



中华人民共和国国家生态环境标准

HJ □□□□-202□

水质 急性毒性的测定 近头状尖胞 藻生长抑制试验

**Water quality—Determination of the acute toxicity—Algal growth
inhibition test with *Raphidocelis subcapitata***

（征求意见稿）

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言	ii
1 适用范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	2
5 试剂和材料	2
6 仪器和设备	2
7 预培养	3
8 样品采集、保存和预处理	4
9 测试步骤	5
10 结果计算和表示	7
11 有效性、敏感性及精密度	8
12 质量保证和质量控制	8
13 试验报告	9
附录 A（规范性附录） 培养基制备	10
附录 B（规范性附录） 藻种保藏和贮备培养	12
附录 C（资料性附录） 直线内插法计算 EC_{50} 示例	13

前 言

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》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规范水质急性毒性测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水、地下水、生活污水和工业废水急性毒性的近头状尖胞藻生长抑制试验方法。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录，附录 C 为资料性附录。

本标准首次发布。

本标准由中华人民共和国生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位：浙江省生态环境监测中心、中国环境科学研究院、沈阳化工研究院、浙江省农业科学院。

本标准验证单位：生态环境部南京环境科学研究所、天津市生态环境监测中心、甘肃省陇南生态环境监测中心、江苏省常州环境监测中心、广西壮族自治区生态环境监测中心、广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）。

本标准生态环境部202□年□□月□□日批准。

本标准自 202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 急性毒性的测定 近头状尖胞藻生长抑制试验

警告：实验中使用的 3,5-二氯苯酚具有毒性，操作时应佩戴防护器具，避免吸入呼吸道或接触皮肤和衣物。

1 适用范围

本标准规定了测定水质急性毒性的近头状尖胞藻生长抑制试验方法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水对近头状尖胞藻最低无效应稀释倍数（LID）和半数效应浓度（EC₅₀）的测定。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。其他文件被新文件废止、修改、修订的，新文件适用于本标准。

GB/T 21805 化学品 藻类生长抑制试验

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 164 地下水环境监测技术规范

HJ 1147 水质 pH 值的测定 电极法

HJ 1216 水质 浮游植物的测定 0.1 ml 计数框-显微镜计数法

3 术语和定义

3.1

细胞密度 cell density

单位体积试样中的藻细胞数量，以 cells/mL 表示。

3.2

比生长率 specific growth rate (μ)

测试期间，藻细胞密度自然对数值在单位时间内的变化率，以 d⁻¹ 表示。

3.3

指数生长 exponential growth

在理想条件下，藻细胞数量以几何级数增长的状态。

3.4

试样 test solution

样品经培养基稀释配成的可供测试的溶液。

3.5

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

在规定条件的测试周期内，藻细胞生长抑制率 < 5% 的试样最低稀释倍数，以 LID 表示。

3.6

半数效应浓度 median effective concentration (EC_{50})

在规定条件的测试周期内，引起藻细胞比生长率降低 50%的试样浓度，以试样中样品的总体积分数 (%) 表示。

3.7

参比(毒)物 reference toxicants

在测试中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。

注：本标准简称参比物，选用 3,5-二氯苯酚为参比物。

4 方法原理

将处于指数生长期的近头状尖胞藻接种至不同浓度的试样中，在规定的条件下持续培养 $72\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ，根据试样中藻细胞比生长率的下降百分比计算 LID 或 EC_{50} 值，以表征样品对藻类的毒性。

5 试剂和材料

5.1 试剂

除非另有说明，试验均使用符合国家标准和分析纯试剂。实验用水为新制备的纯水（去离子水或蒸馏水），电导率 $< 10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ ，制水装置管路应避免使用铜质材料。

5.1.1 盐酸 (HCl)： $\rho=1.18\ \text{g}/\text{mL}$ ， $w \in [36.0\%, 38.0\%]$ 。

5.1.2 氢氧化钠 (NaOH)。

5.1.3 3,5-二氯苯酚 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$)。

5.1.4 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1.0\ \text{mol}/\text{L}$ 。

移取 8.3 mL 盐酸 (5.1.1)，用纯水定容至 100 mL。

5.1.5 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1.0\ \text{mol}/\text{L}$ 。

称取 4 g 氢氧化钠 (5.1.2)，溶于少量纯水中，用纯水定容至 100 mL。

5.1.6 培养基和储备液：按照附录 A 制备。

5.2 受试生物

以近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*) 为受试生物，藻种的保藏和贮备培养方法参见附录 B。

注：近头状尖胞藻曾用名羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornutum*)、近头状伪蹄形藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)。

6 仪器和设备

6.1 采样器：玻璃或不锈钢材质。

6.2 粗滤网：不锈钢或尼龙材质，孔径 $2\ \text{mm} \sim 4\ \text{mm}$ (10 目 \sim 5 目)。

- 6.3 采样瓶/袋：聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质，容积 ≥ 4 L。
- 6.4 pH 计：测量范围 0~14，最小分度为 0.01 pH 单位。
- 6.5 便携式冷藏箱：具有 2 °C~8 °C 冷藏功能。
- 6.6 分装瓶/袋：聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质，容积 ≥ 1 L。
- 6.7 恒温水浴箱：水浴温度在 0 °C~25 °C 范围内可调。
- 6.8 无菌操作台或无菌操作室。
- 6.9 三角瓶：广口，玻璃材质，250 mL 规格，配透气封口膜或硅胶塞。
注：同一次试验应使用同一批次的三角瓶和透气封口膜或硅胶塞。
- 6.10 光照培养箱或培养室：内部空气温度在 21 °C~25 °C 范围内可调，控温精度、温度波动和温度均匀度均在 ± 1 °C 以内，配有冷白光荧光照明，符合测试培养（7）和贮备培养（B.2）的照度要求，可连续工作。
- 6.11 光照度计：4 π 或 2 π 球面光照度计，测量范围 6000 lx~10000 lx，示值误差不超过 1 lx。
- 6.12 冰箱：具有 0 °C~8 °C 冷藏和-18 °C 及以下冷冻功能。
- 6.13 低速冷冻离心机：0 °C~8 °C 内温度可控、温度波动在 ± 1 °C 以内，离心力在 1000 g~8000 g 内可调，配 50 mL~500 mL 离心管支架和聚丙烯材质离心管。
- 6.14 微量移液器：量程范围 10 μ L~100 μ L，配 100 μ L 无菌吸头。
- 6.15 计数框：血球计数板或 0.1 mL 浮游植物计数框，配面积 22 mm \times 22 mm、厚度小于 0.2 mm 盖玻片。
- 6.16 摇床：转速 80 r/min~120 r/min 可调。
- 6.17 生物显微镜：正置或倒置，物镜 4 \times 、10 \times 、20 \times 、40 \times ，目镜 10 \times 或 15 \times 。
- 6.18 电子天平：分度值 0.1 mg。
- 6.19 高压蒸汽灭菌器：在 100 kPa 时，温度可达 121 °C 及以上。
- 6.20 真空过滤装置：可高压蒸汽灭菌。也可使用市售一次性无菌针筒式过滤器。
- 6.21 温度计：测量范围 0 °C~50 °C，最小分度为 0.1 °C。
- 6.22 无菌离心管：聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质，容量 50 mL~500 mL。
- 6.23 滤膜 I：孔径 0.45 μ m，玻璃纤维、醋酸纤维或硝酸纤维材质。
- 6.24 滤膜 II：孔径 0.22 μ m，玻璃纤维、醋酸纤维或硝酸纤维材质，可高压蒸汽灭菌。
- 6.25 实验室常用玻璃器皿：与试样直接接触的器皿应为玻璃或其他化学惰性材质。

7 预培养

试验开始前 2 d~4 d，在无菌操作台或无菌操作室（6.8）向三角瓶（6.9）中加入新配制的培养基（A.3），取少量贮备培养藻细胞悬液（附录 B.2）接种至三角瓶中，以较低的初始细胞密度预培养，通常 3 d 预培养的初始细胞密度为 5×10^3 cells/mL~ 1×10^4 cells/mL，使藻细胞始终保持指数增长状态，并有足够的新鲜藻细胞悬液用于后续试验。如取长期保藏的藻种（附录 B.1）预培养，则应至少转接培养 2 次。

应在光照培养箱或培养室（6.10）中按以下条件预培养：

- a) 光照：使用光照度计（6.11）于 400 nm~700 nm 波长范围内测量时，在三角瓶平

均液面高度处光照强度应在 6000 lx~10000 lx 之间。

- b) 温度：应在 21 °C~25 °C 之间选择培养温度，用温度计（6.21）测量并记录培养箱内的温度，培养过程中温度变化应在±1 °C 以内。
- c) 混匀：三角瓶在摇床（6.16）中以 100 r/min±10 r/min 持续摇转，使藻细胞均匀悬浮，或者每天定时人工摇动至少 2 次。

8 样品采集、保存和预处理

8.1 样品采集

8.1.1 地表水、地下水、生活污水和工业废水样品的采样频次、采样时间以及采样位置分别按照 HJ 91.2、HJ 164 以及 HJ 91.1 相关规定执行。

8.1.2 使用采样器（6.1）采集，将样品经粗滤网（6.2）过滤，沿采样瓶/袋（6.3）内壁缓慢倒入，样品与瓶/袋塞间不留空隙，采样量不少于 4 L。采集的样品应及时于 2 °C~8 °C 避光保存。

8.1.3 在采样时，用 pH 计（6.4）按照 HJ 1147 的规定测定样品 pH 值。

8.2 样品运输与保存

样品采集完成后，应立即置于冷藏箱（6.5）中，于 2 °C~8 °C 运输和保存，并在 48 h 内开展试验。样品采集后的 48 h 内若不能开展试验，应在 24 h 内运回实验室并尽快混匀并分装，分装量不大于分装瓶/袋（6.6）容积的 75%。于-18 °C 及以下冷冻保存，保存期不超过 60 d。

8.3 样品预处理

8.3.1 样品解冻

冷冻保存的样品应在小于 25 °C 下水浴解冻或在 2 °C~8 °C 下避光冷藏过夜解冻，解冻后混匀。

8.3.2 悬浮物去除

8.3.2.1 目视存在悬浮物的地下水、生活污水和工业废水样品（8.3.1）自然沉降 30 min~2 h，取上清液。经 2 h 自然沉降后，样品中仍可见有悬浮物时，将样品加入离心管（6.22），放入低速冷冻离心机（6.13）以 4500 g±1500 g 离心 10 min，取上清液。

8.3.2.2 地表水样品（8.3.1）应通过 0.45 μm 孔径的滤膜（6.23）过滤。

8.3.3 pH 值调节

通常不调节样品的 pH 值。若需排除 pH 值对藻细胞生长的影响，可使用盐酸溶液（5.1.4）或氢氧化钠溶液（5.1.5）调节样品 pH 值至 8.1±0.2，测定并记录调节前后样品的 pH 值。

注：调节 pH 值时，盐酸溶液（5.1.4）或氢氧化钠溶液（5.1.5）的用量应不超过样品体积的 5%。

8.3.4 营养盐添加

按照附录 A.3 培养基的配制方法，向每 987 mL 样品中分别加入 10 mL 储备液 1 (A.2.5)、1 mL 储备液 2 (A.2.6)、1 mL 储备液 3 (A.2.7) 和 1 mL 储备液 4 (A.2.8)。

9 测试步骤

9.1 LID测定试样组制备

9.1.1 试样稀释

根据试验目的，如需测定样品 LID 时，按稀释倍数 (D) 为 1、2、3、4、6、8、12、16、24、32……的稀释系列稀释。参照表 1，各取一定量的经预处理样品 (8.3.4)，加入培养基 (A.3)，配制 $D=2$ 和 $D=3$ 的稀释样品 (试样) 后，使用培养基 (A.3) 逐级稀释，每次稀释 2 倍，制备不同稀释倍数的试样。

表 1 逐级稀释系列及试样的组成 (以 120 mL 试样计)

D	$V_{\text{样品}}/V_{\text{试样}} (\%)$	试样组成 (mL)	
		样品/试样	培养基
1	100.0	样品 (8.3.4) 120.0	0
2	50.0	样品 (8.3.4) 120.0	120.0
3	33.3	样品 (8.3.4) 80.0	160.0
4	25.0	$D=2$ 试样 120.0	120.0
6	16.7	$D=3$ 试样 120.0	120.0
8	12.5	$D=4$ 试样 120.0	120.0
12	8.3	$D=6$ 试样 120.0	120.0
16	6.2	$D=8$ 试样 120.0	120.0
24	4.2	$D=12$ 试样 120.0	120.0
32	3.1	$D=16$ 试样 120.0	120.0
...

注： $D=2$ 及以上稀释倍数制备 240 mL，其中 120 mL 用于本稀释级三个平行样的试样，其余 120 mL 用于下一级稀释。

9.1.2 试样组制备

9.1.2.1 至少选择 3 个连续浓度，每个浓度设置 3 个平行。

9.1.2.2 在三角瓶 (6.9) 中加入 40 mL~50 mL 试样 (9.1.1)，制成 LID 测定试样组。各三角瓶中的试样体积应相同。

9.2 EC_{50} 测定试样组制备

9.2.1 预试验

9.2.1.1 如需测定样品 EC_{50} 时，可通过预试验，确定对藻细胞的生长抑制率 100% (或最大抑制率) ~0% 所对应的试样浓度范围 (以体积分数计)。以逐级稀释倍数 (即等比数列的公比) 10，用培养基 (A.3) 逐级稀释配制 3 个连续浓度的试样。按照 9.1.2.2 对加入试样体积的要求，将试样加入三角瓶 (6.9) 中。预试验可不设平行。

9.2.1.2 测试结束时，若样品（8.3.4）对藻细胞生长抑制率 $>40\%$ ，应开展正式试验（9.2.2）。若样品（8.3.4）对藻细胞生长抑制率 $\leq 40\%$ ，则开展限度试验（9.2.3）。

9.2.2 正式试验

在预试验确定的生长抑制率 100% （或最大抑制率） $\sim 0\%$ 所对应的浓度范围内，按逐级稀释倍数（即等比数列的公比） ≤ 3.2 ，用培养基（A.3）逐级稀释样品（8.3.4），配制至少5个连续浓度的试样。在生长抑制率 $10\% \sim 90\%$ 之间，应至少有1个浓度组的试样对藻细胞生长抑制率大于 EC_{50} 和1个浓度组的试样对藻细胞生长抑制率小于 EC_{50} 。每个浓度组设3个平行，按照9.1.2.2对加入试样体积的要求，将试样加入三角瓶（6.9）中，制成 EC_{50} 测定试样组。

9.2.3 限度试验

限度试验设置6个平行，按照9.1.2.2对加入试样体积的要求，将样品（8.3.4）加入三角瓶（6.9）中，制成限度试验试样组。

9.3 空白对照组制备

制备LID测定试样组（9.1）、 EC_{50} 测定试样组（9.2）或参比物测定试样组（12.1）时，应同时设置空白对照。向空三角瓶（6.9）中加入与试样组三角瓶中试样等体积的培养基（A.3），制备空白对照组。空白对照组除预试验（9.2.1）只设置1个平行外，其余试验均应设置6个平行。

9.4 接种物制备和接种

9.4.1 接种物制备

9.4.1.1 测定经预培养的藻细胞悬液（7）细胞密度。

9.4.1.2 如测定的藻细胞密度在 5×10^5 cells/mL $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL之间，经预培养的藻细胞悬液（7）可直接作为接种物。否则，应使用培养基（A.3）稀释或低速冷冻离心机（6.13）以 1000 g 离心 5 min 浓缩，将藻细胞密度调整至 5×10^5 cells/mL $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL之间后作为接种物。

9.4.2 接种

9.4.2.1 将试样组（9.1、9.2或12.1）和空白对照组（9.3）三角瓶放置于培养箱或培养室（6.10）中，避光平衡至测试培养温度。

9.4.2.2 将三角瓶转移至无菌操作台上或无菌操作室内（6.8）。均按 $100:1$ 的体积比（如 40 mL 试样接种 0.4 mL 藻细胞悬液），将接种物（9.4.1.2）摇匀后加入到各三角瓶中，使接种后试样组和空白对照组的初始藻细胞密度相同，且在 5×10^3 cells/mL $\sim 1 \times 10^4$ cells/mL之间。

9.4.2.3 三角瓶覆盖透气封口膜或硅胶塞后摇匀，立即置于光照培养箱或培养室（6.10）中。

9.5 测试培养

9.5.1 培养条件：光照、温度和藻细胞混匀方式参照预培养（7），且各三角瓶之间液面高度处的光照强度变异系数应不超过 10%。测试有色样品时，应使用摇床（6.16）以 100 r/min±10 r/min 持续摇转培养。

9.5.2 培养时间：72 h±2 h。

9.6 观察和计数

9.6.1 测试培养开始后，每 24 h±1 h 测定每个三角瓶中的藻细胞密度，0 h 的细胞密度可采用试样接种后的初始细胞密度值。

9.6.2 测定时，摇动三角瓶使藻细胞均匀悬浮，用微量移液器（6.14）取 0.1 mL 藻细胞悬液加入计数框（6.15）中，用盖玻片将计数框完全覆盖，可参照 HJ 1216 的规定，在生物显微镜（6.17）下测定藻细胞数量，同时观察并记录藻细胞的生长发育异常情况。

9.6.3 每个三角瓶内的藻细胞悬液至少计数 2 次，以算术平均值作为计数结果，若 2 次计数结果相对偏差大于 15%，应再次混匀藻细胞悬液后重新计数。

9.7 pH 值测定

测试培养开始前和结束后，从每个浓度的试样组和空白对照组中各取一只三角瓶，按照 HJ 1147 的规定用 pH 计（6.4）测定并记录瓶中藻细胞悬液的 pH 值。其中，培养前试样组的 pH 值，也可在试样分装至三角瓶前测定。

10 结果计算和表示

10.1 比生长率的计算

空白对照组和各浓度试样中的藻细胞比生长率，按公式（1）计算。

$$\mu = \frac{\ln n_L - \ln n_0}{t_L - t_0} \quad (1)$$

式中：μ——藻细胞比生长率，d⁻¹；

n_L —— t_L 时间测定的藻细胞密度，cells/mL；

n_0 ——初始接种时的藻细胞密度，cells/mL；

t_L ——试验结束时间，d；

t_0 ——试验开始时间，d。

10.2 生长抑制率的计算

各浓度试样以比生长率为基础的生长抑制率，按公式（2）计算。

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

式中： $I_{\mu i}$ ——浓度组 i 试样的藻细胞生长抑制率，%；

μ_c ——空白对照组的藻细胞平均比生长率，d⁻¹；

μ_i ——浓度组 i 试样的藻细胞比生长率，d⁻¹。

10.3 LID 的确定

藻细胞算术平均生长抑制率 $<5\%$ 的最低稀释倍数，即为最低无效应稀释倍数 LID，LID 的结果应为整数，如 LID=2。

10.4 EC_{50} 的计算

EC_{50} 可按照附录 C 方法计算，也可按照 GB/T 21805 相关规定选用适当的非线性回归方法计算。

11 有效性、敏感性及精密度

11.1 有效性及敏感性

六家实验室对参比物（5.1.3）各重复测定 6 次。整个测试期间，空白对照组平均藻细胞比生长率在 $1.47 d^{-1} \sim 1.78 d^{-1}$ 之间，各平行的比生长率变异系数在 $0.4\% \sim 3.6\%$ 之间，空白对照组相对于培养基的 pH 值升高在 $0.12 \sim 1.08$ 之间。测试各阶段（ $0 d \sim 1 d$ 、 $1 d \sim 2 d$ 和 $2 d \sim 3 d$ ），空白对照组各平行的不同阶段比生长率变异系数的平均值在 $7.5\% \sim 32.8\%$ 之间。参比物 72 h EC_{50} 在 $2.00 mg/L \sim 3.45 mg/L$ 之间。

11.2 精密度

11.2.1 六家实验室分别对地表水样品各重复测定 6 次，分别计算 LID 及 72 h EC_{50} 。地表水样品 LID 均为 1，72 h EC_{50} 均大于 100%。LID 实验室内相对标准偏差、实验室间相对标准偏差均为 0。

11.2.2 六家实验室分别对地下水样品各重复测定 6 次，分别计算 LID 及 72 h EC_{50} 。地下水样品 LID 为 1~2，72 h EC_{50} 均大于 100%。LID 实验室内相对标准偏差分别为 0、0、22.3%、22.3%、0、0，实验室间相对标准偏差为 13.1%。

11.2.3 六家实验室分别对生活污水样品各重复测定 6 次，分别计算 LID 及 72 h EC_{50} 。生活污水样品 LID 为 6~8，实验室内相对标准偏差分别为 14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、14.1%、15.6%，实验室间相对标准偏差为 13.4%。72 h EC_{50} 在 $33.2\% \sim 54.0\%$ 之间，实验室内相对标准偏差分别为 13.9%、8.0%、15.1%、16.5%、14.9%、16.3%，实验室间相对标准偏差为 16.7%。

11.2.4 六家实验室分别对工业废水样品各重复测定 6 次，分别计算 LID 及 72 h EC_{50} 。工业废水样品 LID 为 24~32，实验室内相对标准偏差分别为 12.9%、0、0、15.5%、12.9%、15.6%，实验室间相对标准偏差为 12.6%。72 h EC_{50} 在 $4.4\% \sim 6.1\%$ 之间，实验室内相对标准偏差分别为 8.4%、6.1%、8.1%、8.3%、8.2%、12.4%，实验室间相对标准偏差为 8.5%。

12 质量保证和质量控制

12.1 参比物测定

在样品测试时或定期（每年至少 2 次）开展参比物试验，通过测定参比物的 72 h EC_{50} ，判断受试生物的敏感性和测试体系的有效性。参比物试样组参照 9.2.2 的方式制备。

12.2 试验的有效性判定

12.2.1 参比物结果的判定

实验室最近一次参比物测试，3,5-二氯苯酚 72 h EC₅₀ 范围应在 2.00 mg/L~4.68 mg/L 之间。

12.2.2 试验结果的判定

试验结果应符合下列要求，结果方为有效：

- a) 空白对照组平均比生长率至少为 1.4 d⁻¹，相当于在 72 h 试验期内，藻细胞密度应至少增加 67 倍；
- b) 整个试验期间，空白对照组各平行的比生长率变异系数≤5%；
- c) 试验各阶段（0 d~1 d、1 d~2 d 和 2 d~3 d），对照组各平行的不同阶段比生长率变异系数的平均值≤35%；
- d) 相对于培养基，空白对照组 pH 值升高≤1.5 个单位。

如果试验结果不符合上述要求，应查明原因后重新试验。

13 试验报告

试验报告应包括但不限于以下内容：

- a) 藻种名称、来源；
- b) 样品类型、来源、主要污染物组分（适用时）、保存方法及保存时间；
- c) 样品预处理方法，包括样品解冻、悬浮物去除和 pH 调节等信息；
- d) 测试开始和持续时间；
- e) 测试条件，包括测试温度、光照强度和三角瓶摇动方式等信息；
- f) 质量保证和质量控制要求的符合性；
- g) 测试结果 LID 或 72 h EC₅₀ 及其计算方法、95%置信区间（适用时）；
- h) 藻细胞的其他可见效应。

附 录 A
(规范性附录)
培养基制备

A.1 培养基试剂

- A.1.1 氯化锌 (ZnCl_2)。
- A.1.2 氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.3 氯化铜 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.4 钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.5 氯化铵 (NH_4Cl)。
- A.1.6 氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.7 氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.8 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.9 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。
- A.1.10 氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.11 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.12 硼酸 (H_3BO_3)。
- A.1.13 氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。
- A.1.14 碳酸氢钠 (NaHCO_3)。

A.2 培养基储备液配制

- A.2.1 氯化锌储备液: $\rho(\text{ZnCl}_2)=0.3 \text{ g/L}$ 。

称取 0.3 g 氯化锌 (A.1.1), 溶于少量纯水中, 用纯水定容至 1000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

- A.2.2 氯化钴储备液: $\rho(\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})=0.15 \text{ g/L}$ 。

称取 0.15 g 氯化钴 (A.1.2), 溶于少量纯水中, 用纯水定容至 1000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

- A.2.3 氯化铜储备液: $\rho(\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=0.01 \text{ g/L}$ 。

称取 0.01 g 氯化铜 (A.1.3), 溶于少量纯水中, 用纯水定容至 1000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

- A.2.4 钼酸钠储备液: $\rho(\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=0.7 \text{ g/L}$ 。

称取 0.7 g 钼酸钠 (A.1.4), 溶于少量纯水中, 用纯水定容至 1000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

- A.2.5 储备液 1: 常量元素。

分别称取 1.5 g 氯化铵 (A.1.5)、1.2 g 氯化镁 (A.1.6)、1.8 g 氯化钙 (A.1.7)、1.5 g 硫酸镁 (A.1.8) 和 0.16 g 磷酸二氢钾 (A.1.9), 各溶于少量纯水中, 混合后, 用纯水定容至 1000 mL。经 0.22 μm 无菌滤膜 (6.24) 过滤或 121 $^\circ\text{C}$ 、15 min 高压蒸汽灭菌后, 4 $^\circ\text{C}$ 避光冷藏保存, 可保存 6 个月。

- A.2.6 储备液 2: Fe-EDTA。

分别称取 0.064 g 氯化铁 (A.1.10) 和 0.1 g 乙二胺四乙酸二钠 (A.1.11)，各溶于少量纯水中，混合后，用纯水定容至 1000 mL。经 0.22 μm 无菌滤膜 (6.24) 过滤或 121 °C、15 min 高压蒸汽灭菌后，4 °C 避光冷藏保存，可保存 6 个月。

A. 2. 7 储备液 3: 微量元素。

分别称取 0.185 g 硼酸 (A.1.12)、0.415 g 氯化锰 (A.1.13)，各溶于少量纯水中，混合后，加入 10 mL 氯化锌储备液 (A.2.1)、10 mL 氯化钴储备液 (A.2.2)、1 mL 氯化铜储备液 (A.2.3) 和 10 mL 钼酸钠储备液 (A.2.4)，用纯水定容至 1000 mL。经 0.22 μm 无菌滤膜 (6.24) 过滤或 121 °C、15 min 高压蒸汽灭菌后，4 °C 避光冷藏保存，可保存 6 个月。

A. 2. 8 储备液 4: 碳酸氢钠 (NaHCO₃)。

称取 50 g 碳酸氢钠 (A.1.14)，溶于少量纯水中，用纯水定容至 1000 mL。经 0.22 μm 无菌滤膜 (6.24) 过滤后，4 °C 避光冷藏保存，可保存 6 个月。

A. 3 培养基配制

以 1 L 培养基为例。向 500 mL 试验用水中分别加入 10 mL 储备液 1 (A.2.5)、1 mL 储备液 2 (A.2.6)、1 mL 储备液 3 (A.2.7) 和 1 mL 储备液 4 (A.2.8)，用纯水定容至 1000 mL。4 °C 避光冷藏保存。测试前 1 d 配制，与空气接触放置过夜；或当天配制，用 0.22 μm 无菌滤膜 (6.24) 过滤后的空气曝气 30 min，使培养基与空气平衡。必要时，使用盐酸溶液 (5.1.4) 或氢氧化钠溶液 (5.1.5) 调节培养基 pH 值至 8.1±0.2 范围内。储备液和培养基中的营养物浓度见表 A.1。

表 A. 1 储备液和培养基中营养物浓度

储备液	营养成分	储备液中的浓度	培养基中的终浓度
储备液 1: 常量元素	氯化铵 (NH ₄ Cl)	1.5 g/L	15 mg/L (N: 3.9 mg/L)
	氯化镁 (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	1.2 g/L	12 mg/L (Mg: 2.9 mg/L)
	氯化钙 (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	1.8 g/L	18 mg/L (Ca: 4.9 mg/L)
	硫酸镁 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	1.5 g/L	15 mg/L (S: 1.95 mg/L)
	磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	0.16 g/L	1.6 mg/L (P: 0.36 mg/L)
储备液 2: Fe-EDTA	FeCl ₃ · 6H ₂ O	64 mg/L	64 μg/L (Fe: 13 μg/L)
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mg/L	100 μg/L
储备液 3: 微量元素	硼酸 (H ₃ BO ₃)	185 mg/L	185 μg/L (B: 32 μg/L)
	氯化锰 (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	415 mg/L	415 μg/L (Mn: 115 μg/L)
	氯化锌 (ZnCl ₂)	3 mg/L	3 μg/L (Zn: 1.4 μg/L)
	氯化钴 (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	1.5 mg/L	1.5 μg/L (Co: 0.37 μg/L)
	氯化铜 (CuCl ₂ · 2H ₂ O)	0.01 mg/L	0.01 μg/L (Cu: 3.7 ng/L)
	钼酸钠 (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	7 mg/L	7 μg/L (Mo: 2.8 μg/L)
储备液 4: 碳酸氢钠	碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	50 g/L	50 mg/L (C: 7.14 mg/L)

附 录 B
（规范性附录）
藻种保藏和贮备培养

B.1 长期保藏

新购藻种按其来源要求的保藏方式保藏。经实验室扩繁后，则选择处于指数生长后期，且无其他藻类或细菌污染的健康藻种保藏。在无菌操作台上或无菌操作室（6.8）内，将藻细胞悬液分装至无菌离心管（6.22），装量不超过管体积的 90%（预留气体交换空间），盖上管盖后用封口膜密封，使用铝箔完全包裹离心管后置于冰箱（6.12）中于 2℃~6℃ 避光保藏，大约每隔 6 个月转接 1 次。

B.2 贮备培养

如经常开展试验，藻种可在培养基（A.3）中贮备培养。在无菌操作台上或无菌操作室（6.8）内，向三角瓶（6.9）中加入培养基，接种保藏的藻种（B.1），于 20℃、1500 lx~2500 lx 持续光照条件下贮备培养，7 d 转接一次，一般在生长停滞前即应转接，以保持藻种生长良好，随时有足够数量的藻细胞贮备液可用于试验。

B.3 检查

应经常检查长期保藏（B.1）和贮备培养（B.2）中的藻种细胞生长情况，有畸形或受到其他藻类或细菌污染时应予以废弃并重新购买。

附录 C
(资料性附录)

直线内插法计算 EC₅₀ 示例

以下为直线内插法计算废水对近头状尖胞藻半数效应浓度 (EC₅₀) 的计算示例。

C.1 藻细胞计数结果

某工业废水对近头状尖胞藻生长抑制试验的细胞计数结果如表 C.1 所示。

表 C.1 藻细胞计数结果

废水体积分数 (%)	平行	藻细胞密度 (×10 ⁴ cells/mL)		废水体积分数 (%)	平行	藻细胞密度 (×10 ⁴ cells/mL)	
		0 h	72 h			0 h	72 h
0	1	0.5	118.5	12.5	1	0.5	87.5
	2	0.5	112.0		2	0.5	92.0
	3	0.5	123.5		3	0.5	98.0
	4	0.5	110.5	25.0	1	0.5	55.0
	5	0.5	118.0		2	0.5	52.0
	6	0.5	121.5		3	0.5	48.5
3.12	1	0.5	112.5	50.0	1	0.5	23.0
	2	0.5	116.0		2	0.5	26.0
	3	0.5	121.0		3	0.5	21.5
6.25	1	0.5	106.0	100	1	0.5	4.0
	2	0.5	101.5		2	0.5	2.5
	3	0.5	103.0		3	0.5	3.0

C.2 计算藻细胞比生长率

藻细胞比生长率按公式 (C.1) 计算。

$$\mu_{i,j} = (\ln n_{L,i,j} - \ln n_0) / (t_L - t_0) \quad (C.1)$$

式中: $\mu_{i,j}$ —— 浓度组 i 平行 j 的藻细胞比生长率, d⁻¹;

$n_{L,i,j}$ —— 浓度组 i 平行 j 的藻细胞密度, ×10⁴ cells/mL;

n_0 —— 初始接种的藻细胞密度, ×10⁴ cells/mL;

t_L —— 试验结束时间, d;

t_0 —— 试验开始时间, d。

以空白对照组平行 1 为例, 藻细胞比生长率计算如下:

$$\mu_{c,1} = (\ln 118.5 - \ln 0.5) / (3 - 0) = 1.8227 \text{ (d}^{-1}\text{)}$$

各浓度组的藻细胞比生长率样本均值按公式 (C.2) 计算。

$$\mu_i = \sum_{j=1}^{N_i} \mu_{i,j} / N_i \quad (C.2)$$

式中： μ_i ——浓度组*i*的藻细胞比生长率样本均值， d^{-1} ；

$\mu_{i,j}$ ——浓度组*i*平行*j*的藻细胞比生长率， d^{-1} ；

N_i ——浓度组*i*的平行数量。

以空白对照组为例，6个平行的藻细胞比生长率样本均值计算如下：

$$\mu_c = (1.8227 + 1.8039 + 1.8365 + 1.7994 + 1.8213 + 1.8310) / 6 = 1.8191 \quad (d^{-1})$$

空白对照组和各浓度组的藻细胞比生长率及样本均值的计算结果见表C.2。

表 C.2 藻细胞比生长率及样本均值计算结果

废水体积分数 (%)	平行	$\mu_{i,j}$ (d^{-1})	μ_i (d^{-1})	废水体积分数 (%)	平行	$\mu_{i,j}$ (d^{-1})	μ_i (d^{-1})
0	1	1.8227	1.8191	12.5	1	1.7216	1.7398
	2	1.8039			2	1.7383	
	3	1.8365			3	1.7594	
	4	1.7994		25.0	1	1.5668	1.5466
	5	1.8213			2	1.5481	
	6	1.8310			3	1.5249	
3.12	1	1.8054	1.8169	50.0	1	1.2762	1.2823
	2	1.8156			2	1.3171	
	3	1.8296			3	1.2537	
6.25	1	1.7855	1.7775	100	1	0.6931	0.6090
	2	1.7711			2	0.5365	
	3	1.7760			3	0.5973	

C.3 计算废水体积分数对数和藻细胞生长抑制率

以 10 为底，计算浓度组 *i* 的废水体积分数对数 $\lg \phi_i$ 。

浓度组 *i* 平行 *j* 的藻细胞生长抑制率按公式 (C.3) 计算。

$$I_{\mu_{i,j}} = \frac{\mu_c - \mu_{i,j}}{\mu_c} \times 100 \quad (C.3)$$

式中： $I_{\mu_{i,j}}$ ——浓度组 *i* 平行 *j* 的藻细胞生长抑制率，%；

μ_c ——空白对照组的藻细胞比生长率样本均值， d^{-1} ；

$\mu_{i,j}$ ——浓度组 *i* 平行 *j* 的藻细胞比生长率， d^{-1} 。

以浓度组 1 平行 1 为例，藻细胞生长抑制率计算如下：

$$I_{\mu_{1,1}} = \frac{1.8191 - 1.8054}{1.8191} \times 100 = 0.7531 \quad (\%)$$

浓度组 *i* 的藻细胞生长抑制率样本均值按公式 (C.4) 计算。

$$I_{\mu_i} = \sum_{j=1}^{N_i} I_{\mu_{i,j}} / N_i \quad (C.4)$$

式中： I_{μ_i} ——浓度组 *i* 的藻细胞生长抑制率样本均值，%；

$I_{\mu_{i,j}}$ ——浓度组 *i* 平行 *j* 的藻细胞生长抑制率，%；

N_i ——浓度组 i 的平行数量。

以浓度组 1 为例，3 个平行的藻细胞生长抑制率样本均值计算如下：

$$I_{\mu 1} = [0.7531 + 0.1924 + (-0.5772)] / 3 = 0.1228 \quad (\%)$$

浓度组 i 的藻细胞生长抑制率样本方差按公式 (C.5) 计算。

$$s_{ii}^2 = \sum_{j=1}^{N_i} (I_{\mu i, j} - I_{\mu i})^2 / (N_i - 1) \quad (\text{C.5})$$

式中： s_{ii}^2 ——浓度组 i 的藻细胞生长抑制率样本方差；

$I_{\mu i, j}$ ——浓度组 i 平行 j 的藻细胞生长抑制率，%；

$I_{\mu i}$ ——浓度组 i 的藻细胞生长抑制率样本均值，%；

N_i ——浓度组 i 的平行数量。

以浓度组 1 为例，3 个平行的藻细胞生长抑制率样本方差计算如下：

$$s_{11}^2 = [(0.7531 - 0.1228)^2 + (0.1924 - 0.1228)^2 + (-0.5772 - 0.1228)^2] / (3 - 1) = 0.4461$$

浓度组 i 的藻细胞生长抑制率样本均值方差的估计值按公式 (C.6) 计算。

$$S_{ii}^2 = s_{ii}^2 / N_i \quad (\text{C.6})$$

式中： S_{ii}^2 ——浓度组 i 的藻细胞生长抑制率样本均值方差的估计值；

s_{ii}^2 ——浓度组 i 的藻细胞生长抑制率样本方差；

N_i ——浓度组 i 的平行数量。

以浓度组 1 为例，3 个平行的藻细胞生长抑制率样本均值方差的估计值计算如下：

$$S_{11}^2 = 0.4461 / 3 = 0.1487$$

各浓度组的废水体积分数对数和藻细胞生长抑制率的样本均值、样本方差、样本均值方差的估计值计算结果见表 C.3。

表 C.3 生长抑制率相关计算结果

浓度组	废水体积分数 φ_i (%)	废水体积分数 对数 $\lg \varphi_i$	生长抑制率 (%)					
			平行 1	平行 2	平行 3	$I_{\mu i}$	s_{ii}^2	S_{ii}^2
1	3.12	0.4942	0.7531	0.1924	-0.5772	0.1228	0.4461	0.1487
2	6.25	0.7959	1.8471	2.6387	2.3693	2.2850	0.1620	0.0540
3	12.5	1.0969	5.3598	4.4418	3.2818	4.3611	1.0844	0.3615
4	25.0	1.3979	13.8695	14.8975	16.1728	14.9799	1.3314	0.4438
5	50.0	1.6990	29.8444	27.5961	31.0813	29.5073	3.1219	1.0406
6	100	2.0000	61.8987	70.5074	67.1651	66.5237	18.8359	6.2786

C.4 采用直线内插法计算 EC_{50}

见表 C.3，相邻浓度组中，浓度组 6 的藻细胞生长抑制率样本均值 $I_{\mu 6} > 50\%$ ，浓度组 5 的藻细胞生长抑制率样本均值 $I_{\mu 5} < 50\%$ 。以浓度组 5 和浓度组 6 的废水体积分数对数和藻细胞生长抑制率样本均值得到直线关系。采用直线内插法， EC_{50} 的废水体积分数对数按公式 (C.7) 计算。

$$\lg EC_{50} = \lg \varphi_5 + (50 - I_{\mu 5})(\lg \varphi_6 - \lg \varphi_5) / (I_{\mu 6} - I_{\mu 5}) \quad (C.7)$$

式中：EC₅₀——藻细胞生长抑制率为 50% 时的废水体积分数，%；

φ_5 ——浓度组 5 的废水体积分数，%；

50——50% 藻细胞生长抑制率；

$I_{\mu 5}$ ——浓度组 5 的藻细胞生长抑制率样本均值，%；

φ_6 ——浓度组 6 的废水体积分数，%；

$I_{\mu 6}$ ——浓度组 6 的藻细胞生长抑制率样本均值，%。

lg EC₅₀ 和 EC₅₀ 的计算如下：

$$\lg EC_{50} = 1.6990 + (50 - 29.5073)(2.0000 - 1.6990) / (66.5237 - 29.5073) = 1.8656$$

$$EC_{50} = 10^{1.8656} = 73.4 \quad (\%)$$

C.5 计算 EC₅₀ 的 95% 置信限

以浓度组 5 和浓度组 6 的废水体积分数对数及藻细胞生长抑制率样本均值、样本均值方差，计算 lg EC₅₀ 的方差。

lg EC₅₀ 是 $I_{\mu 5}$ 和 $I_{\mu 6}$ 的函数：

$$\lg EC_{50} = \lg \varphi_5 + (50 - I_{\mu 5})(\lg \varphi_6 - \lg \varphi_5) / (I_{\mu 6} - I_{\mu 5})$$

分别对 $I_{\mu 5}$ 和 $I_{\mu 6}$ 求偏导数，得到：

$$\begin{aligned} \frac{\partial \lg EC_{50}}{\partial I_{\mu 5}} &= (50 - I_{\mu 6})(\lg \varphi_6 - \lg \varphi_5) / (I_{\mu 6} - I_{\mu 5})^2 \\ &= (50 - 66.5237)(2.0000 - 1.6990) / (66.5237 - 29.5073)^2 \\ &= -0.00363 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial \lg EC_{50}}{\partial I_{\mu 6}} &= -(50 - I_{\mu 5})(\lg \varphi_6 - \lg \varphi_5) / (I_{\mu 6} - I_{\mu 5})^2 \\ &= -(50 - 29.5073)(2.0000 - 1.6990) / (66.5237 - 29.5073)^2 \\ &= -0.00450 \end{aligned}$$

lg EC₅₀ 的方差近似：

$$\begin{aligned} S_{\lg EC_{50}}^2 &\approx \left(\frac{\partial \lg EC_{50}}{\partial I_{\mu 5}} \right)^2 S_{I_5}^2 + \left(\frac{\partial \lg EC_{50}}{\partial I_{\mu 6}} \right)^2 S_{I_6}^2 \\ &= (-0.00363)^2 \times 1.0406 + (-0.00450)^2 \times 6.2786 \\ &= 0.00014085 \end{aligned}$$

$$S_{\lg EC_{50}} = \sqrt{S_{\lg EC_{50}}^2} = \sqrt{0.00014085} = 0.01187$$

置信水平：P=95%

自由度： $f = (N_5 - 1) + (N_6 - 1) = (3 - 1) + (3 - 1) = 4$

查 t 检验的 P 值对照表，自由度为 4，置信水平为 95%，得到 t 值（双侧）为 2.776。

lg EC₅₀ 的 95%置信上限:

$$\lg EC_{50} + t_{0.025,4} \times S_{\lg EC_{50}} = 1.8656 + 2.776 \times 0.01187 = 1.8986$$

lg EC₅₀ 的 95%置信下限:

$$\lg EC_{50} - t_{0.025,4} \times S_{\lg EC_{50}} = 1.8656 - 2.776 \times 0.01187 = 1.8326$$

转换为体积分数浓度:

$$10^{1.8986} = 79.2 \quad (\%)$$

$$10^{1.8326} = 68.0 \quad (\%)$$

则 EC₅₀ 的 95%置信区间为 68.0%~79.2%。
