布局，将有色样品作为干扰和消除的内容，并将具体步骤作为资料性附录，以进一步精简、优化文本。具体如下：

a) 干扰校正测定

将生物发光光度计检测舱调至套管测试模式。

空白对照准备。分别取 2 mL 和 5 mL 测试管各一支，将 2 mL 测试管放入 5 mL 测试管之中，形成内外套管。使用移液器往内管中加入 900 μL 或 500 μL 的氯化钠溶液 ($\rho = 30 \text{ g/L}$)，并往外管内添加适量氯化钠溶液 ($\rho = 30 \text{ g/L}$)，使外管的液面与内管含 1 mL 体积溶液时的液面齐平，用固定盖固定。设置 2 个平行。

有色样品准备。取 5 mL 测试管一支，加入与空白对照套管的外管中氯化钠溶液相同体积的有色样品。设置 2 个平行。

使用移液器往 2 个平行空白对照套管的内管中依次加入 100 μL 发光细菌测试液 I 或 500 μL 发光细菌测试液 II (5.7.2.2)，混匀，立即计时，待反应 15 min 后，将套管依次放入生物发光光度计检测舱中，测定发光强度。随即将空白对照套管的内管依次分别取出，使用干净的吸水纸擦干外壁，放入有色样品管中，用固定盖固定，形成有色样品套管，并将套管依次放入生物发光光度计检测舱测定发光强度。

若需要将样品配成不同稀释倍数的系列试样，则每个试样均应按上述方法分别开展干扰校正测定。校正测定中发光细菌测试液与氯化钠溶液的规格和体积应与 5.7.3~5.7.6 中对应测试步骤保持一致。有色试样干扰校正示意图见图 10。

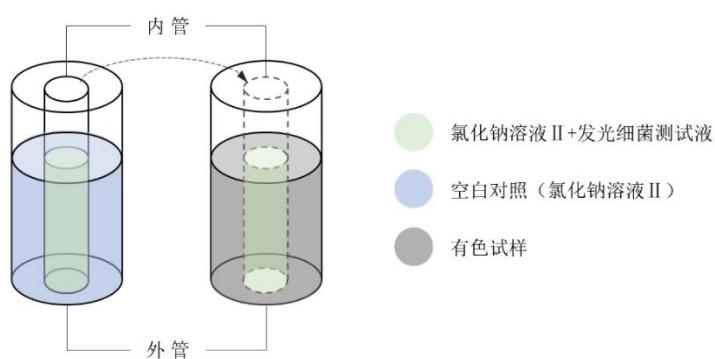


图 10 有色试样干扰校正示意图

b) 干扰校正计算

按照公式 (2) ~ (4) 计算有色试样对受试发光细菌发光强度的干扰校正值：

$$\Delta L_i = \frac{\Delta L_{i1} + \Delta L_{i2}}{2} \quad (2)$$

$$\Delta L_{i1} = L_1 - L_{i1} \quad (3)$$

$$\Delta L_{i2} = L_2 - L_{i1} \quad (4)$$

式中： ΔL_i ——有色试样 i 对受试发光细菌发光强度干扰的平均校正值；

ΔL_{i1} ——有色试样 i 对受试发光细菌发光强度干扰的校正值；

ΔL_{i2} —— ΔL_{i1} 的平行测定结果；

L_1 ——受试发光细菌在空白对照套管中测得的发光强度；

L_2 —— L_1 的平行测定结果；

L_{i1} ——与 L_1 对应的受试发光细菌在有色试样套管中测得的发光强度；

L_{i2} —— L_{i1} 的平行测定结果，与 L_2 对应的受试发光细菌在有色试样套管中测得的发光强度。

c) 干扰校正值的使用

根据测试目的需要，将有色试样按发光抑制率测定的相应步骤开展测试，并计算初始发光强度 I_{ct} 。将初始发光强度 I_{ct} 减去对应有色试样的干扰校正值 ΔL_i ，得到有色试样经校正后的初始发光强度 I'_{ct} ，即 $I'_{ct} = I_{ct} - \Delta L_i$ 。以 I'_{ct} 代替 I_{ct} ，其余根据测定结果，按要求计算。

(3) 温度

参考 ISO 5667—16—2017 对于冷冻保存样品的处理方式“推荐使用温度不超过 25 °C 的温水浴解冻，并轻轻摇晃以避免局部过热，或在 2 °C 和 8 °C 条件下避光隔夜解冻 (A warm water bath at a temperature not exceeding 25 °C, together with gentle shaking, are recommended to avoid local overheating. Alternatively, the sample can be thawed in the dark at a temperature between 2 °C and 8 °C overnight and used directly for the test)”，因此本标准规定冷冻保存的样品可在≤25 °C 的水浴中缓慢振荡解冻，或在 2 °C~8 °C（与冷藏保存样品条件一致）冷藏避光条件下隔夜解冻。另外，测试开始前，将样品放置于设定的测试温度条件下约 1 h，以平衡样品温度。按照 HJ 1396 的要求测定样品温度，达到设定要求后用于测试。

(4) pH 值

GB/T 15441—1995 中关于样品 pH 的处理分为两种情况：①若须测定包括 pH 影响在内的急性毒性，不应调节水样 pH。②若须测定排除 pH 影响在内的急性毒性，须将水样和空白对照的 pH 于测前进行调节，其中主要含 Cu 水样调至 4.5，主要含其他金属水样调至 5.4，主要含有机化合物水样为 7.0。由于实际水样往往成分复杂且未知，现有标准方法对须调节 pH 测定的相关内容不具有可操作性。ISO 11348—3—2007 标准要求，需要测定排除 pH 影响的急性毒性时，使用氢氧化钠或盐酸溶液将非海水样品 pH 调至 7.0 ± 0.2 ，海水样品调节至 7.5 ± 0.2 ，但需限制加入酸碱的体积不得超过样品体积的 5% (restrict the volume added to not more than 5% of total volume)，并分别测定调节前后样品的急性毒性 (It may be necessary to carry out tests on both the pH-adjusted and the non-pH-adjusted samples.)。

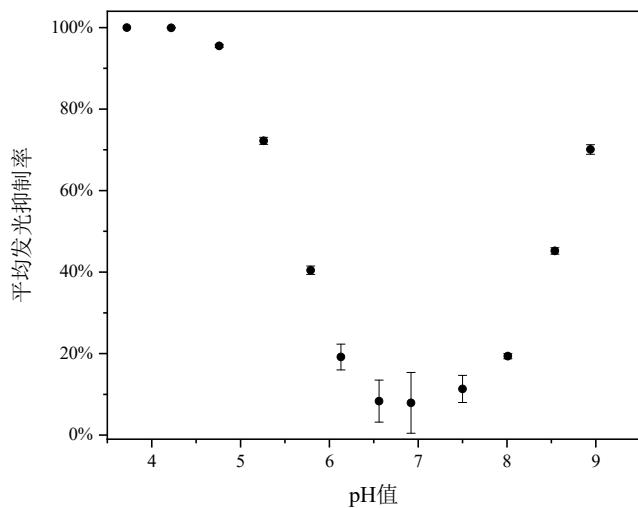


图 11 不同 pH 值条件下受试发光细菌的发光抑制率变化情况

以 0.5 为梯度设置 pH 值 3.72~8.94 共 12 组空白试样，测定其对明亮发光杆菌 T3 发光抑制率的影响。结果见图 11 所示，pH 在 6~8 之间时，明亮发光杆菌 T3 的发光抑制率在 20% 以下，无明显抑制效应，且越接近 pH = 7 其发光抑制率越低，因此 pH 值在 6~8 之间可不调节，不在此范围内时，可将样品的 pH 值调整至 7.0 ± 0.2 。

综上，本标准关于样品 pH 的调节规定如下：①通常不调节样品 pH 值。②若需排除样品 pH 的影响，按 HJ 1147 或 GB17378.4 方法测定样品 pH 值，当 $pH > 8.0$ 或 < 6.0 时，使用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节样品 pH 值，地表水、地下水、生活污水、工业废水样品调节至 7.0 ± 0.2 ，海水样品调节至 7.5 ± 0.2 （与人工海水保持一致），酸碱调节溶液的使用量应不超过样品体积的 5%。

（5）溶解氧

ISO 11348—3—2007 中要求待测样品溶解氧需 $> 3.0 \text{ mg/L}$ ，否则需复氧后测定（If the oxygen concentration of the undiluted sample is less than 3 mg/L , use adequate methods to oxygenate the sample, e.g. aeration or stirring），但并未明确复氧方法，特别是对于含有挥发和半挥发等物质的样品，曝气等复氧手段可能会较大程度改变样品的原有属性。因此，本标准拟沿用 GB/T 15441—1995 中的相关处理方法并对语言描述稍加修改，同时参考 ISO 11348—3—2007 对于溶解氧限值的要求，对于确需调节溶解氧的，需先按照 HJ 506 方法测定样品的溶解氧浓度，并用“缓慢搅拌的方式充氧”。具体表述为：通常不调节样品溶解氧浓度。若需排除溶解氧的影响，按 HJ 506 方法测定样品的溶解氧浓度，当样品的溶解氧浓度 $< 3.0 \text{ mg/L}$ 时，可采用缓慢搅拌的方式充氧，使样品溶解氧浓度 $> 3.0 \text{ mg/L}$ 。经溶解氧调节前、后的样品，均应开展测试。

（6）盐度

GB/T 15441—1995 中“5.2.1.1 样品预实验”规定，取事先加氯化钠至 $3 \text{ g}/100 \text{ mL}$ 浓度的样品，也就是将样品进行盐度调节至 30。由于本标准所使用的受试生物明亮发光杆菌 T3 为海洋菌，适合的盐度才会正常发光，因此本标准沿用 GB/T 15441—1995 的要求，同时考虑操作的可行性及可接受的盐度误差（ ± 2 ，参照原国家海洋局监测技术规程，海环字〔2015〕

29号),对于淡水样品进行盐度调节至30左右。资料调研显示,我国近海海水盐度通常为30左右,一般情况下海水样品不调节盐度。据此,本标准关于盐度作出如下规定:地表水、地下水、生活污水、工业废水样品通常需要调节盐度,参照GB 17378.4方法测定样品盐度,当盐度<30时,用氯化钠调节样品盐度至 30 ± 2 。海水样品通常不调节盐度,按GB 17378.4方法测定样品盐度,当盐度<30时,用氯化钠调节样品盐度至 30 ± 2 。

考虑到明亮发光杆菌T3为海洋菌,直接测试海水样品的急性毒性,可能产生刺激发光作用,影响测定结果。因此,需要对海水试样测试过程进行适当校正。按表8配制人工海水(也可购买市售人工海水),将其作为海水样品测试的空白对照和阴性对照,并作为参比物溶液的溶剂和试样的稀释液,配制海水试样测试用的参比物溶液和系列稀释试样。其余测试过程与非海水试样一致(5.7.3~5.7.6),从而达到海水测定校正目的。

表8 人工海水主要成分及其理化特性

主要成分及其理化特性指标		成分浓度及理化特性
主要成分 (g/L)	NaCl	22.0
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	9.7
	Na ₂ SO ₄	3.7
	CaCl ₂	1.0
	KCl	0.65
	NaHCO ₃	0.20
	H ₃ BO ₃	0.023
理化特性指标 (20 °C)	电导率(mS/cm)	47.0 ± 1.0
	盐度	31 ± 1
	pH值	7.5 ± 0.2

5.7 分析步骤

5.7.1 测试环境条件和仪器

(1) 测试温度条件控制

目前,国内外对于发光细菌急性毒性测试的温度控制大致为两种类型,分别为ISO 11348—3—2007中用于费氏弧菌测试要求的 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和GB/T 15441—1995中用于明亮发光杆菌测试规定温度在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间,且同一批试样在测试过程中温度偏差不大于 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。本标准使用明亮发光杆菌测定水质急性毒性,因此沿用GB/T 15441—1995的控制要求,并开展验证。分别设置在两个边界温度($20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)条件下进行明亮发光杆菌T3急性毒性测试试验,各平行测定10组,比较校正因子、阴性对照和阳性对照等重要敏感响应指标在不同温度条件下的差异。结果如图12所示,在两个边界温度下,受试发光细菌的校正因子、阴性对照、阳性对照均符合本标准“反应时间15 min的平均校正因子应符合 $0.6\leq \overline{f_k} \leq 1.8$,阳性对照(氯化汞终浓度0.10 mg/L)的发光抑制率应符合 $20\% \leq H_t \leq 80\%$,阴性对照的发光抑制率应符合 $-10\% \leq H_t \leq 10\%$ ”的质控要求。同时,配对样本t检验结果显示,阴性对照及阳性对照测定结果在不同温度条件下的发光抑制率的P值均大于0.05,无显著性差异。因此,本标准将测试温控条件仍设置在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间,且同一批

试样在测试过程中温度偏差应不大于 ± 1 °C。

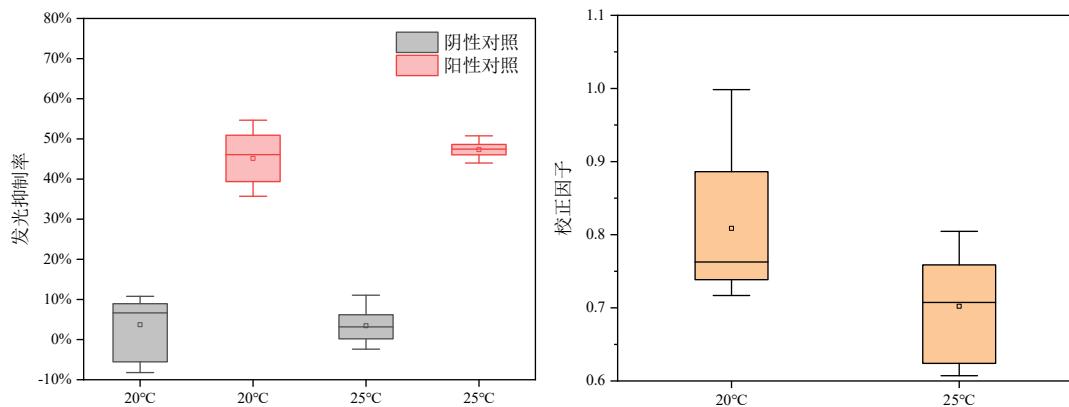


图 12 不同温度测试条件下明亮发光杆菌 T3 敏感响应指标比较

(2) 仪器准备

测试前，需要提前打开生物发光光度计电源，预热 15 min，调零（若具备该功能），备用。

5.7.2 发光细菌准备

5.7.2.1 发光细菌复苏液

GB/T 15441—1995 中“6.2.4 发光细菌冻干菌剂复苏”详细描述了发光细菌冻干粉的复苏，本标准予以沿用并进一步规范其操作要求，包括：按每 0.5 g 冻干粉 1 mL 的比例要求，使用一定体积预冷的氯化钠溶液 ($\rho = 25$ g/L) 对受试发光细菌冻干粉进行复苏；参照 ISO 11348—3—2007，将复苏条件由“置有冰块的小号保温瓶”修改为“4 °C ± 3 °C 条件下复苏约 30 min”；有效时间仍为“4 h 以内使用有效”。

5.7.2.2 发光细菌测试液

GB/T 15441—1995 中无测试液的表述，而是直接移取 10 μ L 复苏液加入试样或稀释液（2 mL 或 5 mL）进行测定，10 μ L 相对于 2 mL 或 5 mL 待测试样来说仅占 0.5% 或 0.2%，加入菌液后对试样体积的影响可以忽略不计，从理论上来说比较完美。但是，10 μ L 的菌液取样量过小，操作误差较大，很容易引起受试发光细菌的发光强度测试结果出现较大的波动。而 ISO 11348—3—2007 中，对原样品进行测试时，菌液的加入体积为 200 μ L，样品体积为 800 μ L，而对稀释系列试样进行测试时，菌液的加入体积还包括 500 μ L，对应的试样体积为 500 μ L。相对而言，移取 200 μ L 和 500 μ L 菌液的操作相对更方便，但是一定程度上也会对待测样品产生稀释作用。为了解移取不同体积菌液操作对受试发光细菌发光强度的客观影响，分别在移取 10 μ L、100 μ L、500 μ L 菌液的情况下，对其发光强度进行测定，每个测试体积设置 20 组，每组 10 个平行，分析对应的发光强度相对标准偏差（RSD）情况。

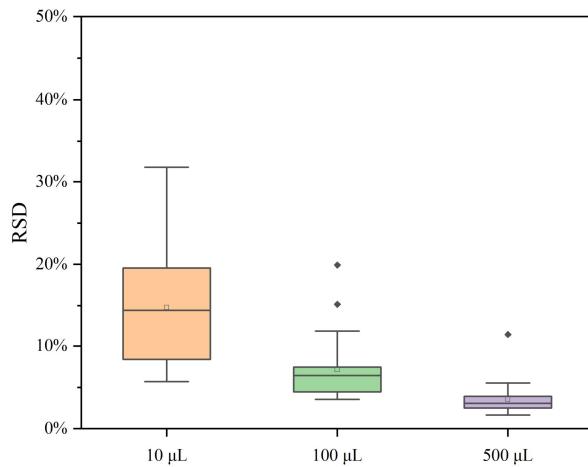


图 13 移取不同菌液体积情况下受试发光细菌发光强度的变异情况

由图 13 可知, 菌液的体积越小, 其变异系数越大, 菌液体积到达 $100 \mu\text{L}$ 时, 其变异系数均值为 7.14% , $500 \mu\text{L}$ 菌液体积的变异系数均值为 3.50% 。同时, 考虑加入的菌液体积尽量减少对样品的稀释作用。为了兼顾降低操作误差和对样品的稀释, 本标准在测试体系上拟采取如下方案: 针对原样品测试时, 使用的菌液试样体积比为 $100 \mu\text{L} : 900 \mu\text{L}$ (即 1:9 体系), 既尽量降低对样品的稀释, 同时较 GB/T 15441—1995 移取 $10 \mu\text{L}$ 有效降低了操作误差; 针对稀释试样, 使用的菌液试样体积比为 $500 \mu\text{L} : 500 \mu\text{L}$ (即 1:1 体系), 便于计算样品体积分数或稀释倍数, 同时也有效降低了操作误差。

根据以上两种测试体系, 需将复苏液稀释成 2 种浓度规格的测试液, 以确保两种测试体系的发光细菌终浓度保持一致, 使不同测试体系的结果具有可比性。其中, **发光细菌测试液 I**: 按 1:19 比例移取一定体积的复苏液和氯化钠溶液 ($\rho = 30 \text{ g/L}$), 于一支干净的试管中混匀, 形成发光细菌测试液 I, 置于测试温度条件下, 备用。例如, 依次移取 $100 \mu\text{L}$ 复苏液和 $1900 \mu\text{L}$ 氯化钠溶液于干净的试管中, 混匀。**发光细菌测试液 II**: 按 1:99 比例移取一定体积的复苏液和氯化钠溶液 ($\rho = 30 \text{ g/L}$), 于一支干净的试管中混匀, 形成发光细菌测试液 II, 置于测试温度条件下, 备用。例如, 依次移取 $100 \mu\text{L}$ 复苏液和 9.9 mL 氯化钠溶液 II 于干净的试管中, 混匀。此外, 对于市售冻干粉的复苏和测试液的准备也可按其说明书操作, 但其测试液细胞密度应符合 10^4 个/mL 要求。

结合发光细菌测试液准备的变化以及菌液试样测试体系的变化, 与 GB/T 15441—1995 进行比较, 分析对最终测试体积中受试生物细胞密度的影响, 结果见表 9 所示。可以发现, 虽然本标准调整了发光细菌测试液的细胞密度和菌液试样测试体积, 但并未改变最终测试体系中受试发光细菌的细胞密度, 为确保测试结果的可比性奠定了基础。

表 9 发光细菌测试液及测试体系变化对受试生物细胞密度的影响比较

菌液	GB/T 15441—1995		本标准			
	体积	细胞密度 (个/mL)	体积	细胞密度 (个/mL)	体积	细胞密度 (个/mL)
发光细菌复苏液	1 mL	n	1 mL	n	1 mL	n

菌液	GB/T 15441—1995		本标准			
	体积	细胞密度 (个/mL)	体积	细胞密度 (个/mL)	体积	细胞密度 (个/mL)
发光细菌测试液	1 mL	n	20 mL	$n/20$	100 mL	$n/100$
菌液试样测试体系	$10 \mu\text{L} : 2 \text{ mL}$	$n/200$	$100 \mu\text{L} : 900 \mu\text{L}$	$n/200$	$500 \mu\text{L} : 500 \mu\text{L}$	$n/200$

注 1：假设一支符合质量要求的冻干粉加入 1 mL 复苏液后的发光细菌细胞密度为 n 个/mL。

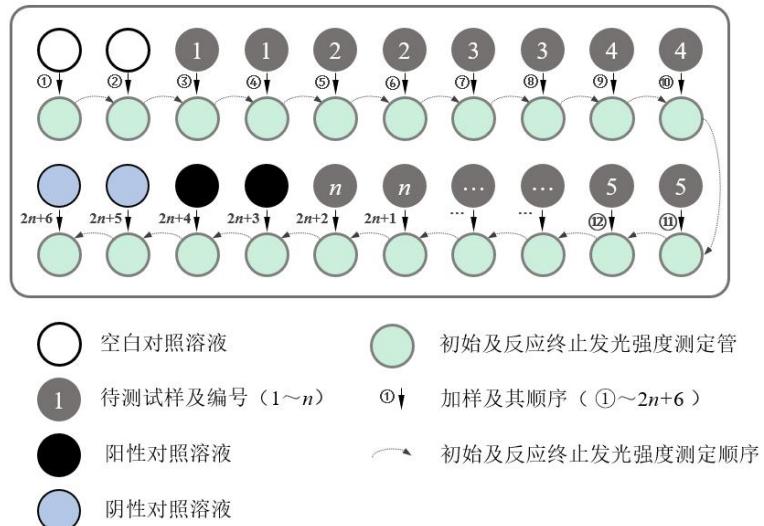
5.7.3 发光抑制率测试

本标准对实际样品发光细菌急性毒性测试程序的设计是，首先开展样品发光抑制率的测试，其次根据测试目的和样品发光抑制率测试结果判断是否需要进一步开展氯化汞毒性当量浓度测试、LID 测试或 EC₅₀ 测试。这样设计主要基于以下两方面考虑：一方面发光抑制率测试是水质发光细菌急性毒性测试的基础和关键，后续的氯化汞毒性当量浓度测试、LID 测试、EC₅₀ 测试均是建立在发光抑制率基础之上的，为后续测试摸清了样品的毒性概况。另一方面主要是基于优化测试工作量考虑，在样品发光抑制率测试基础之上，可以排除掉不需要进一步测试的样品，仅需针对需要测试的样品进一步开展氯化汞毒性当量浓度测试、LID 测试或 EC₅₀ 测试，这比将所有样品直接开展氯化汞毒性当量浓度测试、LID 测试或 EC₅₀ 测试工作量要小，具有降本增效的效果。

GB/T 15441—1995 中的发光抑制率测试主要有两个主要特征：①每个试样测试管均设置了一个空白对照管（CK 管），反应一定时间后，以试样测试管和 CK 管的发光强度计算发光抑制率。可以看出，计算发光抑制率用的发光强度并不是来自于同一个测试管中的菌液。②菌液的移取量较小，仅为 10 μL，操作难度较大。根据 5.7.2.2 分析可知，在菌液移取量较小时，其操作误差较大，发光强度结果变异明显增加。因此，为了解决以上问题，本标准参考 ISO 11348—3—2007 的测试方法，主要修改三方面内容：①修改菌液试样测试体系，降低操作误差，同时配套修改发光细菌测试液的稀释比例，使得最终测试体系中受试发光细菌的细胞密度与 GB/T 15441—1995 一致，不改变受试生物数量。②引入校正因子修正发光细菌自生发光强度的变化，使计算发光抑制率的初始、反应终止发光强度来自于同一测试管中的菌液。③将平行测定数量统一为 2 个。修改后的测试过程详见 5.7.3.1~5.7.3.4。对于有色样品、海水样品等，分别按 5.6.3 (2)、5.6.3 (6) 对应的要求进行校正测定。

5.7.3.1 准备

测试样品的发光抑制率，为氯化汞毒性当量浓度测试、LID 测试、EC₅₀ 测试提供参考。按照空白对照、样品、阳性对照、阴性对照的顺序排列测试管，分别设置 2 个平行，测试管的排列方式以方便操作为宜，可参见图 14。其中，空白对照、样品、阳性对照、阴性对照的总数（含平行）若大于 30 个，存在试验操作过程（加样、测定发光强度等）的时间达到或超过反应时间 15 min 的风险，导致试验无法正常开展，因此宜将样品进行分批测定。



注：该示例适用于发光抑制率测试、LID 测试及 EC₅₀ 测试。

图 14 测试管排列与测定示例一（俯视图）

5.7.3.2 测定初始发光强度

依次移取 100 μL 发光细菌测试液 I 加入排列好的测试管中，按加测试液的顺序依次将测试管放入生物发光光度计检测舱中，测定初始发光强度 (I_0)。测试管之间加发光细菌测试液和测定初始发光强度的时间间隔宜保持一致，间隔时间为 5 s~20 s。

5.7.3.3 加样

对于非海水样品，以氯化钠溶液 II ($\rho = 30 \text{ g/L}$) 作为空白对照和阴性对照，以参比物氯化汞溶液 II ($\rho = 0.11 \text{ mg/L}$) 或参比物硫酸锌溶液 II ($\rho = 1.6 \text{ mg/L}$, 以 Zn²⁺ 计) 作为阳性对照；对于海水样品，对应的空白对照、阳性对照和阴性对照见 5.6.3 (6) 部分。按照 5.7.3.2 的顺序，依次分别移取 900 μL 空白对照、样品 (5.6)、阳性对照、阴性对照加入对应的测试管中，混匀。加样后即开始计时，测试管之间加样的时间间隔与 5.7.3.2 保持一致。移取不同的溶液或样品均应更换吸液嘴。虽然空白对照和阴性对照同为氯化钠溶液，但在测试中却有不同的作用，空白对照主要用于校正因子计算，阴性对照主要用于测试过程质量控制，与阳性对照质量控制形成互补。

5.7.3.4 测定反应终止发光强度

反应时间 $t = 15 \text{ min}$ 后，按照 5.7.3.2 的顺序依次测定反应终止发光强度 I_t 。GB/T 15441—1995 中的反应时间为 15 min，因此本标准的反应时间均规定为 15 min。也可根据实际需要，选择同步测定反应 5 min、30 min 的结果，分析毒性的时间变化过程。

5.7.3.5 发光抑制率计算及测试选择

按照要求计算样品的平均发光抑制率，并根据实际需要进一步开展氯化汞毒性当量浓度测试、LID 测试或 EC₅₀ 测试。

5.7.4 氯化汞毒性当量浓度测试

5.7.4.1 准备

根据发光抑制率测定结果（5.7.3），当样品的平均发光抑制率满足 $0\% < \overline{H}_t < 100\%$ 时，可开展氯化汞毒性当量浓度测试。氯化汞溶液系列浓度参考 GB/T 15441—1995 中“3.8 氯化汞工作液”中的相关要求，以资料性附录形式给出配制系列浓度溶液的参考方法：为建立参比物氯化汞溶液浓度与其发光抑制效应关系，需要配制不少于 7 个系列浓度的氯化汞溶液。对于非海水样品测试，可按表 10 分别移取一定体积的参比物氯化汞工作液 ($\rho = 2 \text{ mg/L}$)，用氯化钠溶液 ($\rho = 30 \text{ g/L}$) 稀释并定容至 100 mL，临用现配。对于海水样品测试，使用人工海水（表 8）代替氯化钠溶液，其余步骤同非海水样品测试中氯化汞溶液配制方法。

表 10 系列浓度氯化汞溶液配制

氯化汞工作液移取体积 (mL)	氯化汞溶液系列浓度 (mg/L)	在菌样 500 μL: 500 μL 测试体系中 氯化汞终浓度 (mg/L)
2	0.04	0.02
4	0.08	0.04
6	0.12	0.06
8	0.16	0.08
10	0.20	0.10
12	0.24	0.12
14	0.28	0.14
16	0.32	0.16
18	0.36	0.18
20	0.40	0.20
22	0.44	0.22
24	0.48	0.24

分别准备样品组和氯化汞溶液组的测试管，其中，样品组测试管可按空白对照 I、样品、阴性对照顺序排列，氯化汞溶液组测试管可按空白对照 II、氯化汞溶液系列浓度顺序排列，分别设置 2 个平行，测试管的排列方式以方便操作为宜，可参见图 15。此次两个测试组分别设置空白对照，主要是两组的菌样测试体系不同，需要不同的空白对照分别计算对应的校正因子。

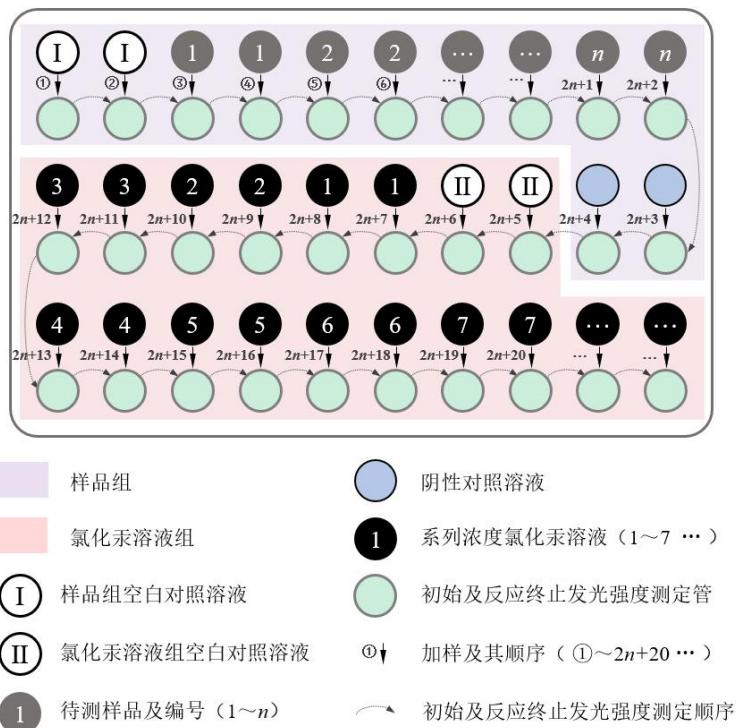


图 15 测试管排列与测定示例二（俯视图）

空白对照、样品、阴性对照、氯化汞溶液系列浓度的总数（含平行）若大于 30 个，宜将样品分批测定。

5.7.4.2 测定初始发光强度

依次移取 $100 \mu\text{L}$ 发光细菌测试液 I 加入排列好的样品组测试管中，再依次移取 $500 \mu\text{L}$ 发光细菌测试液 II 加入排列好的氯化汞溶液组测试管中，按加测试液的顺序依次将测试管放入生物发光光度计检测舱中，测定初始发光强度 (I_0)。测试管之间加发光细菌测试液和测定初始发光强度的时间间隔宜保持一致，间隔时间为 $5 \text{ s} \sim 20 \text{ s}$ 。移取不同的发光细菌测试液应更换移液器的吸液嘴。

5.7.4.3 加样

对于非海水样品，以氯化钠溶液 II ($\rho = 30 \text{ g/L}$) 作为空白对照和阴性对照；对于海水样品，对应的空白对照和阴性对照见 5.6.3 (6) 部分，以人工海水作为空白对照和阴性对照。按照 5.7.4.2 的顺序，依次分别移取 $900 \mu\text{L}$ 空白对照 I、样品 (5.6)、阴性对照加入样品组对应的测试管中，混匀，再依次分别移取 $500 \mu\text{L}$ 空白对照 II、系列浓度氯化汞溶液 (5.7.4.1) 加入氯化汞溶液组对应的测试管中，混匀。加样后即开始计时，测试管之间加样的时间间隔与 5.7.4.2 保持一致。移取不同的样品或溶液应更换移液器的吸液嘴。

5.7.4.4 测定反应终止发光强度

反应时间 $t = 15\text{min}$ 后，按照 5.7.4.2 的顺序依次测定反应终止发光强度 I_t 。

5.7.5 LID 测试

5.7.5.1 样品稀释

根据 5.7.3 测定结果, 当样品的平均发光抑制率 $\overline{H_i} < 20\%$ 时, 则无需对样品进行稀释及测试, 该样品的 LID 值为 1; 当样品的平均发光抑制率 $\geq 20\%$ 时, 参照 ISO 11348—3—2007 附录 B“基于稀释倍数 D 的系列样品制备(Dilution level D-Preparation of the dilution series)”, 按两个等比级数 (2、4、8、16、32 等, 以及 3、6、12、24 等) 的稀释倍数组合, 对样品进行稀释。将氯化钠溶液 II ($\rho = 30 \text{ g/L}$)、人工海水(表 8) 分别作为非海水样品、海水样品的稀释液, 取一定量的样品加入对应的稀释液, 分别配制稀释倍数为 2 倍和 3 倍的试样, 并按图 16 所示操作逐级稀释, 配制成表 11 中对应稀释倍数的试样。需要注意的是, 表 11 中的稀释倍数包含了测试时菌液对试样的稀释作用, 即菌样测试体系下样品的最终稀释倍数(试样体积和菌液体积均为 $500 \mu\text{L}$, 试样与菌液混合反应后, 较反应前对试样又稀释了 1 倍, 比如反应前试样稀释倍数为 2, 反应后试样的稀释倍数则为 4)。

表 11 样品的稀释

稀释倍数	试样的组成 (μL)		测试的菌样组成 (μL)	
	样品种体积 (μL)	稀释液体积 (μL)	试样体积 (μL)	发光细菌测试液体积 (μL)
空白	0	1500	500	500
2	1500	0	500	500
3	1000	500	500	500
4	750	750	500	500
6	500	1000	500	500
8	375	1125	500	500
12	250	1250	500	500
16	187.5	1312.5	500	500
24	125	1375	500	500
32	93.75	1406.25	500	500
.....

混匀后, 按箭头方向从前一个测试管中移取 $750 \mu\text{L}$ 加入后一个测试管, 并依次向后传递

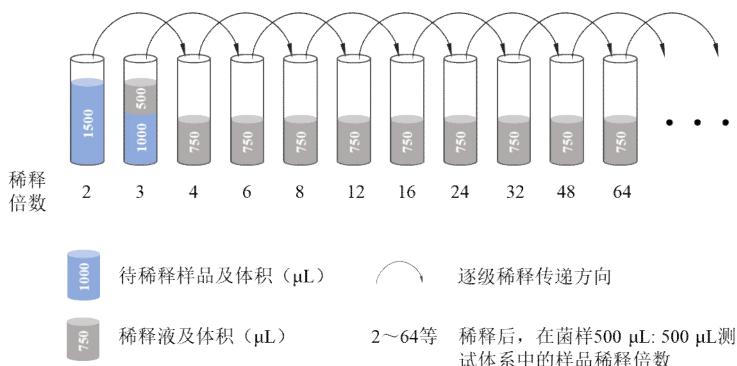


图 16 LID 测试样品逐级稀释示例（正视图，以 1500 μL 试样为例）

5.7.5.2 准备

按照空白对照、稀释序列试样、阳性对照、阴性对照的顺序排列测试管，分别设置 2 个平行，测试管的排列方式以方便操作为宜，可参见图 14。空白对照、试样、阳性对照、阴性对照的总数（含平行）若大于 30 个，宜将试样分批测定，但同一样品的稀释序列试样不可分批测定。

5.7.5.3 测定初始发光强度

依次移取 500 μL 发光细菌测试液 II 加入排列好的测试管（5.7.5.2）中，按加测试液的顺序依次将测试管放入生物发光度计检测舱中，测定初始发光强度 (I_0)。测试管之间加发光细菌测试液和测定初始发光强度的时间间隔宜保持一致，间隔时间为 5 s~20 s。

5.7.5.4 加样

对于非海水样品，以氯化钠溶液 II ($\rho = 30 \text{ g/L}$) 作为空白对照和阴性对照，以参比物氯化汞溶液 I ($\rho = 0.2 \text{ mg/L}$) 或参比物硫酸锌溶液 I ($\rho = 2.8 \text{ mg/L}$, 以 Zn^{2+} 计) 作为阳性对照；对于海水样品，对应的空白对照、阳性对照和阴性对照见 5.6.3 (6) 部分，以人工海水作为空白对照和阴性对照，以人工海水为溶剂配制的参比物氯化汞溶液 I ($\rho = 0.2 \text{ mg/L}$) 或参比物硫酸锌溶液 I ($\rho = 2.8 \text{ mg/L}$, 以 Zn^{2+} 计) 作为阳性对照。按照 5.7.5.3 的顺序，依次分别移取 500 μL 空白对照、稀释试样序列（5.7.5.1）、阳性对照、阴性对照加入对应的测试管中，混匀。加样后即开始计时，测试管之间加样的时间间隔与 5.7.5.3 保持一致。

5.7.5.5 测定反应终止发光强度

反应时间 $t = 15 \text{ min}$ 后，按照 5.7.5.3 的顺序依次测定反应终止发光强度 I_t 。

5.7.6 EC₅₀ 测试

5.7.6.1 限度试验

根据 5.7.3 结果，当样品的平均发光抑制率 $\bar{H}_t \leqslant 50\%$ 时，考虑到测试时仅 2 个平行样，自由度水平较低，为了提高结果的置信度，应进一步开展限度试验对测试结果进行验证。设置 6 个平行，按 5.7.3 步骤测定样品的发光抑制率。若平均发光抑制率 $\bar{H}_t \leqslant 50\%$ ，测试停止，该样品的 EC₅₀ 值 $\geqslant 100\%$ ；若平均发光抑制率 $\bar{H}_t > 50\%$ ，应进一步开展预试验和正式试验。

5.7.6.2 预试验

当样品的平均发光抑制率 $\bar{H}_t > 50\%$ 时，则须对样品进行稀释。以逐级稀释倍数（即等比数列的公比）为 10 配制 $\geqslant 3$ 个连续浓度的试样（如体积分数为 100%、10%、1%、0.1%、0.01% 等），按照 5.7.3.1~5.7.3.4 的要求进行测试，以确定发光抑制率 100%（或最大发光抑制率）~1% 所对应的试样浓度范围（体积分数）。测试管的排列可参见图 14。

5.7.6.3 正式试验

根据预试验确定的发光抑制率 100%（或最大发光抑制率）~1% 所对应的试样浓度范围，

在此范围内按一定逐级稀释倍数（一般≤2）对样品进行稀释，应至少选择5个等比系列浓度的试样进行正式试验。系列浓度试样中，应至少包含 $50\% < \bar{H}_t \leq 90\%$ 和 $10\% \leq \bar{H}_t < 50\%$ 的试样各1个。按照5.7.3.1～5.7.3.4的要求进行测试管准备和试样测试。空白对照、试样、阳性对照、阴性对照的总数（含平行）若大于30个，宜将试样分批测定，但同一样品的稀释系列试样不可分批测定。

5.8 结果计算与表示

根据测试体系的修改（5.7.2），参考ISO 11348—3—2007“9 结果分析（Evaluation）”对结果计算方法进行优化，与GB/T 15441—1995相比，主要修改了如下内容：①引入校正因子计算；②浓度效应曲线由简单的线性关系修改为适用性更为广泛的对数线性关系，同时也可采用概率单位分析、逻辑斯蒂分析等非线性回归方法计算。有研究从统计学角度出发，对各种计算半数效应浓度的方法进行了比较，结果表明各种方法计算结果之间无显著性差异，因此实际工作中可选择较为简便的方法进行计算^[68]。根据发光细菌急性毒性响应关系来说，GB/T 15441—1995仅给出了基于氯化汞浓度与相对发光率的线性关系，但是根据实际测试，并非所有化学物质或试样的毒性效应关系均符合线性关系，相对而言对数线性关系更有普适性；③增加LID确定方法。具体详见5.8.1～5.8.4。

5.8.1 发光抑制率的计算

根据空白对照的发光强度变化，按公式（5）计算校正因子 f_{kt} 。

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_{k0}} \quad (5)$$

式中： f_{kt} ——经过反应时间 t 后，空白对照的校正因子；

I_{kt} ——经过反应时间 t 后，空白对照的反应终止发光强度；

I_{k0} ——空白对照的初始发光强度。

根据校正因子 f_{kt} 的平行测定结果，按算术平均计算平均校正因子 \bar{f}_{kt} ，保留至小数点后2位。

按公式（6）计算试样、阳性对照、阴性对照、参比物溶液测试的初始发光强度 I_0 的校正值 I_{ct} ：

$$I_{ct} = I_0 \times \bar{f}_{kt} \quad (6)$$

式中： I_{ct} ——经校正因子校正后的初始发光强度；

I_0 ——未经校正的初始发光强度。

按公式（7）和公式（8）分别计算试样、阳性对照、阴性对照、参比物溶液测试的相对发光率和发光抑制率：

$$T_t = \frac{I_t}{I_{ct}} \times 100\% \quad (7)$$

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} \times 100\% \quad (8)$$

式中： T_t ——经过反应时间 t 后的相对发光率；

H_t ——经过反应时间 t 后的发光抑制率；

I_t ——经过反应时间 t 后的反应终止发光强度。

根据相对发光率 T_t 和发光抑制率 H_t 的平行测定结果, 按算术平均计算平均相对发光率 \bar{T}_t 和平均发光抑制率 \bar{H}_t , 结果最多保留 3 位有效数字。

5.8.2 氯化汞毒性当量浓度的计算

按公式 (9) 和 (10) 开展参比物氯化汞溶液浓度与其发光抑制效应的线性回归分析:

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{\bar{T}_t} \quad (9)$$

式中: Γ_t ——经过反应时间 t 后, 平均发光抑制率与平均相对发光率的比值。

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + a \quad (10)$$

式中: c_t ——参比物氯化汞溶液浓度, mg/L;

b ——线性回归曲线的斜率;

a ——线性回归曲线的截距。

当 \bar{T}_t 和 \bar{H}_t 为 $\leq 0\%$ 或 $\geq 100\%$ 时, 则无法计算 $\lg \Gamma_t$ 值。因此, 通常使用在 $10\% \sim 90\%$ 之间的 \bar{T}_t 和 \bar{H}_t 值进行线性回归分析。

按公式 (11) ~ (13), 分别计算斜率 b 、截距 a 和相关系数 r 。

$$b = \frac{\sum (\lg \Gamma_t - \bar{\lg \Gamma}_t)(\lg c_t - \bar{\lg c}_t)}{\sum (\lg \Gamma_t - \bar{\lg \Gamma}_t)^2} \quad (11)$$

$$a = \bar{\lg c}_t - b \bar{\lg \Gamma}_t \quad (12)$$

$$r = \frac{\sum (\lg \Gamma_t - \bar{\lg \Gamma}_t)(\lg c_t - \bar{\lg c}_t)}{\sqrt{\sum (\lg \Gamma_t - \bar{\lg \Gamma}_t)^2 \sum (\lg c_t - \bar{\lg c}_t)^2}} \quad (13)$$

式中: $\bar{\lg \Gamma}_t$ —— $\lg \Gamma_t$ 的算术均值;

$\bar{\lg c}_t$ —— $\lg c_t$ 的算术均值。

当 $\Gamma_t = 1.00$ 时的 c_t 值即为氯化汞在反应时间 t 条件下的 EC₅₀ 值, 对应的 95% 置信区间按公式 (14) ~ (15) 计算, 结果保留 2 位有效数字。

$\lg \text{EC}_{50}$ 的标准误差 ($\text{SE}_{\lg \text{EC}_{50}}$) 按式 (14) 计算:

$$\text{SE}_{\lg \text{EC}_{50}} = \sqrt{\frac{\sum (\lg c_t - \bar{\lg c}_t)^2}{n-2}} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(-\bar{\lg \Gamma}_t)^2}{\sum (\lg \Gamma_t - \bar{\lg \Gamma}_t)^2}} \quad (14)$$

式中: $\widehat{\lg c}_t$ ——基于线性回归方程及 $\lg \Gamma_t$ 测试值计算得到的预测值;

n ——线性回归分析的拟合数据点数量。

EC₅₀ 的 95% 置信区间 (95%CI) 按公式 (15) 计算:

$$95\% \text{CI} = 10^{a \pm t_{0.025,n-2} \times \text{SE}_{\lg \text{EC}_{50}}} \quad (15)$$

式中: $t_{0.025,n-2}$ ——置信度 95% ($\alpha=0.05$) 及自由度 $n-2$ 时的临界值, 查表 12。

表 12 t 分布表

$n-2$	$t_{0.025}$	$n-2$	$t_{0.025}$
1	12.7062	9	2.2622
2	4.3027	10	2.2281
3	3.1824	11	2.2010
4	2.7764	12	2.1788
5	2.5706	13	2.1604
6	2.4469	14	2.1448
7	2.3646	15	2.1314
8	2.3060	16	2.1199

根据拟合数据点数量 n , 查线性回归分析显著性检验表 (表 13), 若 $P \leq 0.01$ 且氯化汞的 $15 \text{ min } EC_{50} = 0.10 \text{ mg/L} \pm 0.02 \text{ mg/L}$, 则结果有效, 否则应检查测定和数据统计过程。此外, 也可使用统计软件等商业化工具, 直接计算线性回归分析的相关参数, 包括斜率 b 、截距 a 、相关系数 r 、 EC_{50} 及其 95% 置信区间等。

表 13 相关系数检验表

$n-2$	$P \leq 0.05$ 时 $ r $ 的临界值 (\geq)	$P \leq 0.01$ 时 $ r $ 的临界值 (\geq)
1	0.997	1.000
2	0.950	0.990
3	0.878	0.959
4	0.811	0.917
5	0.754	0.874
6	0.707	0.834
7	0.666	0.798
8	0.632	0.765
9	0.602	0.735
10	0.576	0.708
11	0.553	0.684
12	0.532	0.661
13	0.514	0.641
14	0.497	0.623
15	0.482	0.606

当 $0\% < \overline{H}_{t\text{样品}} \text{ (或 } \overline{T}_{t\text{样品}} \text{) } < 100\%$ 时, 按公式 (9) 计算样品的 $\Gamma_{t\text{样品}}$, 按公式 (16) 计算样品的氯化汞毒性当量浓度, 结果保留 2 位有效数字:

$$c_t = 10^{b \lg \Gamma_{t\text{样品}} + a} \quad (16)$$

当 $\overline{H}_{t\text{样品}} \leq 0\%$ (或 $\overline{T}_{t\text{样品}} \geq 100\%$) 或 $\overline{H}_{t\text{样品}} = 100\%$ (或 $\overline{T}_{t\text{样品}} = 0\%$) 时, 无法计算氯化汞毒性当量浓度。

5.8.3 LID 的确定

$\overline{H}_t < 20\%$ 时的最低稀释倍数，即为最低无效应稀释倍数 LID。

5.8.4 EC₅₀ 的计算

EC₅₀ 的计算可按公式（9）和（10）开展样品体积分数与其发光抑制效应关系的线性回归分析，根据线性回归曲线的相关系数 r 及拟合数据点数量 n ，查显著性检验表，若 $P \leq 0.05$ ，则结果有效，否则应检查测定和数据统计过程。当 $\Gamma_t = 1.00$ 时的 c_t 值即为反应时间 t 条件下的 EC₅₀ 值，并按公式（14）～（15）计算其 95% 置信区间，以样品的体积分数表示，结果最多保留 3 位有效数字。参考 ISO 11348—3—2007，也可采用概率单位分析、逻辑斯蒂分析等非线性回归方法计算 EC₅₀ 及其 95% 置信区间。

若数据不充分，无法计算或不需要计算 EC₅₀ 时，应报告最大发光抑制率对应的最低浓度或发光抑制率 $< 20\%$ 对应的最高浓度，以样品的体积分数表示，结果最多保留 3 位有效数字。

5.9 方法特性指标

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168—2020）要求，结合水质发光细菌急性毒性方法特点，选取参比物模拟样品及实际样品开展实验室内精密度验证。

5.9.1 自制参比物模拟样品

对 $\rho = 0.08 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.12 \text{ mg/L}$ 的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平均测定 6 次，发光抑制率分别为 33.8%～48.2%、50.9%～67.3%、79.9%～92.7%，相对标准偏差分别为 13%、9.8%、5.6%。

对 $\rho = 0.08 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.12 \text{ mg/L}$ 的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，LID 分别为 2、2、2，相对标准偏差分别为 0%、0%、0%。

对参比物氯化汞溶液和硫酸锌溶液分别进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，参比物氯化汞 15 min EC₅₀ 为 0.084 mg/L～0.12 mg/L，相对标准偏差为 13%；参比物硫酸锌（以 Zn²⁺计）15 min EC₅₀ 为 1.1 mg/L～1.6 mg/L，相对标准偏差为 14%。

5.9.2 实际样品

对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水（综合废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平均测定 6 次，相对发光率分别为 82.7%～96.3%、91.8%～101%、99.9%～108%、56.3%～79.8%、53.9%～59.5%，相对标准偏差分别为 5.5%、3.8%、2.6%、12%、3.9%。

对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水（制药废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，LID 分别为 1、1、1、2～4、48～96，相对标准偏差分别为 0%、0%、0%、31%、30%。

对工业废水（综合废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，氯化汞毒性当量浓度为 0.091 mg/L～0.094 mg/L，相对标准偏差为 1.3%。

对工业废水（制药废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次， EC_{50} 为3.1%~9.1%，相对标准偏差为30%。

表 14 实验室内自制模拟样品精密度测试

平行号	发光抑制率 (%)			LID (无量纲)			EC ₅₀ (mg/L)	
	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (以Zn ²⁺ 计)
							95%置信区间	95%置信区间
1	44.2	67.3	92.7	2	2	2	0.084	1.6
							0.072~0.097	1.5~1.7
2	48.2	50.9	83.8	2	2	2	0.096	1.5
							0.087~0.105	1.4~1.6
3	40.4	61.2	85.7	2	2	2	0.090	1.3
							0.079~0.10	1.2~1.4
4	41.1	67.1	88.8	2	2	2	0.097	1.6
							0.084~0.11	1.2~2.2
5	33.8	60.8	79.9	2	2	2	0.12	1.4
							0.10~0.14	1.1~2.2
6	37.0	59.6	81.3	2	2	2	0.095	1.1
							0.086~0.11	1.0~1.4
平均值 \bar{x}	40.8	61.2	85.4	2	2	2	0.10	1.4
标准偏差 S	5.1	6.0	4.8	0	0	0	0.012	0.19
相对标准偏差 RSD (%)	13	9.8	5.6	0	0	0	13	14

表 15 实验室内实际样品精密度测试

平行号	相对发光率(%)					LID(无量纲)				HgCl ₂ 当量浓度(mg/L)	EC ₅₀ (体积分数%)	
	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水(综合废水)	地表水	地下水	海水	生活污水		95%置信区间	
1	96.3	101	104	56.3	54.7	1	1	1	4	96	0.094	
											3.1 2.7~3.5	
2	87.0	91.0	103	73.5	53.9	1	1	1	2	48	0.094	
											7.8 7.2~8.4	
3	88.2	96.6	102	69.1	57.8	1	1	1	3	48	0.092	
											7.7 5.8~10.3	
4	82.7	93.4	108	65.5	58.2	1	1	1	3	48	0.092	
											8.5 6.3~11.4	
5	86.0	95.1	102	74.2	55.4	1	1	1	2	64	0.093	
											9.1 8.4~9.8	
6	84.1	91.8	99.9	79.8	59.5	1	1	1	2	64	0.091	
											8.6 7.6~9.9	
平均值 \bar{x}	87.4	94.8	103	69.7	56.6	1	1	1	2.7	61	0.093	7.5
标准偏差 S	4.8	3.6	2.7	8.2	2.2	0	0	0	0.82	19	0.001	2.2
相对标准偏差 RSD (%)	5.5	3.8	2.6	12	3.9	0	0	0	31	30	1.3	30

5.10 质量保证和质量控制

受试发光细菌、仪器设备、测试过程及结果应符合下列要求，结果方为有效。否则，应查明原因后重新进行测试。

5.10.1 校正因子

校正因子是对受试发光细菌在测试过程中发光稳定性的控制指标，GB/T 15441—1995未考虑发光稳定性。参考 ISO 11348—3—2007 中“11 有效性标准要求 (Criteria of validity)”关于校正因子的控制要求“15 min 或 30 min 的校正因子均值应介于 0.6~1.8 (the \bar{f}_{kt} -value for 15 min or 30 min incubation ranges between 0.6 and 1.8.)”，本标准基于明亮发光杆菌 T3 的 \bar{f}_{kt} 进行统计分析，以确定合理分布范围。由 \bar{f}_{kt} 的分布频率统计图可知，明亮发光杆菌 T3 的 \bar{f}_{kt} 值 5%~95% 分位数区间为 0.622~0.980。虽然本标准的校正因子验证数据的主要分布区间较 ISO 标准的 0.6~1.8 窄，但是鉴于国内菌种的商业化水平和质量控制等尚处于起步阶段，因此本标准将校正因子的有效范围区间参考 ISO 标准的相关要求：反应时间 15 min 的校正因子应符合 $0.6 \leq \bar{f}_{kt} \leq 1.8$ ，同时控制其平行测定结果的相对偏差应 $\leq 15\%$ 。

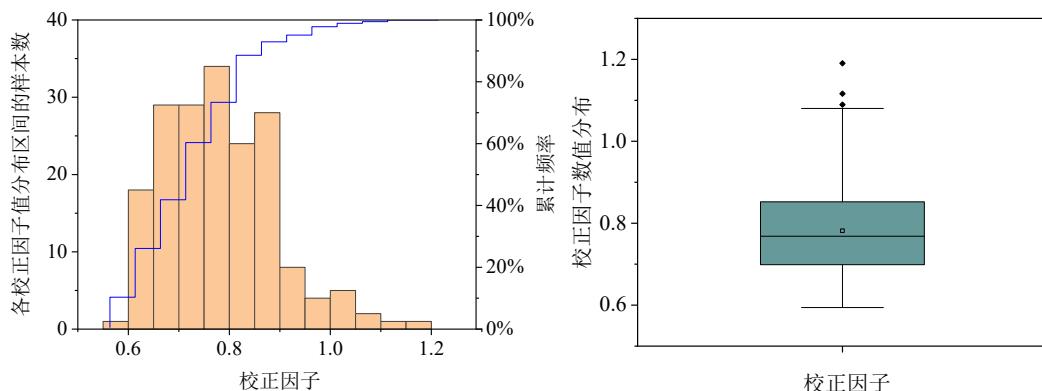


图 17 明亮发光杆菌 T3 的 \bar{f}_{kt} 分布范围统计

5.10.2 阳性对照

阳性对照控制是对测试过程响应敏感性、有效性的控制指标。GB/T 15441—1995 中关于参比物溶液的控制要求为：当氯化汞溶液浓度为 0.10 mg/L 时，发光细菌的相对发光率为 50%±10%。但是国标方法并未将该溶液作为测试过程的控制条件，测试过程未要求设置 0.10 mg/L 氯化汞的毒性测试，而是作为仪器生物发光光度计的要求指标，并不合理。参考 ISO 11348—3—2007 中“11 有效性标准要求 (Criteria of validity)”描述“对于受试发光细菌，3 种参比物对其发光抑制率应介于 20%~80% (for the batch of bacteria delivered, the three reference substances cause 20 % to 80 % inhibition)”，即指定浓度的参比物溶液（阳性对照）的发光抑制率范围为 20%~80%，本标准将在菌液试样测试体系中的终浓度为 0.10 mg/L 的氯化汞溶液或终浓度为 1.4 mg/L (以 Zn²⁺计) 的硫酸锌溶液（根据 5.10.5 验证）作为阳性对照，测定其发光抑制率的正常分布范围。结果显示，氯化汞阳性对照的发光抑制率 5%~95% 分位数范围为 31.70%~79.92%，硫酸锌阳性对照的发光抑制率 5%~95% 分位数范围为 36.2%~63.4%，考虑到发光抑制率理论上应呈一定的区间对称性，参考 ISO 标准中对阳性

对照的发光抑制率范围为 20%~80%，本标准规定以参比物氯化汞终浓度 0.10 mg/L 的阳性对照或以 Zn²⁺终浓度 1.4 mg/L 的阳性对照发光抑制率应符合 20%≤H_t≤80%。

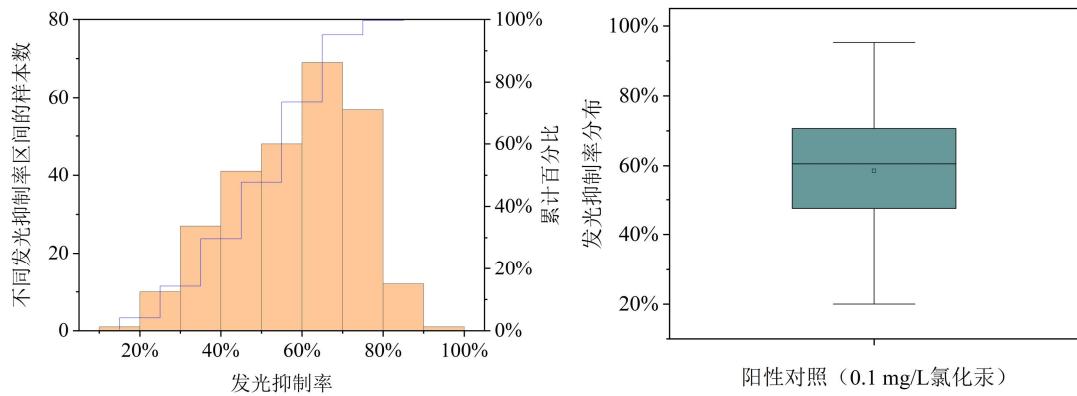


图 18 氯化汞阳性对照对应的发光抑制率分布范围统计

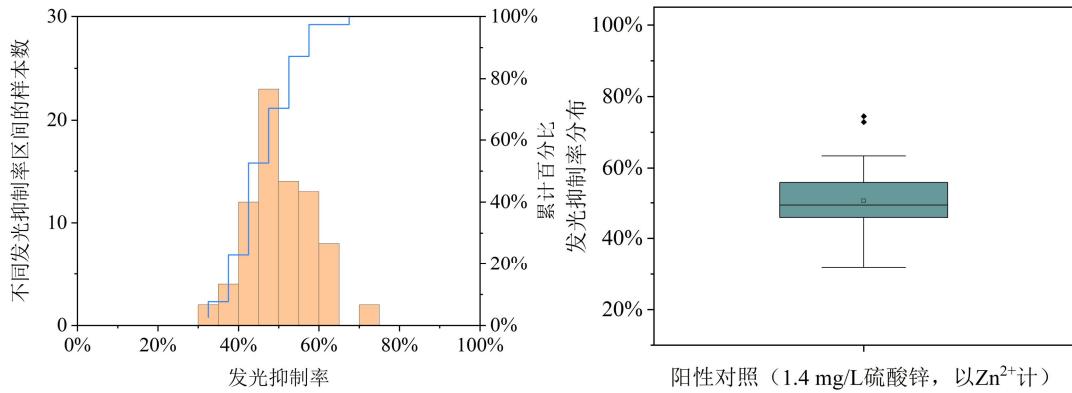


图 19 硫酸锌阳性对照对应的发光抑制率分布范围统计

5.10.3 阴性对照

阴性对照控制也是对测试过程响应敏感性、有效性的控制指标，与阳性对照相互补充。GB/T 15441—1995 和 ISO 11348—3—2007 均未对阴性对照的发光抑制率结果提出质控要求，但是编制组梳理了国内毒性测试的相关标准发现，其均对阴性对照测试结果提出了控制要求，即抑制效应不超过 10%，比如《化学品 丽斑麻蜥急性经口毒性试验》(GB/T 44480—2024) 中规定“试验结束时，对照组死亡率不得超过 10%”，《化学品 稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验》(GB/T 44396—2024) 中规定“试验结束时，空白对照组胚胎存活率不小于 90%”，《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》(HJ 1069—2019) 中规定“培养 48 h 后，阴性对照组鱼卵存活率 90%”。另外，正在制订的《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》(1158)、《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》(992) 征求意见稿对阴性对照的要求分别是“阴性对照中活动受到抑制的受试生物数量≤10%”、“阴性对照中受试生物死亡率≤10%”。因此，本标准初步拟将阴性对照的发光抑制率控制不高于±10%范围，并开展验证。阴性对照测试结果显示（图 20），阴性对照的发光抑制率 5%~95% 分位数范围为 -10.40%~11.88%。本标准的阴性对照发光抑制率的有效范围取为 -10%≤H_t≤10%。

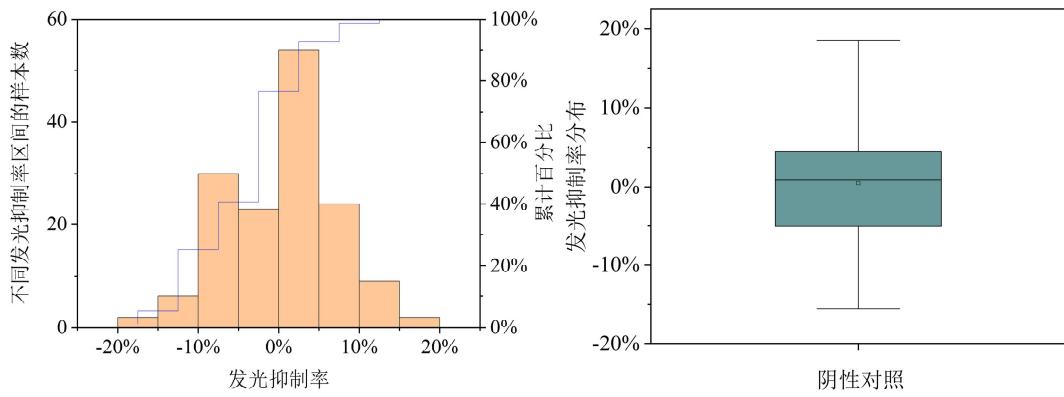


图 20 阴性对照对应的发光抑制率分布范围统计

5.10.4 平行测定

GB/T 15441—1995 中规定“样品 3 次重复测定结果的相对偏差应不大于 15%”。考虑到相对发光率在低值时的离散程度较大，高值时则离散程度较小，因此对任意试样相对发光率的平行测定给出统一的精密度控制要求并不可行。由于同一个试样同一次测定的相对发光率和发光抑制率为互补关系（两者之和为 100%），避免高低值对精密度计算的影响，本标准将其修改完善为“相对发光率或发光抑制率平行测定结果的相对偏差应≤15%”，即两者之一的精密度满足要求即可。实验室间验证结果显示，相对发光率或发光抑制率平行测定结果的相对偏差范围为 5.2%~8.3%，实验室内相对偏差范围为 0~14.9%，因此可以继续沿用 GB/T 15441—1995 的平行测定控制要求，并修改完善表述为：相对发光率或发光抑制率平行测定结果的相对偏差应≤15%。

5.10.5 参比物 EC₅₀

GB/T 15441—1995 中在“8.1 用氯化汞浓度表达样品毒性”要求 EC₅₀_{氯化汞}=0.10 mg/L±0.02 mg/L，即 0.08 mg/L~0.12 mg/L。本标准统计验证数据，氯化汞 EC₅₀ 的 5%~95% 分位数范围为 0.080 mg/L~0.114 mg/L，符合 GB/T 15441—1995 的控制要求。因此，本标准沿用此控制范围，即氯化汞毒性当量浓度测试中，参比物氯化汞的 15 min EC₅₀ 应在 0.08 mg/L~0.12 mg/L 范围内。

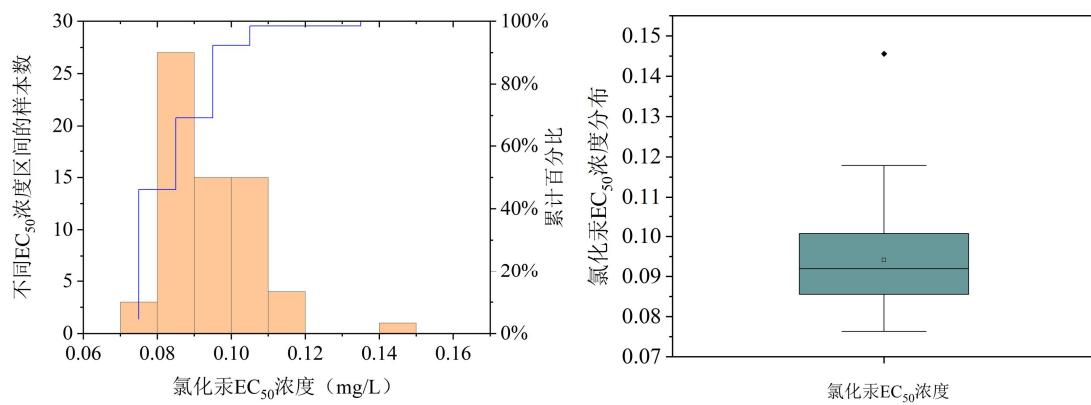


图 21 氯化汞 EC₅₀ 结果分布范围统计

为了与国际标准方法接轨,根据征求意见稿技术审查专家意见要求,本标准开展了参比物硫酸锌的 EC₅₀ 分布范围验证试验,通过实验室内和实验室间分析,累计获得 78 组有效的硫酸锌浓度与明亮发光杆菌 T3 发光抑制效应关系回归曲线,计算结果显示:七水合硫酸锌 15 min EC₅₀ 的均值为 6.1 mg/L, 5%~95% 分位数范围为 4.3 mg/L~8.9 mg/L, 以 Zn²⁺ 计的 15 min EC₅₀ 的均值为 1.4 mg/L, 5%~95% 分位数范围为 1.0 mg/L~2.0 mg/L。此外,使用人工海水配制硫酸锌溶液,累计获得 18 组实验室内的硫酸锌浓度与明亮发光杆菌 T3 发光抑制效应关系回归曲线,统计结果表明,其 15min EC₅₀ 均在以上分布范围内,因此海水样品的阳性对照控制要求可与其他样品统一。

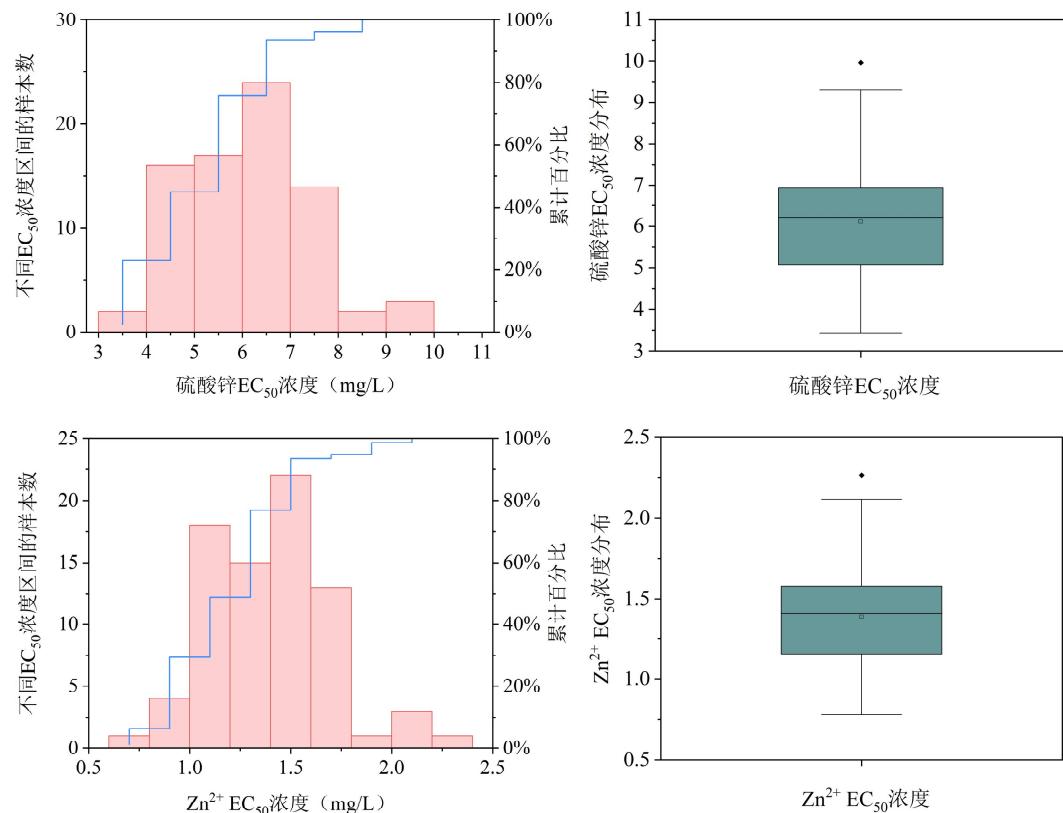


图 22 硫酸锌 EC₅₀ 结果分布范围统计

将基于明亮发光杆菌 T3 测得的硫酸锌 15 min EC₅₀ 及其分布情况与国外基于费氏弧菌测得的主要结果进行对比分析,结果显示:EC₅₀ 均值方面,本标准测定结果与国际方法测定结果较接近,略低于 ISO 标准中基于 13 家实验室的比对结果(30 min,冻干粉复苏液中添加了 K⁺、Mg²⁺ 等离子,提高了受试菌种的耐受性),与国际实验室间比对验证(国内仅本标准承担单位参加,其余 18 家均为国外实验室,验证结果为“合格 acceptable”)的结果较为一致;EC₅₀ 结果的分布方面,本标准测定结果的分布较 ISO 方法和国际比对要更窄(分布范围、标准偏差、相对标准偏差),可能是验证实验室数量差异所致。与国内的一些测定结果相比,国内相关方法中的统计信息较少,就分布范围而言,本标准与台湾标准较接近,而原国家海洋局测定结果的分布范围相对宽泛。综上,本标准基于明亮发光杆菌 T3 测得的硫酸锌 15 min EC₅₀ 与国际主流方法测定结果具有较好的可比性,但仍需要在组织国内实验室开展比对验证方面进行更多的积累,以获取更丰富且更具代表性的验证样本。

表 16 明亮发光杆菌对参比物硫酸锌的敏感响应分析及与国内外主要结果比较

编号	数据来源	实验室 数量	15 min EC ₅₀ (以 Zn ²⁺ 计, mg/L)		标准偏差 (mg/L)	相对标准 偏差
			均值	分布范围		
1	本标准 (明亮发光杆菌 T3, 15 min)	7	1.4	1.0~2.0	0.29	21.1%
2	ISO (费氏弧菌, 30 min)	13	2.2	/	0.73	33.6%
3	参加国际比对 (费氏弧菌, 15 min)	19	1.6	0.69~3.4	0.67	42.3%
4	台湾标准 (费氏弧菌, 15 min)	/	/	1.1~2.7	/	/
5	海环字(2015)29号 (费氏弧菌, 15 min)	/	/	0.6~6.0	/	/

5.11 测试报告

测试报告应包含以下内容：样品的类型、来源、理化特性（色、嗅、pH 值、溶解氧等）、采样方法及采样时间、保存方法及保存时间；样品干扰消除（颜色、颗粒物）及前处理（温度、pH 值、溶解氧、盐度调节）方法；受试发光细菌名称、来源、批号，冻干粉复苏及测试液准备方法；仪器设备型号、状态以及温控等测试条件；测试结果（发光抑制率或相对发光率、氯化汞毒性当量浓度、LID 或 EC₅₀ 等）及计算方法；质量保证和质量控制要求的符合性；其他对测试过程和结果具有重要影响的信息。

6 方法比对

6.1 方法比对方案

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)的规定，选取典型样品，将本标准与《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)进行方法比对。

针对本标准的适用范围，选择地表水、地下水、工业废水、生活污水、海水实际样品开展两种方法的比对试验，根据 GB/T 15441—1995 和本标准的毒性结果表示指标，选择氯化汞毒性当量浓度进行方法对比，若无法计算氯化汞毒性当量浓度，则以发光抑制率进行方法比对。对每类实际样品采集至少 7 个浓度水平接近的样品，分别采用 GB/T 15441—1995 标准方法与本标准方法进行样品测定，获得至少 7 组配对测定数据，采用配对样本 *t* 检验法判定两种方法的测定结果是否具有显著差异。

6.2 方法比对过程及结论

6.2.1 比对过程

分别采集某河流断面样品作为地表水样品，某宾馆点位样品作为地下水样品，某工业污水处理厂出口、某电镀厂污水排口样品作为工业废水样品，某生活污水处理厂出口样品作为

生活污水样品，某海湾海水作为海水样品，根据 HJ 168—2020 要求，将本标准与 GB/T 15441—1995 进行方法比对，对比结果见表 17。

表 17 本标准与 GB/T 15441—1995 方法比对测定结果汇总

样品类型	样品名称	氯化汞毒性当量浓度 (mg/L)		配对差值 d	P 值
		GB/T 15441	本标准		
地表水	某河流-1	0.041	0.010	0.031	0.621
	某河流-2	0.037	0.074	-0.037	
	某河流-3	0.023	0.020	0.003	
	某河流-4	0.018	0.046	-0.028	
	某河流-5	0.024	0.020	0.004	
	某河流-6	0.035	0.041	-0.006	
	某河流-7	0.052	0.050	0.002	
地下水	某宾馆-1	0.084	0.084	0	0.429
	某宾馆-2	0.093	0.087	0.006	
	某宾馆-3	0.071	0.080	-0.009	
	某宾馆-4	0.092	0.086	0.006	
	某宾馆-5	0.074	0.080	-0.006	
	某宾馆-6	0.076	0.084	-0.008	
	某宾馆-7	0.078	0.081	-0.003	
工业废水	某工业污水厂出口-1	0.12	0.10	0.020	0.633
	某工业污水厂出口-2	0.12	0.099	0.021	
	某工业污水厂出口-3	0.12	0.10	0.020	
	某工业污水厂出口-4	0.096	0.086	0.010	
	某工业污水厂出口-5	0.096	0.091	0.005	
	某工业污水厂出口-6	0.12	0.097	0.023	
	某工业污水厂出口-7	0.096	0.088	0.008	
	某电镀厂污水排口-1	0.052	0.070	-0.018	
	某电镀厂污水排口-2	0.052	0.065	-0.013	
	某电镀厂污水排口-3	0.057	0.071	-0.014	
	某电镀厂污水排口-4	0.057	0.073	-0.016	
	某电镀厂污水排口-5	0.033	0.020	0.013	
	某电镀厂污水排口-6	0.045	0.054	-0.009	
	某电镀厂污水排口-7	0.056	0.076	-0.02	

样品类型	样品名称	氯化汞毒性当量浓度 (mg/L)		配对差值 d	P 值
		GB/T 15441	本标准		
生活污水	某生活污水厂出口-1	0.11	0.092	0.018	0.687
	某生活污水厂出口-2	0.078	0.082	-0.004	
	某生活污水厂出口-3	0.087	0.095	-0.008	
	某生活污水厂出口-4	0.094	0.086	0.008	
	某生活污水厂出口-5	0.077	0.076	0.001	
	某生活污水厂出口-6	0.066	0.071	-0.005	
	某生活污水厂出口-7	0.11	0.11	0	
海水	某海湾-1	/ (-4.2%)	/ (-5.9%)	/ (1.7%)	0.177
	某海湾-2	/ (-2.7%)	/ (-2.4%)	/ (-0.3%)	
	某海湾-3	/ (-1.5%)	/ (-2.1%)	/ (0.6%)	
	某海湾-4	/ (-7.7%)	/ (-5.1%)	/ (-2.6%)	
	某海湾-5	/ (-1.9%)	/ (-4.6%)	/ (2.6%)	
	某海湾-6	0.027 (0.1%)	/ (-4.4%)	/ (4.5%)	
	某海湾-7	/ (-2.0%)	/ (-12.7%)	/ (10.7%)	
注：部分海水样品发光抑制率<0，无法计算氯化汞毒性当量浓度，以“/ (发光抑制率)”表示，对应的 P 值为基于发光抑制率结果的 t 检验结果。					

6.2.2 比对结论

基于配对样本 t 检验结果显示，按本标准与 GB/T 15441—1995 方法分别测定的地表水、地下水、工业废水、生活污水、海水等实际样品的发光细菌急性毒性（氯化汞毒性当量浓度或发光抑制率）均无显著性差异， P 值分别为 0.621、0.429、0.633、0.687、0.177，均 >0.05 （表 17）。

7 方法验证

7.1 方法验证方案

7.1.1 验证实验室和验证人员

参加验证的实验室及人员基本情况、仪器使用情况及试剂使用情况见表 18。

表 18 参加验证的人员情况登记表

编号	验证单位	姓名	性别	职务或职称	从事相关分析工作年限
1	上海市环境监测中心	朱梦杰	男	高级工程师	18 年

编号	验证单位	姓名	性别	职务或职称	从事相关分析工作年限
		郁斯贻	女	工程师	5 年
2	江苏省环境监测中心	杨雅楠	女	高级工程师	8 年
		卜亚谦	男	工程师	3 年
3	浙江省生态环境监测中心	于海燕	女	正高级工程师	29 年
		周胜利	男	高级工程师	12 年
4	江苏省苏州环境监测中心	徐恒省	男	正高级工程师	26 年
		李继影	女	正高级工程师	17 年
		景明	男	高级工程师	12 年
5	江苏省泰州环境监测中心	黄辉	男	高级工程师	16 年
		孙海涛	女	高级工程师	10 年
6	江苏省淮安环境监测中心	杨子毅	女	高级工程师	14 年
		俞蕴馨	女	工程师	3 年

7.1.2 验证方案

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)和《国家生态环境标准制修订工作规则》(国环规法规〔2020〕4号)的要求,组织6家及以上通过计量认证或实验室认可、具备验证条件的实验室进行验证,实验室应覆盖全国各地理区域(或典型环境条件),并充分考虑仪器的覆盖性和全国环境监测机构的各类水平。本标准实验室间验证使用统一样品,由于样品保存等限制,且实验验证主要集中在2022年,处于疫情防控时期,人员流动、物流等方面受限,因此就近选择长三角地区环境监测部门进行验证。

精密度验证:6家验证实验室分别对不同浓度氯化汞溶液(0.08 mg/L、0.10 mg/L、0.12 mg/L)统一样品进行了明亮发光杆菌T3的急性毒性测定,每个样品测定6次,发光细菌急性毒性测试结果以发光抑制率和LID表征。对氯化汞、硫酸锌的EC₅₀进行测定,结果以15 min EC₅₀(mg/L)表征。6家验证实验室对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水(综合废水、制药废水)的统一实际样品进行测定,发光细菌急性毒性测试结果分别以相对发光率(%)、LID表征,同时对符合条件的典型样品进行氯化汞毒性当量浓度、EC₅₀测定,其中工业废水(综合废水)还以氯化汞毒性当量浓度表征,工业废水(制药废水)还以EC₅₀(体积分数,%)表征。

方法有效性及敏感性验证:6家验证实验室对方法的有效性及敏感性进行验证,使用阴性对照、阳性对照和参比物溶液等统一样品分别进行测定。

7.2 方法验证过程

7.2.1 验证过程

(1)首先,通过筛选确定有资质和相关能力的方法验证单位,在方法验证前,编制组

通过各种交流形式让参加验证的操作人员都熟悉本标准的方法原理、操作步骤及流程。验证过程中使用的仪器、设备、试剂等应符合方法的要求。

(2) 编制组根据实验时间验证的要求准备验证统一样品等，确定验证时间。

(3)《方法验证报告》见附件一。

7.2.2 验证结论

(1) 验证过程中6家验证实验室无报告异常值的情况。

(2) 精密度：

6家实验室分别对 $\rho = 0.08 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.12 \text{ mg/L}$ 的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，发光抑制率分别为21.8%~43.5%、35.3%~79.9%、85.1%~99.5%，实验室内相对标准偏差分别为4.3%~16%、3.5%~11%、0.26%~3.8%，实验室间相对标准偏差分别为13%、27%、2.9%，重复性限分别为11%、9.0%、4.6%，再现性限分别为16%、40%、9.0%。

6家实验室分别对 $\rho = 0.08 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.12 \text{ mg/L}$ 的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，LID分别为2、2、2，实验室内相对标准偏差分别为0%、0%、0%，实验室间相对标准偏差分别为0%、0%、0%，重复性限为0、0、0，再现性限为0、0、0。

6家实验室分别对参比物氯化汞溶液和硫酸锌溶液分别进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，参比物氯化汞EC₅₀为0.082 mg/L~0.12 mg/L，实验室内相对标准偏差为6.3%~14%，实验室间相对标准偏差为2.8%，重复性限为0.025 mg/L，再现性限为0.024 mg/L；参比物硫酸锌(以Zn²⁺计)EC₅₀为1.0 mg/L~2.0 mg/L，实验室内相对标准偏差为5.0%~18%，实验室间相对标准偏差为21%，重复性限为0.48 mg/L，再现性限为0.91 mg/L。

6家实验室分别对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水(综合废水)进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，相对发光率分别为84.5%~105%、80.1%~108%、80.2%~106%、58.7%~79.8%、51.7%~78.6%，实验室内相对标准偏差分别为2.1%~6.6%、2.7%~11%、2.0%~6.3%、4.6%~9.2%、1.9%~15%，实验室间相对标准偏差分别为5.2%、5.3%、6.2%、6.2%、7.5%，重复性限分别为12%、17%、14%、13%、16%，再现性限分别为17%、21%、20%、17%、19%。

6家实验室分别对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水(制药废水)进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，LID分别为1、1、1、2~4、32~64，实验室内相对标准偏差分别为0%、0%、0%、0%~31%、13%~22%，实验室间相对标准偏差分别为0%、0%、0%、17%、13%，重复性限分别为0、0、0、1.6、22，再现性限分别为0、0、0、1.9、26。

6家实验室分别对工业废水(综合废水)进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，氯化汞毒性当量浓度为0.083 mg/L~0.10 mg/L，实验室内相对标准偏差为0%~4.9%，实验室间相对标准偏差分别为6.2%，重复性限为0.0065 mg/L，再现性限为0.017 mg/L。

6家实验室分别对工业废水(制药废水)进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，EC₅₀为1.4~5.9%，实验室内相对标准偏差为6.4%~40%，实验室间相对标准偏

差为47%，重复性限为2.1%，再现性限为4.4%。

(3) 有效性及敏感性：

6家实验室对参比物氯化汞溶液进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，阳性对照（氯化汞终浓度0.10 mg/L）的发光抑制率范围为35.3%~79.9%，满足阳性对照的发光抑制率 $20\% \leq H_t \leq 80\%$ 要求；参比物氯化汞的15 min EC₅₀在0.082 mg/L~0.12 mg/L范围内，满足参比物氯化汞的15 min EC₅₀应在0.08 mg/L~0.12 mg/L范围内的要求。

6家实验室对参比物硫酸锌溶液进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，阳性对照（Zn²⁺终浓度1.4 mg/L）的发光抑制率范围为35.8%~60.9%，满足阳性对照的发光抑制率 $20\% \leq H_t \leq 80\%$ 要求。

6家实验室对阴性对照（ $\rho = 30 \text{ g/L NaCl}$ 溶液）进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，发光抑制率为-9.5%~9.3%，满足阴性对照的发光抑制率-10%≤H_t≤10%要求。

8 与开题报告的差异说明

根据开题论证审查意见，本标准规定了水质急性毒性测定的发光细菌法，适用于地表水、地下水、工业废水、生活污水、海水、垃圾渗滤液的急性毒性测定。然而，由于垃圾的行政主管部门已变更为住房城乡建设部门，并且2024年修订的国家标准《生活垃圾填埋场污染控制标准》(GB 16889—2024)中直接排放和间接排放控制指标均未涉及水质毒性相关指标，因此将原适用范围中的垃圾渗滤液从本标准中予以去除。

9 标准征求意见稿技术审查情况

标准编制组提交征求意见稿及编制说明后，经管理单位审核及3位专家函审通过，生态环境部生态环境监测司于2025年8月4日通过线上会议方式组织召开了标准征求意见稿技术审查会，经专家质询讨论，会议通过了标准征求意见稿的技术审查，同时提出了修改完善意见。具体意见及修改落实情况详见1.2.4，编制组于2025年9月下旬提交修改完善的征求意见稿及编制说明，并按技术管理单位及监测司审核意见进一步修改完善。

10 标准实施建议

10.1 支撑生态环境管理方面

本方法标准是基于微生物种群对环境胁迫急性响应的测定试验，是系列水质生物急性毒性测定方法之一，与已发布的《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》(HJ 1069—2019)以及正在制订的《水质 用绿藻类栅藻属的 *Subspicatus* 和月牙藻属的 *Capricornutum* 做淡水藻类生长抑制试验》(1207.24)、《水质 急性毒性的测定 大型溞活动抑制法》(1158)、《水质 急性毒性的测定 斑马鱼法》(992)共同构成水生态系统不同营养级生物水质急性毒性测定方法体系，旨在以污染物浓度控制为主的生态环境目标管理体系之上，构建支撑生物效应控制目标管理体系的监测分析方法，助力我国水环境管理从理化指标达标管理向理化指标

达标和环境生物安全并重转变。通过本标准的推广应用，将有助于控制和降低水环境有毒有害物质含量，减少污染，同时有助于提高水环境生物多样性水平，保障水生态健康安全，推动绿色可持续发展。

本标准的实施可从以下方面开展：

(1) 支撑污水排放控制。制药行业废水排放标准已将水质发光细菌急性毒性纳入控制指标，本标准发布后，可将水质发光细菌急性毒性指标进一步应用至综合污水排放管理及工业行业（如农药、纺织印染、电镀、化工、电子等行业）污水排放管理，有助于识别潜在的有毒有害污染风险，及时采取措施对污染物进行综合管控，保护水生态环境高质量改善。

(2) 支撑环境质量目标管理。可将水质发光细菌急性毒性指标应用至地表水和地下水环境质量管理之中，一方面基于本标准开展水质基准推导研究，为科学制订水质标准奠定基础，另一方面可将本标准纳入水环境质量标准中，作为综合毒性控制指标，有助于全面评价水体中污染物的综合影响，更准确地评估生态环境质量，进一步保护水生生物及水生态系统健康。

(3) 支撑生态环境损害鉴定评估。在生态环境损害鉴定评估技术指南中，更新基于发光细菌的水质急性毒性调查监测技术方法和要求，以更加高效地进行生态环境损害调查和评估工作。

10.2 监测业务推广应用方面

本标准对监测软硬件条件的要求、人员专业技能、经济投入成本均不高，各级环境监测机构在购买相关试剂耗材、配备生物发光光度计以及具有开展普通生物试验所需的试剂耗材、仪器设备基础之上均可开展此项目分析。在该项目能力开发和形成过程中，应注重人员和管理，确保受试生物和主要仪器设备的质量，强调阳性、阴性等对照试验的过程控制，积累实际操作经验，不断提高其分析测试水平和监测质量，有效服务环境管理。

从资金投入来看，本标准所需受试发光细菌冻干粉（及配套复苏液）、生物发光光度计等需要额外购置，其余为实验室常用材料设备。经调研，明亮发光杆菌T3冻干粉（0.5 g/支）单支价格约850元~2000元（规格不同，可满足不低于200个试样的分析），生物发光光度计的价格区间相对较大，便携式和实验室生物发光光度计约15万元~25万元不等，自动化高通量的生物发光检测设备价格较高，通常在70万元以上。总体来看，本标准实施所需资金投入不高，适合在全国各级生态环境监测机构应用。

从现有能力基础来看，标准编制组通过问卷调查、检验检测公示查询等方法调研了国内具备发光细菌急性毒性检测相关方法、机构及地区情况，共查询到市场监督管理总局资质认定和19个省级资质认定（部分省、自治区未详细公开检验检测认定的具体能力情况，暂无法查询）共137家单位，方法依据主要有5个，其中以《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441—1995）为主，占调研总数的89.8%，其他方法依据主要包括ISO 11348—3—2007、《水和废水监测分析方法》（第四版）中的青海弧菌Q67法、《污水生物毒性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试 费歇尔弧菌法（试行）》（海环字〔2015〕29号）以及单位内部作业指导书等。从各单位性质上看，监测系统单位32家，其他事业单位4家，其余101家均为第三方检测公司；从地域上看，江苏、广东、河北、陕西、湖北等地区具备

能力的单位较多（详见图 23）。综上，本标准具有较好的推广基础和应用前景。

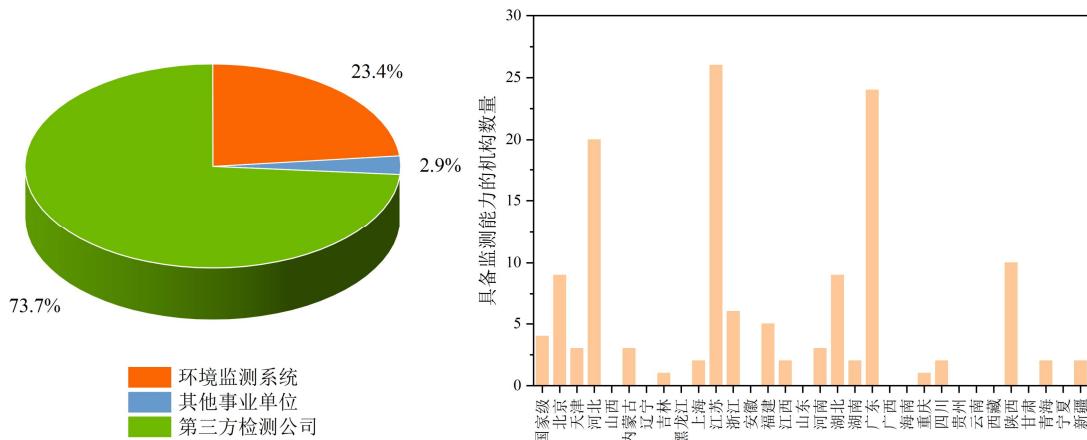


图 23 国内发光细菌急性毒性检测能力情况调研分析

11 参考文献

- [1] 美国国会. 有毒物质控制法 (Toxic Substances Control Act, TSCA) [R]. 1976.
- [2] 生态环境部. 中国现有化学物质名录[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2013.
- [3] US EPA. Policy for the development of water quality-based permit limitations for toxic pollutants [R]. Washington DC: US EPA Office of Water, 1984.
- [4] OSPAR Commission. OSPAR practical study 2005 on whole effluent assessment[R]. London, United Kingdom: OSPAR Commission, 2007.
- [5] 余若祯, 穆玉峰, 王海燕, 等. 排水综合评价中的生物毒性测试技术[J]. 环境科学研究, 2014, 27(04): 390-397.
- [6] US EPA. Method guidance and recommendations for whole effluent toxicity (WET) testing [R]. Washington DC: US EPA Office of Water, 2000: 1-2.
- [7] Dam R A, Chapman J. Direct toxicity assessment (DTA) for water quality guidelines in Australia and New Zealand[J]. Australasian Journal of Ecotoxicology, 2001, 7: 175-198.
- [8] Environment Canada. Biological test method series [EB/OL]. Gatineau, Quebec: Environment Canada, 2011. <http://www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/default.asp?lang=En&n=0BB80E7B-1>.
- [9] 环境保护部. 发酵类制药工业水污染物排放标准: GB 21903-2008 [S]. 北京:中国环境科学出版社,2008.
- [10] 环境保护部. 化学合成类制药工业水污染物排放标准: GB 21904-2008 [S]. 北京:中国环境科学出版社,2008.
- [11] 环境保护部. 提取类制药工业水污染物排放标准: GB 21905-2008 [S]. 北京:中国环境科学出版社,2008.
- [12] 环境保护部. 中药类制药工业水污染物排放标准: GB 21906-2008 [S]. 北京:中国环境科学出版社,2008.
- [13] 环境保护部. 生物工程类制药工业水污染物排放标准: GB 21907-2008[S]. 北京:中国环境科学出版社,2008.
- [14] 环境保护部. 混装制剂类制药工业水污染物排放标准: GB 21908-2008 [S]. 北京:中国环境科学出版社,2008.

- [15] 生态环境部. 生态环境损害鉴定评估技术指南 总纲和关键环节第 2 部分:损害调查: GB/T3979.2—2020[S]. 北京:中国环境科学出版社, 2020.
- [16] 生态环境部办公厅. 重特大突发水环境事件应急监测工作规程: 环办监测函(2020)543号 [A/OL]. (2020-10-21)[2025-06-13] https://www.mee.gov.cn/xxgk2018/xxgk/xxgk06/202203/t20220316_971632.html.
- [17] 生态环境部办公厅. 生态环境应急监测能力建设指南: 环办监测函(2020)597号[A/OL]. (2020-11-09)[2025-06-13] https://www.mee.gov.cn/xxgk2018/xxgk/xxgk06/202203/t20220316_971633.html.
- [18] 生态环境部. 应对新型冠状病毒感染肺炎疫情应急监测方案[EB/OL]. (2020-02-01)[2025-06-13]. https://www.mee.gov.cn/xxgk2018/xxgk/xxgk15/202001/t20200131_761095.html.
- [19] 科技部, 生态环境部, 住房和城乡建设部, 等. “十四五”生态环境领域科技创新专项规划: 国科发社〔2022〕238号[A/OL]. (2022-11-02)[2025-06-13] https://www.mee.gov.cn/xxgk2018/xxgk/xxgk10/202211/t20221102_999489.html.
- [20] 国家环境保护局. 水质 急性毒性的测定 发光细菌法: GB/T 15441—1995 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995.
- [21] Bulich A A, A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples [J]. Process Biochemistry, 1982, 17:45-47.
- [22] Bulich A A, Isenberg D L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity [J]. Isa Transactions, 2012, 20(1): 29-33.
- [23] USEPA. Whole Effluent Toxicity (WET) Control Policy: Policy for the development of effluent limitations in national pollutant discharge elimination system permits to control whole effluent toxicity for the protection of aquatic life[R]. 1994.
- [24] ASTM International. Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium: D5660 [S]. 2009.
- [25] American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: Method 8050 Bacterial Bioluminescence Test[S]. 23rd ed. Washington, DC: APHA Press, 2017.
- [26] International Standard Organization. Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—Part 1: Method using freshly prepared bacteria[S]. 2007.
- [27] International Standard Organization. Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—Part 2: Method using liquid-dried bacteria[S]. 2007.
- [28] International Standard Organization. Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—Part 3: Method using freeze-dried bacteria[S]. 2007.
- [29] Kaiser K L E, Devillers J. Handbook of Ecotoxicological Data: Ecotoxicity of Chemicals to Photobacterium phosphoreum[M]. Gordon and Breach Science Publishers. 1994.
- [30] 国家环境保护总局《水和废水分析监测方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 729-739.
- [31] 国家海洋局. 污水生物毒性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试 费歇尔弧菌法(试行): 海环字(2015)29号[A/OL]. (2015-10-22)[2025-06-13]. <https://f.mnr.gov.cn/201806/>

- [32] 中华人民共和国海关总署, 2019. 国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法: SN/T 5103—2019[S]. 北京: 中国标准出版社.
- [33] 台湾环境保护署. 水样急性毒性检测方法 细菌冷光法: NIEA B301.10C[S]. 台北: 台湾环境保护署, 2017.
- [34] 黑龙江省市场监督管理局. 水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法: DB23/T 2050—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [35] 山东省市场监督管理局. 绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法: DB37/T 4298—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [36] 河南省市场监督管理局. 饮用水水源地水质生物毒性(发光细菌法)在线监测技术规范: DB41/T 2403—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- [37] 上海市环境科学学会, 江苏省环境监测协会, 浙江省环境监测协会. 水质 急性毒性 高通量发光细菌测试方法: T/SSES 6—2023[S], 2023.
- [38] 中关村材料试验技术联盟. 水质 急性毒性现场快速监测 发光细菌法: T/CSTM 01433—2025[S], 2025.
- [39] 广东省质量技术监督局. 生物毒性水质自动在线监测仪技术要求 发光细菌法: DB44/T 1946—2016[S], 2016.
- [40] 中国质量检验协会. 发光细菌法水质生物综合毒性在线监测仪技术要求和应用指南: T/CAQI 188—2021[S], 2021.
- [41] Boyd EM, Killham K, Wright J, et al. Toxicity assessment of xenobiotic contaminated groundwater using *lux* modified *Pseudomonas fluorescens*[J]. Chemosphere, 1997; 35(9):1967- 85.
- [42] Reemtsma T, Putschew A, Jekel M. Industrial wastewater analysis: A toxicity-directed approach[J]. Waste Management, 1999, 19(2): 181-188.
- [43] Cotou E, Papathanassiou E, Tsangaris C. Assessing the quality of marine coastal environments: comparison of scope for growth and Microtox bioassay results of pollution gradient areas in eastern Mediterranean (Greece) [J]. Environmental Pollution, 2002, 119(2):141-149.
- [44] Salizzato M, Pavoni B, Ghirardini AV, et al. Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants [J].Chemosphere, 1998, 36(14): 2949-2968.
- [45] Araújo C V M, Nascimento R B, Oliveira C A, et al. The use of Microtox® to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil)[J]. Chemosphere, 2005, 38, 1277-1281.
- [46] Boluda R, Quintanilla J F, Bonilla J A, et al. Application of the Microtox® test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain)[J]. Chemosphere, 2002, 46(2): 355-369.
- [47] 王宾香, 王慧, 郑天凌. Microtox 技术在印染废水污染监测中的应用研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(06): 869-873.
- [48] 韦昊, 孙照东, 史瑞兰, 等. 运用发光细菌法测定某 PTA 废水急性毒性[J]. 环境科学与技术, 2013, 36(S2): 261-263.
- [49] 黄满红, 李咏梅, 顾国维. 生物测试方法在城市污水毒性评价中的应用[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2005, 11: 71-75.
- [50] 王丽莎, 胡洪营, 魏杰, 等. 城市污水再生处理工艺中发光细菌毒性变化的初步研究[J].

安全与环境学报, 2006, 01: 72-74.

- [51] 张亚旦, 徐亚同, 朱文杰. 饮用水水质标准中 14 种限制物质综合毒性研究[J]. 安全与环境学报, 2009, 9(02): 106-111.
- [52] 康莉, 毛丽莎, 陈慧玲, 等. 发光细菌法检测饮用水综合毒性的应用研究[J]. 职业与健康, 2013, 29(15): 1897-1899.
- [53] 徐辉, 刘洋, 齐维晓, 等. 发光细菌法评价疫情暴发对长江流域地表水生态毒性的影响 [J]. 生态毒理学报, 2023, 18(01): 440-447.
- [54] 张建江, 贾继民, 马永红, 等. 发光菌在重大恐怖袭击化学毒物应急监测体系中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(05): 1151-1153.
- [55] Qu R J, Wang X H, Feng M B, et al. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 95: 83-90.
- [56] 李真, 苗晶晶, 潘鲁青. 6 种重金属的发光菌毒性效应及其海洋生物物种敏感度分析[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(2): 176-183.
- [57] 皇甫鑫, 廖翀, 杨坪, 等. 金属化合物对发光菌的毒性效应及不同发光菌的敏感度差异研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30 (9): 1787-1792.
- [58] 王丽莎, 魏东斌, 胡洪营. 发光细菌毒性测试条件的优化与毒性参照物的应用[J]. 环境科学研究, 2004, 17(4):61-63.
- [59] 彭方毅, 陈盛珍, 姜海蓉, 等. 发光细菌冷冻干燥条件优化研究与应用[J]. 环境污染与防治, 2010, 32(06): 8-10.
- [60] 郑小燕, 蔡强, 彭惠民, 等. 发光细菌生物活性的调控方法[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 264-267.
- [61] 郑小燕, 蔡强, 彭惠民, 等. 冷藏技术对发光细菌活性及毒性测试性能的影响[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(4): 439-445.
- [62] 王娜, 王晓昌, 马晓妍. 菌密度对青海弧菌生物毒性测试的影响[J]. 安全与环境学报, 2014, 14(1): 306-310.
- [63] 孙成华, 刘康, 衡丽娜, 等. 水样发光细菌急性毒性测试的方式与表征[J]. 中国环境监测, 2014, 30(6): 123-128.
- [64] 何发明, 彭良琼, 隆汶君, 等. 发光细菌法评价坯革生态安全性的毒性参照物替代及应用[J]. 皮革科学与工程, 2022, 32(03): 13-17.
- [65] 林健辉, 吴欣颖, 赖伟, 等. 废水急性毒性测定及评价中的不确定性研究及其改进方法 [J]. 生态毒理学报, 2024, 19(01): 262-274.
- [66] 朱文杰, 郑天凌, 李伟民, 等. 发光细菌与环境毒性监测[M]. 北京: 中国轻工业出版社. 2008.
- [67] 郑璐, 沈忱, 张焱天, 等. 环境化学品对重组发光大肠杆菌和 502 发光细菌的急性毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(05): 329-338.
- [68] 国家环保局水生生物监测手册编委会. 水生生物监测手册[M]. 南京: 东南大学出版社. 1992, 257-265.

附件一

方法验证报告

方法名称: 水质 急性毒性的测定 发光细菌法

项目承担单位: 江苏省常州环境监测中心

验证单位: 上海市环境监测中心、江苏省环境监测中心、浙江省生态环境监
测中心、江苏省苏州环境监测中心、江苏省泰州环境监测中心、
江苏省淮安环境监测中心

项目负责人及职称: 陈桥 (正高级工程师)

通讯地址及电话: 常州市天宁区青洋北路 47 号 电话: 051986908336

报告编写人及职称: 沈丽娟 (高级工程师)

报告日期: 2022 年 12 月 30 日

1 原始测试数据

本方法的 6 家验证实验室分别为：(1) 上海市环境监测中心，(2) 江苏省环境监测中心，(3) 浙江省生态环境监测中心，(4) 江苏省苏州环境监测中心，(5) 江苏省泰州环境监测中心，(6) 江苏省淮安环境监测中心。编制组将《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，得出验证报告。由于该方法适用范围内无有证标准物质，所以未进行准确度验证，仅开展了精密度、有效性及敏感性验证。

1.1 实验室基本情况

参加验证的实验室及人员基本情况、仪器使用情况及试剂使用情况见附表 1-1 至附表 1-3。

附表 1-1 参加验证的人员情况登记表

编号	验证单位	姓名	性别	职务或职称	从事相关分析工作年限
1	上海市环境监测中心	朱梦杰	男	高级工程师	18 年
		郁斯贻	女	工程师	5 年
2	江苏省环境监测中心	杨雅楠	女	高级工程师	8 年
		卜亚谦	男	工程师	3 年
3	浙江省生态环境监测中心	于海燕	女	正高级工程师	29 年
		周胜利	男	高级工程师	12 年
4	江苏省苏州环境监测中心	徐恒省	男	正高级工程师	26 年
		李继影	女	正高级工程师	17 年
		景明	男	高级工程师	12 年
5	江苏省泰州环境监测中心	黄辉	男	高级工程师	16 年
		孙海涛	女	高级工程师	10 年
6	江苏省淮安环境监测中心	杨子毅	女	高级工程师	14 年
		俞蕴馨	女	工程师	3 年

附表 1-2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	仪器出厂编号	性能状况（计量/校准状态、量程、灵敏度等）	验证单位
生物毒性仪	Delta-toxII	DT10473	良好	上海市环境监测中心
生物毒性应急监测设备	TOXmini	32526-70 LB95 09	良好	江苏省环境监测中心

仪器名称	规格型号	仪器出厂编号	性能状况（计量/校准状态、量程、灵敏度等）	验证单位
便携式发光细菌毒性监测仪	Delta-toxI	1001453	良好	浙江省生态环境监测中心
实验室温控毒性仪	Microtox LX	LX1139	良好	江苏省苏州环境监测中心
便携式生物毒性测试仪	SafeLight—Standard	32526-10 LB95 09	良好	江苏省泰州环境监测中心
便携式发光细菌毒性监测仪	Delta-toxII	DT10090	良好	江苏省淮安环境监测中心

附表 1-3 使用试剂及溶剂登记表

名称	生产厂家、规格	验证单位
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	上海市环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	浙江省生态环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省淮安环境监测中心
氯化汞溶液标准物质	北方伟业计量集团有限公司	上海市环境监测中心
	北方伟业计量集团有限公司	江苏省环境监测中心
	河南万佳标准物质研发中心	浙江省生态环境监测中心
	北方伟业计量集团有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	河南万佳标准物质研发中心	江苏省泰州环境监测中心
	河南万佳标准物质研发中心	江苏省淮安环境监测中心
七水合硫酸锌	国药集团化学试剂有限公司	上海市环境监测中心
	上海麦克林生化科技股份有限公司	江苏省环境监测中心
	上海麦克林生化科技股份有限公司	浙江省生态环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省淮安环境监测中心
明亮发光杆菌 T3	南京中科院跨克科技有限责任公司	上海市环境监测中心
	浙江托科司生物科技有限责任公司	江苏省环境监测中心
	浙江托科司生物科技有限责任公司	浙江省生态环境监测中心
	浙江托科司生物科技有限责任公司	江苏省苏州环境监测中心

名称	生产厂家、规格	验证单位
	南京中科院跨克科技有限责任公司	江苏省泰州环境监测中心
	浙江托科司生物科技有限责任公司	江苏省淮安环境监测中心

1.2 方法精密度测试数据

6家验证实验室分别对氯化汞高中低浓度统一样品 ($\rho = 0.08 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.12 \text{ mg/L}$)、参比物氯化汞溶液统一样品及参比物硫酸锌溶液统一样品等自制模拟样品进行水质发光细菌急性毒性测定。氯化汞高中低浓度样品测试结果以发光抑制率和 LID 表征，参比物氯化汞溶液样品、参比物硫酸锌溶液样品测试结果以 $15 \text{ min EC}_{50} (\text{mg/L})$ 表征。每个试样平行测定 6 次，分别计算测定结果的平均值、标准偏差、相对标准偏差，结果见附表 1-4 至附表 1-9。

附表 1-4 自制模拟样品精密度测试数据

验证单位: 上海市环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	发光抑制率 (%)			LID (无量纲)			EC ₅₀ (mg/L)	
	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (以Zn ²⁺ 计)
							95%置信区间	95%置信区间
1	39.0	40.2	98.6	2	2	2	0.10	1.6
							0.091~0.13	1.5~1.6
2	40.1	49.0	98.9	2	2	2	0.088	1.4
							0.068~0.11	1.4~1.5
3	43.3	46.0	99.1	2	2	2	0.10	1.6
							0.092~0.12	1.4~1.7
4	40.3	44.4	99.1	2	2	2	0.084	1.4
							0.067~0.11	1.3~1.5
5	40.1	42.5	99.2	2	2	2	0.084	1.6
							0.071~0.10	1.5~1.7
6	43.1	50.6	99.4	2	2	2	0.087	1.4
							0.070~0.11	1.4~1.5
平均值 \bar{x}_i	41.0	45.5	99.1	2	2	2	0.091	1.5
标准偏差 S_i	1.8	3.9	0.27	0	0	0	0.0075	0.11
相对标准偏差 RSD_i (%)	4.3	8.6	0.28	0	0	0	8.3	7.3

附表 1-5 自制模拟样品精密度测试数据

验证单位：江苏省环境监测中心

测试日期：2022年12月

平行号	发光抑制率(%)			LID(无量纲)			EC ₅₀ (mg/L)	
	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂	ZnSO ₄ ·7H ₂ O(以Zn ²⁺ 计)
							95%置信区间	95%置信区间
1	31.8	76.3	97.6	2	2	2	0.12	1.4
							0.10~0.13	1.4~1.5
2	26.3	79.9	97.3	2	2	2	0.083	1.4
							0.071~0.096	1.3~1.5
3	32.2	78.0	98.2	2	2	2	0.092	1.2
							0.089~0.096	1.1~1.4
4	30.8	79.6	98.5	2	2	2	0.083	1.0
							0.068~0.10	0.94~1.1
5	34.3	78.1	98.0	2	2	2	0.10	1.1
							0.095~0.11	0.99~1.3
6	21.8	71.6	97.6	2	2	2	0.093	1.3
							0.079~0.11	0.98~1.6
平均值 \bar{x}_2	29.5	77.3	97.9	2	2	2	0.095	1.2
标准偏差 S_2	4.6	3.1	0.45	0	0	0	0.014	0.16
相对标准偏差 RSD_2 (%)	16	4.0	0.46	0	0	0	14	13

附表 1-6 自制模拟样品精密度测试数据

验证单位: 浙江省生态环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	发光抑制率 (%)			LID (无量纲)			EC ₅₀ (mg/L)	
	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (以Zn ²⁺ 计)
							95%置信区间	95%置信区间
1	35.7	36.2	92.8	2	2	2	0.10	2.0
							0.075~0.14	1.6~2.5
2	36.6	38.2	92.3	2	2	2	0.093	2.0
							0.089~0.096	1.7~2.4
3	35.4	44.1	85.1	2	2	2	0.088	1.7
							0.076~0.10	1.6~2.0
4	32.2	45.4	94.1	2	2	2	0.089	1.7
							0.081~0.097	1.2~2.3
5	37.6	36.1	92.8	2	2	2	0.082	1.7
							0.067~0.099	1.6~1.9
6	42.0	35.3	94.5	2	2	2	0.084	1.6
							0.066~0.11	1.4~1.9
平均值 \bar{x}_3	36.6	39.2	91.9	2	2	2	0.089	1.8
标准偏差 S_3	3.2	4.4	3.5	0	0	0	0.0065	0.17
相对标准偏差 RSD_3 (%)	8.8	11	3.8	0	0	0	7.3	9.7

附表 1-7 自制模拟样品精密度测试数据

验证单位: 江苏省苏州环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	发光抑制率 (%)			LID (无量纲)			EC ₅₀ (mg/L)	
	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (以Zn ²⁺ 计)
							95%置信区间	95%置信区间
1	25.3	43.4	96.9	2	2	2	0.092	1.5
							0.082~0.10	1.4~1.6
2	38.9	39.3	97.0	2	2	2	0.091	1.4
							0.079~0.10	1.3~1.5
3	34.3	42.9	98.5	2	2	2	0.096	1.2
							0.087~0.11	1.1~1.3
4	32.0	43.5	97.7	2	2	2	0.086	1.1
							0.075~0.098	1.0~1.2
5	36.7	40.4	99.1	2	2	2	0.10	1.0
							0.091~0.11	0.93~1.2
6	35.3	42.5	98.6	2	2	2	0.11	1.1
							0.094~0.12	1.0~1.3
平均值 \bar{x}_4	33.8	42.0	98.0	2	2	2	0.096	1.2
标准偏差 S_4	4.7	1.7	0.91	0	0	0	0.0084	0.19
相对标准偏差 RSD_4 (%)	14	4.1	0.93	0	0	0	8.8	16

附表 1-8 自制模拟样品精密度测试数据

验证单位: 江苏省泰州环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	发光抑制率 (%)			LID (无量纲)			EC ₅₀ (mg/L)	
	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂	ZnSO ₄ •7H ₂ O (以Zn ²⁺ 计)
							95%置信区间	95%置信区间
1	25.0	56.1	96.6	2	2	2	0.095	1.8
							0.090~0.10	1.6~2.0
2	30.4	59.5	95.1	2	2	2	0.094	1.7
							0.084~0.11	1.5~2.0
3	31.3	51.5	93.4	2	2	2	0.088	1.5
							0.077~0.10	1.4~1.6
4	28.1	58.2	93.0	2	2	2	0.083	1.2
							0.072~0.096	0.94~1.5
5	32.5	51.3	96.5	2	2	2	0.095	1.3
							0.088~0.10	1.1~1.6
6	30.7	57.7	96.8	2	2	2	0.099	1.2
							0.090~0.11	1.2~1.3
平均值 \bar{x}_s	29.7	55.7	95.2	2	2	2	0.092	1.5
标准偏差 S_s	2.7	3.5	1.7	0	0	0	0.0058	0.26
相对标准偏差 RSD_s (%)	9.1	6.3	1.8	0	0	0	6.3	18

附件 1-9 自制模拟样品精密度测试数据

验证单位: 江苏省淮安环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	发光抑制率 (%)			LID (无量纲)			EC ₅₀ (mg/L)	
	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂ (0.08 mg/L)	HgCl ₂ (0.10 mg/L)	HgCl ₂ (0.12 mg/L)	HgCl ₂	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (以Zn ²⁺ 计)
							95%置信区间	95%置信区间
1	32.2	47.5	99.1	2	2	2	0.088	1.1
							0.080~0.097	0.93~1.3
2	36.0	48.3	98.9	2	2	2	0.097	1.0
							0.086~0.11	0.76~1.4
3	43.5	49.6	99.0	2	2	2	0.085	1.1
							0.076~0.095	0.96~1.2
4	33.8	49.6	99.1	2	2	2	0.11	1.0
							0.093~0.12	0.85~1.1
5	28.8	52.3	99.5	2	2	2	0.090	1.0
							0.076~0.11	0.81~1.3
6	31.2	50.8	99.5	2	2	2	0.086	1.0
							0.070~0.11	0.66~1.5
平均值 \bar{x}_6	34.3	49.7	99.2	2	2	2	0.093	1.0
标准偏差 S_6	5.1	1.7	0.26	0	0	0	0.0095	0.052
相对标准偏差 RSD_6 (%)	15	3.5	0.26	0	0	0	10	5.0

6家验证实验室分别对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水（综合废水、制药废水）的统一实际样品进行测定，结果分别以相对发光率（%）、LID 表征，同时对符合条件的典型样品进行氯化汞毒性当量浓度、EC₅₀ 测定，其中工业废水（综合废水）还以氯化汞毒性当量浓度表征，工业废水（制药废水）还以 EC₅₀（体积分数，%）表征。每个试样平行测定 6 次，分别计算样品的平均值、标准偏差、相对标准偏差，结果见附表 1-10 至附表 1-15。

附表 1-10 实际样品精密度测试数据

验证单位: 上海市环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	相对发光率 (%)					LID (无量纲)					HgCl ₂ 当量浓度 (mg/L)	EC ₅₀ (体积分数%)
	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水 (综合废水)	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水 (制药废水)	工业废水 (综合废水)	95%置信区间
1	94.7	100	85.1	70.3	64.1	1	1	1	2	64	0.086	1.7
												1.5~2.0
2	86.1	94.9	83.4	62.5	64.5	1	1	1	3	48	0.086	2.1
												1.9~2.3
3	95.2	98.1	80.2	66.4	65.0	1	1	1	3	48	0.086	2.2
												2.0~2.5
4	86.3	89.6	92.5	67.5	53.3	1	1	1	3	48	0.094	1.9
												1.7~2.1
5	95.5	96.0	80.5	71.7	52.4	1	1	1	2	48	0.095	1.5
												1.4~1.6
6	102	95.4	87.0	73.4	54.1	1	1	1	2	48	0.093	2.3
												2.0~2.6
平均值 \bar{x}_l	93.3	95.7	84.8	68.6	58.9	1	1	1	2.5	50.7	0.090	2.0
标准偏差 S_l	6.2	3.5	4.6	4.0	6.2	0	0	0	0.55	6.5	0.0044	0.31
相对标准偏差 RSD_l (%)	6.6	3.7	5.4	5.8	11	0	0	0	22	13	4.9	16

附表 1-11 实际样品精密度测试数据

验证单位: 江苏省环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	相对发光率 (%)					LID (无量纲)					HgCl ₂ 当量浓度 (mg/L)	EC ₅₀ (体积分数%)
	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水 (综合废水)	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水 (制药废水)		95%置信区间
1	93.0	89.7	87.4	76.1	51.7	1	1	1	2	32	0.10	2.1
												1.9~2.3
2	95.0	93.6	95.2	65.0	54.5	1	1	1	2	32	0.10	2.2
												1.9~2.6
3	94.7	92.8	92.4	63.7	53.4	1	1	1	3	32	0.10	2.1
												1.7~2.4
4	103	95.5	96.6	68.0	54.2	1	1	1	3	32	0.10	2.1
												1.7~2.6
5	99.3	96.0	84.5	61.3	53.9	1	1	1	3	48	0.10	2.4
												1.9~3.1
6	105	96.4	95.2	59.1	54.1	1	1	1	3	48	0.10	2.0
												1.4~2.9
平均值 \bar{x}_2	98.3	94.0	91.9	65.5	53.6	1	1	1	2.7	37.3	0.10	2.2
标准偏差 S_2	4.9	2.5	4.9	6.0	1.0	0	0	0	0.52	8.3	0	0.14
相对标准偏差 RSD_2 (%)	5.0	2.7	5.3	9.2	1.9	0	0	0	19	22	0	6.4

附表 1-12 实际样品精密度测试数据

验证单位: 浙江省环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	相对发光率 (%)					LID (无量纲)				HgCl ₂ 当量浓度 (mg/L)	EC ₅₀ (体积分数%)
	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水 (综合废水)	地表水	地下水	海水	生活污水		95%置信区间
1	97.9	99.3	84.5	73.8	53.7	1	1	1	2	48	0.099
											2.6 1.7~4.0
2	96.1	96.3	86.7	70.6	55.4	1	1	1	2	64	0.098
											2.1 1.7~2.6
3	96.3	97.4	85.3	72.0	54.3	1	1	1	2	48	0.099
											2.4 2.0~2.9
4	94.5	91.8	89.4	70.9	62.4	1	1	1	2	48	0.095
											2.4 1.7~3.4
5	93.6	94.3	94.7	64.2	65.5	1	1	1	3	48	0.093
											1.7 1.4~2.0
6	90.1	93.8	94.7	71.0	64.5	1	1	1	2	64	0.094
											2.2 1.8~2.7
平均值 \bar{x}_3	94.8	95.5	89.2	70.4	59.3	1	1	1	2.2	53.3	0.096
标准偏差 S_3	2.7	2.7	4.6	3.3	5.4	0	0	0	0.41	8.3	0.0027
相对标准偏差 RSD_3 (%)	2.9	2.8	5.0	4.6	9.1	0	0	0	19	15	2.8
											14

附表 1-13 实际样品精密度测试数据

验证单位: 江苏省苏州环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	相对发光率 (%)					LID (无量纲)				HgCl ₂ 当量浓度 (mg/L)	EC ₅₀ (体积分数%)
	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水 (综合废水)	地表水	地下水	海水	生活污水		95%置信区间
1	99.1	80.8	94.7	70.7	56.0	1	1	1	2	48	0.10
2	101	100	88.3	74.1	53.3	1	1	1	2	48	0.10
3	101	86.5	94.5	79.6	61.8	1	1	1	2	48	0.10
4	104	81.3	97.9	78.0	72.8	1	1	1	2	48	0.098
5	104	100	106	79.8	78.6	1	1	1	2	32	0.096
6	104	101	91.4	74.8	69.7	1	1	1	2	32	0.099
平均值 \bar{x}_4	102	91.7	95.4	76.2	65.4	1	1	1	2.0	42.7	0.099
标准偏差 S_4	2.2	9.9	6.0	3.6	10	0	0	0	0	8.3	0.0016
相对标准偏差 RSD_4 (%)	2.1	11	6.3	4.7	15	0	0	0	0	19	1.6
											40

附表 1-14 实际样品精密度测试数据

验证单位: 江苏省泰州环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	相对发光率(%)					LID(无量纲)					HgCl ₂ 当量浓度(mg/L)	EC ₅₀ (体积分数%)
	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水(综合废水)	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水(制药废水)	工业废水(综合废水)	95%置信区间
1	90.9	87.3	90.7	72.3	54.7	1	1	1	2	48	0.092	5.9 5.0~6.9
2	96.4	89.2	100	70.1	53.9	1	1	1	2	48	0.093	5.5 5.1~6.5
3	89.7	83.2	90.1	61.9	57.8	1	1	1	3	48	0.091	5.5 4.8~6.2
4	90.1	82.1	91.7	61.4	58.2	1	1	1	4	48	0.090	5.7 4.8~6.8
5	96.7	85.6	92.2	58.7	55.4	1	1	1	4	32	0.092	5.2 4.6~5.7
6	85.4	80.1	104	63.8	59.5	1	1	1	4	32	0.090	4.5 3.9~5.0
平均值 \bar{x}_s	91.5	84.6	94.9	64.7	56.6	1	1	1	3.2	42.7	0.091	5.4
标准偏差 S_s	4.3	3.4	5.9	5.3	2.2	0	0	0	0.98	8.3	0.0012	0.49
相对标准偏差 RSD_s (%)	4.7	4.0	6.2	8.3	3.9	0	0	0	31	19	1.3	9.1

附表 1-15 实际样品精密度测试数据

验证单位: 江苏省淮安环境监测中心

测试日期: 2022年12月

平行号	相对发光率(%)					LID(无量纲)					HgCl ₂ 当量浓度(mg/L)	EC ₅₀ (体积分数%)
	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水(综合废水)	地表水	地下水	海水	生活污水	工业废水(制药废水)	工业废水(综合废水)	95%置信区间
1	89.9	104	102	61.3	67.5	1	1	1	3	48	0.084	1.7
												1.3~2.2
2	88.1	82.4	105	60.0	71.2	1	1	1	3	48	0.083	2.8
												2.0~3.9
3	92.7	100	99.2	71.4	64.7	1	1	1	2	48	0.085	2.2
												1.8~2.5
4	84.5	108	102	70.3	64.6	1	1	1	2	64	0.085	2.8
												2.4~3.3
5	84.8	97.7	101	65.0	59.3	1	1	1	3	48	0.086	1.4
												1.3~1.5
6	88.5	102	101	69.1	57.6	1	1	1	3	48	0.086	1.7
												1.5~1.9
平均值 \bar{x}_6	88.1	99.1	102	66.2	64.2	1	1	1	2.7	50.7	0.085	2.1
标准偏差 S_6	3.1	9.0	2.0	4.8	5.1	0	0	0	0.52	6.5	0.0012	0.60
相对标准偏差 RSD_6 (%)	3.5	9.1	2.0	7.3	7.9	0	0	0	19	13	1.4	29

1.3 方法有效性及敏感性测试数据

6家验证实验室对方法的有效性及敏感性进行验证，使用 $\rho = 30 \text{ g/L}$ 氯化钠溶液为阴性对照、终浓度 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 氯化汞溶液和终浓度 $\rho = 1.40 \text{ mg/L}$ 硫酸锌溶液（以 Zn^{2+} 计）为阳性对照等统一样品进行测定，并测定参比物氯化汞、硫酸锌（以 Zn^{2+} 计）的 EC_{50} 浓度。结果见附表 1-16 至附表 1-20。

附表 1-16 阴性对照 (30 g/L NaCl 溶液) 方法有效性及敏感性验证数据表

实验室号	发光抑制率 (%)						结论
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	
1	3.9	-6.7	7.1	1.8	-7.6	-4.6	阴性对照的发光抑制率符合 $-10\% \leq H_t \leq 10\%$ 。
2	8.2	-8.0	4.5	-6.8	0.7	-2.8	
3	9.3	5.8	-4.6	-5.7	4.3	4.5	
4	0.9	0.6	0.7	-6.2	3.7	4.2	
5	-3.1	0.5	2.0	-7.8	-0.7	8.7	
6	-2.2	-7.0	-9.5	-5.3	4.5	2.1	

附表 1-17 阳性对照（终浓度 0.10 mg/L 氯化汞溶液）方法有效性及敏感性验证数据表

实验室号	发光抑制率 (%)						结论
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	
1	40.2	49.0	46.0	44.4	42.5	50.6	阳性对照（氯化汞终浓度 0.10 mg/L）的发光抑制率符合 $20\% \leq H_i \leq 80\%$ 。
2	76.3	79.9	78.0	79.6	78.1	71.6	
3	36.2	38.2	44.1	45.4	36.1	35.3	
4	43.4	39.3	42.9	43.5	40.4	42.5	
5	56.1	59.5	51.5	58.2	51.3	57.7	
6	47.5	48.3	49.6	49.6	52.3	50.8	

附表 1-18 阳性对照（ Zn^{2+} 终浓度 1.40 mg/L 硫酸锌溶液）方法有效性及敏感性验证数据表

实验室号	发光抑制率 (%)						结论
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	
1	45.9	48.5	45.9	48.8	44.6	48.6	阳性对照（ Zn^{2+} 终浓度 1.40 mg/L）的发光抑制率符合 $20\% \leq H_i \leq 80\%$ 。
2	48.8	50.1	54.8	60.2	56.4	53.9	
3	35.8	36.2	40.6	43.0	42.1	44.6	
4	48.0	49.8	54.8	59.3	60.9	57.8	
5	39.4	41.3	46.7	55.8	51.2	53.7	
6	54.2	55.5	55.3	58.5	57.0	57.7	

附表 1-19 参比物氯化汞 EC₅₀ 验证数据表

实验室号	EC ₅₀ (mg/L)						结论
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	
1	0.10	0.088	0.10	0.084	0.084	0.087	参比物氯化汞的 15min EC ₅₀ 在 0.08 mg/L~0.12 mg/L 范围内。
2	0.12	0.083	0.092	0.083	0.10	0.093	
3	0.10	0.093	0.088	0.089	0.082	0.084	
4	0.092	0.091	0.096	0.086	0.10	0.11	
5	0.095	0.094	0.088	0.083	0.095	0.099	
6	0.088	0.097	0.085	0.11	0.090	0.086	

附表 1-20 参比物硫酸锌（以 Zn²⁺计）EC₅₀ 验证数据表

实验室号	EC ₅₀ (mg/L)						结论
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	
1	1.6	1.4	1.6	1.4	1.6	1.4	参比物硫酸锌（以 Zn ²⁺ 离子计）的 15min EC ₅₀ 在 1.0 mg/L~2.0 mg/L 范 围内。
2	1.4	1.4	1.2	1.0	1.1	1.3	
3	2.0	2.0	1.7	1.7	1.7	1.6	
4	1.5	1.4	1.2	1.1	1.0	1.1	
5	1.8	1.7	1.5	1.2	1.3	1.2	
6	1.1	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	

2 方法验证数据汇总

6家验证实验室方法验证结果中明亮发光杆菌T3急性毒性的精密度测试结果的统计分析见附表2-1~2-5。

附表 2-1 自制模拟样品（氯化汞）方法精密度测试数据汇总表

实验室号	发光抑制率 (%)									LID (无量纲)									EC ₅₀ (mg/L)					
	浓度1 (0.08 mg/L)			浓度2 (0.10 mg/L)			浓度3 (0.12 mg/L)			浓度1 (0.08 mg/L)			浓度2 (0.10 mg/L)			浓度3 (0.12 mg/L)								
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)																					
1	41.0	1.8	4.3	45.5	3.9	8.6	99.1	0.27	0.28	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0.091	0.0075	8.3			
2	29.5	4.6	16	77.3	3.1	4.0	97.9	0.45	0.46	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0.095	0.014	14			
3	36.6	3.2	8.8	39.2	4.4	11	91.9	3.5	3.8	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0.089	0.0065	7.3			
4	33.8	4.7	14	42.0	1.7	4.1	98.0	0.91	0.93	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0.096	0.0084	8.8			
5	29.7	2.7	9.1	55.7	3.5	6.3	95.2	1.7	1.8	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0.092	0.0058	6.3			
6	34.3	5.1	15	49.7	1.7	3.5	99.2	0.26	0.26	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0.093	0.0095	10			
\bar{x}	34.2			51.6			96.9			2			2			2			0.093					
S'	4.3			14			2.8			0			0			0			0.0026					
RSD' (%)	13			27			2.9			0			0			0			2.8					
重复性限 r	11			9.0			4.6			0			0			0			0.025					
再现性限 R	16			40			9.0			0			0			0			0.024					

附表 2-2 自制模拟样品（硫酸锌，以 Zn²⁺计）方法精密度测试数据汇总表

实验室号	发光抑制率 (%)			EC ₅₀ (mg/L)		
	Zn ²⁺ 浓度 (1.40 mg/L)					
	\bar{x}_i	S _i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S _i	RSD _i (%)
1	47.1	1.8	3.8	1.5	0.11	7.3
2	54.0	4.2	7.7	1.2	0.16	13
3	40.4	3.6	9.0	1.8	0.17	9.7
4	55.1	5.2	9.5	1.2	0.19	16
5	48.0	6.7	14	1.5	0.26	18
6	56.4	1.6	2.9	1.0	0.052	5.0
= \bar{x}	50.2			1.4		
S'	6.1			0.29		
RSD' (%)	12			21		
重复性限r	12			0.48		
再现性限R	20			0.91		

附表 2-3 实际样品方法精密度测试数据汇总表

实验室号	相对发光率 (%)														
	地表水			地下水			海水			生活污水			工业废水(综合废水)		
	\bar{x}_i	S_i	RSD_i (%)												
1	93.3	6.2	6.6	95.7	3.5	3.7	84.8	4.6	5.4	68.6	4.0	5.8	58.9	6.2	11
2	98.3	4.9	5.0	94.0	2.5	2.7	91.9	4.9	5.3	65.5	6.0	9.2	53.6	1.0	1.9
3	94.8	2.7	2.9	95.5	2.7	2.8	89.2	4.6	5.0	70.4	3.3	4.6	59.3	5.4	9.1
4	102	2.2	2.1	91.7	9.9	11	95.4	6.0	6.3	76.2	3.6	4.7	65.4	10	15
5	91.5	4.3	4.7	84.6	3.4	4.0	94.9	5.9	6.2	64.7	5.3	8.3	56.6	2.2	3.9
6	88.1	3.1	3.5	99.1	9.0	9.1	102	2.0	2.0	66.2	4.8	7.3	64.2	5.1	7.9
\bar{x}	94.7			93.4			93.0			68.6			59.7		
S'	5.0			5.0			5.8			4.3			4.5		
RSD' (%)	5.2			5.3			6.2			6.2			7.5		
重复性限 r	12			17			14			13			16		
再现性限 R	17			21			20			17			19		

附表 2-4 实际样品方法精密度测试数据汇总表

实验室号	LID (无量纲)														
	地表水			地下水			海水			生活污水			工业废水 (制药废水)		
	\bar{x}_i	S_i	RSD_i (%)												
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2.5	0.55	22	50.7	6.5	13
2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2.7	0.52	19	37.3	8.3	22
3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2.2	0.41	19	53.3	8.3	15
4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2.0	0	0	42.7	8.3	19
5	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3.2	0.98	31	42.7	8.3	19
6	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2.7	0.52	19	50.7	6.5	13
\bar{x}	1			1			1			2.6			46		
S'	0			0			0			0.42			6.2		
$RSD' (\%)$	0			0			0			17			13		
重复性限 r	0			0			0			1.6			22		
再现性限 R	0			0			0			1.9			26		

附表 2-5 实际样品方法精密度测试数据汇总表

实验室号	HgCl ₂ 当量浓度 (mg/L)			体积分数 (%)		
	工业废水 (综合废水)			工业废水 (制药废水) (EC ₅₀)		
	\bar{x}_i	S_i	RSD_i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD_i (%)
1	0.090	0.0044	4.9	2.0	0.31	16
2	0.10	0	0	2.2	0.14	6.4
3	0.096	0.0027	2.8	2.2	0.31	14
4	0.099	0.0016	1.6	4.0	1.6	40
5	0.091	0.0012	1.3	5.4	0.49	9.1
6	0.085	0.0012	1.4	2.1	0.60	29
\bar{x}	0.094			3.0		
S'	0.0058			1.4		
RSD' (%)	6.2			47		
重复性限 r	0.0065			2.1		
再现性限 R	0.017			4.4		

3 方法验证结论

(1) 异常值情况

验证过程中 6 家验证实验室无报告异常值的情况。

(2) 精密度

6家实验室分别对 $\rho = 0.08 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.12 \text{ mg/L}$ 的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，发光抑制率分别为21.8%~43.5%、35.3%~79.9%、85.1%~99.5%，实验室内相对标准偏差分别为4.3%~16%、3.5%~11%、0.26%~3.8%，实验室间相对标准偏差分别为13%、27%、2.9%，重复性限为11%、9.0%、4.6%，再现性限为16%、40%、9.0%。

6家实验室分别对 $\rho = 0.08 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.10 \text{ mg/L}$ 、 $\rho = 0.12 \text{ mg/L}$ 的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，LID分别为2、2、2，实验室内相对标准偏差分别为0%、0%、0%，实验室间相对标准偏差分别为0%、0%、0%，重复性限为0、0、0，再现性限为0、0、0。

6家实验室对参比物氯化汞溶液和硫酸锌溶液分别进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，参比物氯化汞EC₅₀为 $0.082 \text{ mg/L} \sim 0.12 \text{ mg/L}$ ，实验室内相对标准偏差为6.3%~14%，实验室间相对标准偏差为2.8%，重复性限为 0.025 mg/L ，再现性限为 0.024 mg/L ；参比物硫酸锌(以Zn²⁺计)EC₅₀为 $1.0 \text{ mg/L} \sim 2.0 \text{ mg/L}$ ，实验室内相对标准偏差为5.0%~18%，实验室间相对标准偏差为21%，重复性限为 0.48 mg/L ，再现性限为 0.91 mg/L 。

6家实验室分别对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水（综合废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，相对发光率分别为84.5%~105%、80.1%~108%、80.2%~106%、58.7%~79.8%、51.7%~78.6%，实验室内的相对标准偏差分别为2.1%~6.6%、2.7%~11%、2.0%~6.3%、4.6%~9.2%、1.9%~15%，实验室间相对标准偏差分别为5.2%、5.3%、6.2%、6.2%、7.5%，重复性限分别为12%、17%、14%、13%、16%，再现性限分别为17%、21%、20%、17%、19%。

6家实验室对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水（制药废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，LID分别为1、1、1、2~4、32~64，实验室内的相对标准偏差为0%、0%、0%、0%~31%、13%~22%，实验室间相对标准偏差为0%、0%、0%、17%、13%，重复性限分别为0、0、0、1.6、22，再现性限分别为0、0、0、1.9、26。

6家实验室对工业废水（综合废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，氯化汞毒性当量浓度为0.083 mg/L~0.10 mg/L，实验室内的相对标准偏差为0%~4.9%，实验室间相对标准偏差分别为6.2%，重复性限为0.0065 mg/L，再现性限为0.017 mg/L。

6家实验室对工业废水（制药废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，EC₅₀为1.4~5.9%，实验室内相对标准偏差为6.4%~40%，实验室间相对标准偏差为47%，重复性限为2.1%，再现性限为4.4%。

（3）有效性及敏感性

6家实验室对参比物氯化汞溶液进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，阳性对照（氯化汞终浓度0.10 mg/L）的发光抑制率范围为35.3%~79.9%，满足阳性对照的发光抑制率20%≤H_t≤80%要求；参比物氯化汞的15 min EC₅₀在0.082 mg/L~0.12 mg/L范围内，满足参比物氯化汞的15 min EC₅₀应在0.08 mg/L~0.12 mg/L范围内的要求。

6家实验室对参比物硫酸锌溶液进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，阳性对照（Zn²⁺终浓度1.4 mg/L）的发光抑制率范围为35.8%~60.9%，满足阳性对照的发光抑制率20%≤H_t≤80%要求。

6家实验室对阴性对照（ρ=30 g/L NaCl溶液）进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，发光抑制率为-9.5%~9.3%，满足阴性对照的发光抑制率-10%≤H_t≤10%要求。