

附件11

《水质 急性毒性的现场快速测定 发光
细菌法（征求意见稿）》
编制说明

《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法》

标准编制组

二〇二五年十一月

项目名称：水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法

项目统一编号：2020-L-77

承担单位：中国科学院生态环境研究中心

编制组主要成员：李红岩 于志勇 王 莉 杨 敏 马 梅 饶凯锋

中国环境监测总站技术管理负责人：许人骥

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.....	3
2.1 被测对象的环境危害.....	3
2.2 相关环保标准和环保工作的需要.....	4
2.3 标准制定的基础.....	5
3 国内外相关分析方法研究.....	8
3.1 主要国家、地区及国际组织相关标准分析方法研究.....	8
3.2 国内相关分析方法研究.....	8
3.3 文献资料研究.....	11
3.4 与本方法标准的关系.....	11
4 标准制订的基本原则和技术路线.....	13
4.1 标准制订的基本原则.....	13
4.2 标准制订的技术路线.....	13
5 方法研究报告.....	15
5.1 方法研究的目标.....	15
5.2 术语和定义.....	17
5.3 方法原理.....	18
5.4 试剂和材料.....	18
5.5 仪器和设备.....	20
5.6 样品.....	21
5.7 分析步骤.....	22
5.8 结果计算与表示.....	33
5.9 质量保证和质量控制.....	35
6 方法比对.....	42
6.1 方法比对方案.....	42
6.2 方法比对过程及结论.....	43
7 方法验证.....	50
7.1 方法验证方案.....	50
7.2 验证过程及结论.....	52
8 与开题报告的差异说明.....	55
9 标准征求意见稿技术审查情况.....	56
10 标准实施建议.....	56
11 参考文献.....	56
附件一 方法验证报告.....	61

《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

为贯彻落实《关于加强生态环境应急监测工作的意见》（环办监测〔2018〕40号），进一步完善环境应急监测技术体系，有力支撑突发环境事件应急处置等工作，经生态环境部立项批准成立绿色通道现场应急监测项目（监测函〔2020〕73号），开展《水质 综合毒性的测定 现场快速监测发光细菌法》的标准制订工作。由中国科学院生态环境研究中心承担该标准的制订工作。项目统一编号为2020-L-77。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组，编制标准文本和编制说明初稿

2020年10月10日，生态环境部生态环境监测司向项目承担单位中国科学院生态环境研究中心下达了制定现场应急监测标准的任务，中国科学院生态环境研究中心接到项目通知后，组织核心技术骨干成立了标准编制组。在前期研究的基础上完成了资料收集、文献调研、仪器调试，追踪发光细菌法在国内外的最新研究成果及发展趋势，根据标准研制需求以及初步调研结果，制定了详细的研制计划和分工安排，开展标准方法研究工作，基本确定了仪器测试条件，同时开展了背景噪声、阴性对照、阳性对照和水样测试等方法论证工作，形成了方法研究报告，并组织了6家实验室进行了方法验证。编制组根据研究报告和验证结果，确定标准文本和编制说明初稿。

1.2.2 组织专家论证，补充方法验证和方法比对实验

2021年1月13日~11月30日，编制组组织专家对标准文本和编制说明初稿进行论证，并根据专家意见和HJ 168—2020的要求组织了第7家验证单位对标准方法进行了验证、补充了方法比对实验和精密度实验。2021年12月31日，中国环境监测总站发布了《水质 综合毒性的测定 现场快速监测发光细菌法（试行）》的环境应急监测方法。

1.2.3 编制标准征求意见稿和编制说明

2021年12月1日~2022年4月20日，编制组根据验证结果及方法比对实验结果对方法文本和编制说明经内部讨论后进行修改，形成了标准文本和编制说明征求意见稿。其中2022年2月向监测司、环境监测总站进行了标准进展汇报。

2022年5月5日~6月27日，编制组内部征求专家意见，共收到意见191条，其中采纳及部分采纳的188条，未采纳3条，编制组根据专家意见补充了实验及数据，对方法标准文本和编制说明征求意见稿进行了修改完善并提交中国环境监测总站。

1.2.4 标准内部专家评估、补充实验、征求意见及技术审查

2023年11月17日~2024年2月28日,编制组组织了5位专家对标准进行了评估,并提出了修改补充意见。编制组根据意见补充了浊度条件实验及2种生活污水的验证实验,对方法文本和编制说明经内部讨论后进行修改。

2024年2月28日~3月28日,编制组进行了征求意见,共收到意见12条,编制组根据专家意见对方法标准文本和编制说明征求意见稿进行了修改。

2024年5月8日,编制组组织了7位专家对标准进行了技术审查,并提出27条修改意见。

2024年11月4日~2025年3月25日,编制组根据专家意见重新组织了方法验证实验,采用国产3种仪器和进口2种仪器对一样品进行方法验证,验证结果经数据检验后计算精密密度结果,并对标准文本和编制说明进行了修改完善。2025年4月2日在生态环境监测标准管理平台上提交了《水质 综合急性毒性的测定 现场快速监测发光细菌法》标准征求意见稿和编制说明。

1.2.5 征求意见稿技术审查会前函审

2025年5月23日,技术支持单位反馈了会前函审专家的意见,技术支持单位和三名函审专家共提出了35条意见。意见主要为:①标准名称修改为《水质 综合急性毒性的现场快速监测 发光细菌法》,②删除适用范围中的实验室内检测,③补充发光细菌技术验收要求以及敏感性和测试过程中的活性衰减要求等。标准编制组根据专家意见对标准征求意见稿和编制说明进行了修改完善。

2025年6月23日,提交了《水质 综合急性毒性的现场快速监测 发光细菌法》标准征求意见稿和编制说明修改版。

1.2.6 召开征求意见稿技术审查会

2025年7月4日,生态环境部生态环境监测司以腾讯会议方式召开《水质 综合急性毒性的现场快速监测 发光细菌法》征求意见稿技术审查会,专家组听取了标准主编单位所作的标准征求意见稿的主要技术内容、编制工作过程,经质询、讨论,专家组通过该标准征求意见稿的技术审查并形成专家意见。标准编制组根据征求意见稿技术审查会意见,补充海水的相关实验、对标准进一步修改和完善,正式提交《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法(征求意见稿)》及其编制说明。

1.2.7 技术研讨会

2025年10月28日,为进一步明确《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法》的适用范围和与正在修订的实验室方法标准的关系,中国环境监测总站以腾讯会议方式组织召开专家研讨会。编制组汇报了关于该标准适用范围的考虑及与正在修订的实验室方法的异同,专家组经质询、讨论,形成的意见主要有:①分设标准可解决实验室方法(精准但耗时)与现场方法(快速但半定量)的定位冲突,满足管理需求,②明确现场方法为初筛工具,实验室方法为执法依据;简化现场流程,突出设备便携性与成本可控性;通过抑制率阈值实现

与氯化汞当量的间接关联。标准编制组根据专家意见，补充氯化汞的相关实验、对标准进一步修改和完善，正式提交《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法（征求意见稿）》及其编制说明。

2 标准制订的必要性

2.1 被测对象的环境危害

2.1.1 急性毒性的基本性质

随着社会经济的迅速发展，我国水环境问题日益严峻，传统的水环境监测以常规理化指标为主，监测参数有限，而自然界的污染物成千上万种，传统的水环境监测不仅会花费大量的时间和人工，并且难以满足当前污染物的监控预警需求。同时，常规理化指标检测仅能度量水体中污染物的浓度，不能评价其生态效应，更不能体现污染物之间联合作用（协同、叠加、拮抗作用等）所导致的生态毒理影响。此外，小部分低浓度的高毒物质也不能通过常规理化指标检测方法检测出来，无法反映低浓度高毒物质对水生生物的毒性效应^[1]。与传统检测方法相比，急性毒性可以灵敏而准确地反映水体毒性效应水平。急性毒性反映了水中多种污染物在短时间内对水生生物产生的联合毒性效应，是评估水体污染程度和生态风险的重要指标。通过建立污染水体作用剂量与毒性效应关系，可以将损害程度量化，直观地反映污染水体对生物种群的影响，提供环境污染预警，更好地指导环境污染防治。因此，急性毒性检测已经逐步成为评价水质污染的重要手段之一^[2]。急性毒性能够通过指示生物在污染物的胁迫下生理或行为的变化（如发光强度、光合作用、运动学行为或死亡）等作为毒性终点进行水体污染预警，有力保障供水安全，目前常用的指示生物主要有发光细菌、藻类、鱼类等^[3]。

2.1.2 急性毒性的来源

水体的急性毒性是由多种污染物共同作用引发的快速生物毒性效应，其来源复杂且具有显著的空间异质性。污染物的输入途径与人类活动密切相关，主要包括工业污染、农业污染、生活污染和其他复合污染。工业污染废水成分复杂，包含多种化学品，其成分取决于工业类型、工业过程和生产所使用的原材料等^[4]。如电镀废水含铜（Cu）、铬（Cr）、锌（Zn）、镍（Ni）等重金属离子，难以自然分解，且具有高毒性^[5]，矿山开采过程尾矿渗滤液中含铅（Pb）、砷（As）、锑（Sb）等重金属^[6]，印染废水中还会含有多种有机污染物如苯胺、苯酚、甲苯等^[7]。农业污染废水一部分来源于农药残留，包括有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类和氨基甲酸酯类农药^[8]，另一部分来源于养殖废水，例如水产养殖中，重金属和抗生素污染日益严重^[9]。生活污染废水主要来源于居民日常生活、商业活动和公共设施等，其成分和特性复杂多变，包括有机物和重金属以及微塑料等有毒物质^[10]。此外，污染物之间还存在协同作用导致复合污染，例如微塑料可成为重金属、杀虫剂、持久性有机污染物等有害污染物的载体，产生联合生物毒性^[11]。

2.1.3 急性毒性的环境危害

水中急性毒性由多种有毒物质协同作用引发,其环境危害具有复合性、突发性和连锁性,主要表现为对水生生物的危害、对生态系统的危害、对土壤的危害等。首先,高浓度的污染物会影响水生生物的生长发育,甚至造成生物死亡,比如纺织印染废水能造成斑马鱼肝细胞DNA(脱氧核糖核酸)损伤,诱导微核产生,对生物体产生基因和致突变毒性;此外,还能引起斑马鱼肝脏脂质过氧化,造成氧化损伤^[12]。急性毒性会通过水体或食物链对人造成危害,比如有害金属的摄入和必需金属元素的过量摄入均可能引起人体某些功能和结构发生异常,造成病理性变化。其次,急性毒性导致水生生物死亡或数量减少,这会破坏食物链的平衡,还会影响水生生态系统的物质循环、能量流动。例如,微生物的活动可能受到抑制,影响水体中有机物的分解和营养物质的循环,导致水质恶化,进一步影响整个生态系统的健康。最后,受污染的水体如果用于灌溉或通过地表径流进入土壤,其中的有毒污染物会在土壤中积累,导致土壤污染。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

水质急性毒性指标的管控是实施排水管理的主要内容之一,一些国家和区域组织采用急性毒性指标评价排水和受纳水体的综合毒性。美国、新西兰、韩国采用WET(whole effluent toxicity,排水综合毒性)^[13],英国、澳大利亚采用DTA(direct toxicity assessment,直接毒性评价)^[14],加拿大采用EEM(environmental effects monitoring,环境效应监测)^[15]进行排水急性毒性管控;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)则提出了WEA(whole effluent assessment,排水综合评价)^[16]。德国、加拿大、OSPAR及COHIBA均在其排水毒性测试标准体系中包含了发光细菌毒性测试方法^[17]。我国2008年发布的一批污染物排放标准中对急性毒性提出了限值标准,如《发酵类制药工业水污染物排放标准》(GB 21903-2008)、《化学合成类制药工业水污染物排放标准》(GB 21904-2008)、《提取类制药工业水污染物排放标准》(GB 21905-2008)、《中药类制药工业水污染物排放标准》(GB 21906-2008)、《生物工程类制药工业水污染物排放标准》(GB 21907-2008)和《混装制剂类制药工业水污染物排放标准》(GB 21908-2008)对急性毒性的限值为0.07 mg/L HgCl₂毒性当量。水利行业标准《水质水生态监测规范》(2024年征求意见稿)中提出在重要水源地自动监测站监测指标应增加重金属、生物毒性等。近代工业的发展促使化学物质的使用日益增多,进而导致水生生态系统受到了越来越严重的污染,尤其突发性环境污染事故时有发生,如化工污染事故、人为投毒、自然灾害等均会引起的水质突变,尤其是石油化工原料、产成品及有毒有害危险品的生产、储存和运输过程中发生的事故对环境水体造成的污染等频发。截止目前,传统的水质安全评价主要是通过测试水体的一些物理化学指标,并与水质标准进行比对。首先,单一指标的制定主要考虑污染物对人类健康的影响,对生态系统的影响考虑较少。其次,目前很多污染物的毒性数据并不充分,而且水体中往往存在大量未知污染物,很难制定合理的水质标准。第三,由于水体中污染物种类繁多,多种污染物共存时往往产生拮抗、协同等复合毒性作用,而单一指标不能反映多种污染物之间的联合作用。第四,伴随着有毒物质种类的增加,水质标准中的新指标不断增补,但往往是滞后的。第五,随着水质指标数量的不

断增加，且污染物浓度较低，增加了分析检测费用。而生物检测可以弥补理化检测方法的不足，综合多种受试物质的相互作用，判定受试物质的质量浓度和生物效应之间的直接关系，从而为水质的监测和综合评价提供科学的依据。

在环境污染日益变化的情况下，传统方法最大的局限在于污染物的化学分析浓度与其生物效应不完全相关，无法全面真实地评价环境质量。在此背景下，国内外政府部门及行业专家均认识到急性毒性检测的重要性，水体污染控制与治理科技重大专项也设立相关课题开展研究应用，我国许多国控断面和一些重要城市已经逐步大规模安装在线的毒性检测仪器进行水质监测，生态环境部把“水中综合毒性现场监测技术和设备”列入“十二五”环境保护领域国家重大科学仪器设备计划。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）^[18]，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”和“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。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》^[19]，将发光细菌急性毒性作为地表水和地下水饮用水水源地疫情防控特征指标开展监测，以保障疫情期间城市供水安全。此外随着我国自动监测体系的逐渐完善，也可在线开展实时监测，但是当发生污染事故时，水站将存在无法移动等问题难以满足应急监测需求。《国家环境保护“十二五”科技发展规划》中提出“研究环境应急监测的技术和方法”，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）^[20]，明确应急监测能力中包括“快速检测水质的生物急性毒性”。水利行业标准《水质水生态监测规范》（2024年征求意见稿）中提出应急监测宜采用现场快速监测方法，中国环境监测总站也提出要系统提升基层应急监测能力，持续加强环境应急监测支撑保障体系建设。中共中央关于制定国民经济和社会发展第十五个五年规划的建议提出完善生态环境标准，生态环境监测发展趋势包括以国家网的实际需求推进快速预警、快速标准检测等。多次突发事件应急的监测已广泛使用便携式水质毒性分析仪和发光细菌测定水质急性毒性，但由于没有标准方法的支撑，在结果有效性和公信力方面存在质疑。

为更好的满足现场快速初筛和风险判别、污染溯源排查监测、污染态势初步判别和突发环境事件应急监测的需求，建立急性毒性现场快速检测标准方法，对支撑现场快速监测能力建设，应对突发环境事件、保证饮用水安全、保障人民身体健康具有重大意义。

2.3 标准制定的基础

2.3.1 发光细菌现状

急性毒性测试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）^[15, 17]。发光细菌法便是以微生物作为受试生物的代表，发光细菌是一类在正常的生理条件下能够发射可见荧光的细菌，这种可见荧光波长在450-490 nm之间，在黑暗处肉眼可见。外来受试物主要通过下面两个途径抑制细菌发光：①直接抑制参与发光反应的酶类活性；②抑制细胞内与发光反应有关的代谢过程。凡能够干扰或破坏发光细菌呼吸、生长、新陈代谢等生理过程的任何有毒物质

都可以根据发光强度的变化来测定。全世界已命名的发光细菌有以下几种：①属于异短杆菌属（*Xenorhabdus*）的有发光异短杆菌（*Xenorhabdus luminescens*）；②属于发光杆菌属（*Photobacterium*）的有明亮发光杆菌（*Photobacterium phosphoreum*）和鳃发光杆菌（*P. leiognathi*）；③属于希瓦氏菌属（*Shewanella*）的有羽田希瓦氏菌（*Shewanella hanedai*），以前也曾经归类为交替单胞菌属（*Alteromonas*）的海氏交替单胞菌（*Alteromonas hanedia*）；④属于弧菌属（*Vibrio*）的有哈维氏弧菌（*Vibrio harveyi*）、美丽弧菌生物型 I（*V. splendidus biotype I*）、费氏弧菌（*V. fischeri*）、火神弧菌（*V. logei*）和东方弧菌（*V. orientalis*）。霍乱弧菌（*V. cholerae*）和地中海弧菌（*V. mediterranei*）中的某些菌株有发光现象，曾有报道易北河弧菌（*V. albensis*）有发光现象，后将其重新分类归入霍乱弧菌（*V. cholerae*）；中国学者分离到一株淡水发光细菌命名为青海弧菌（*V. qinhaiensis*）。费氏弧菌（*Vibrio fischeri*）原属弧菌属（*Vibrio*），2007 年经 16S rRNA 序列分析后独立为 *Aliivibrio* 属。费氏另类弧菌（*Aliivibrio fischeri*）作为模式菌株，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*。国外急性毒性检测常用的发光细菌为费氏弧菌，国内常用的有明亮发光杆菌、费氏弧菌和青海弧菌。国内均保存有菌株或冻干粉，中国普通微生物菌种保藏管中心保藏有明亮发光杆菌（保藏编号：CGMCC 1.3740）和费氏另类弧菌（保藏编号：CGMCC 1.3842），中国典型培养物保藏中心保藏有明亮发光杆菌（保藏编号：CCTCC DB 20082748）和费氏弧菌（保藏编号：CCTCC DB 20082971），北京生物保藏中心保藏有明亮发光杆菌（菌株编号：BJMCC T3）和费氏弧菌（原始编号：DH46）等。此外国内生物公司如北纳生物、麦科仪、克拉玛尔等以及仪器公司如力合科技、朗石科技和滨松科技等均有明亮发光杆菌、费氏弧菌和青海弧菌冻干粉生产和销售，可直接用于发光细菌法测试。目前国内学者或监测机构现场快速检测时采用的发光细菌也主要为明亮发光杆菌、费氏弧菌和青海弧菌，但因没有现场快速检测相关的方法标准规范，测试菌种没有统一的质控标准，其有效性和敏感性没有统一时，无法保证结果的准确性和可比性。

2.3.2 国内外急性毒性现场快速检测设备现状

2.3.2.1 国内外急性毒性现场快速检测设备整体情况

急性毒性水质自动检测设备目前较为成熟，已在国家地表水水质自动站批量使用，然而此类设备对现场供电及运行环境要求较高，且体积大、不便携带，更适宜用于固定站点的长期监测，难以满足现场应急检测需求。目前也有公司根据现场快速检测需求，对自动检测仪器进行小型化设计、仪器构造及性能优化。目前现场检测急性毒性主要是采用便携式水质毒性分析仪，国内外主要的急性毒性现场快速测定设备见表 3-1。检测用细菌均采用费氏弧菌或明亮发光杆菌，国外设备主要采用 ISO 11348 方法，国内设备同时具有 GB/T 15441 方法和 ISO 11348 方法，单管设备需手动计算发光抑制率，多管或双管设备可实现自动比对计算出样品发光抑制率。但因没有便携式毒性分析仪用于现场快速检测的方法标准规范，设备性能差异大，采用的检测模式、发光细菌、反应温度、样品的 pH 及盐度、反应时间等条件差异较大，缺乏数据之间的可比性。

表 3-1 国内外便携式水质毒性分析仪调查

厂家 型号	力合 LFTOX-B2 010 (中国)	滨松 BHP9514 (中国)	中科 PBEWs-LB 001 (中国)	朗石 LumiFox 3000 (中国)	聚创 JC-Tox60 00 (中国)	绿洁 GR-9500A (中国)	HACH TX1315 (美国)	Microlan Toxmini (荷兰)	Modern water Deltatox II (英国)	Checklight ToxScreen- III (以色列)
检测 细菌	费氏弧菌 明亮发光 杆菌	费氏弧菌 明亮发光 杆菌	费氏弧菌 明亮发光杆 菌	费氏弧菌 明亮发光杆 菌	费氏弧菌 明亮发光 杆菌	费氏弧菌	费氏弧菌 明亮发光 杆菌	费氏弧菌	费氏弧菌	费氏弧菌
测试 管数 量	12 管	18 管	12 管	单管	双管	单管	单管	双管	单管	单管
测试 模式	ISO 方法 国标方法	ISO 方法 国标方法	ISO 方法 国标方法	ISO 方法 国标方法	ISO 方法 国标方法	ISO 方法 国标方法	ISO 方法 国标方法	ISO 方法	ISO 方法	ISO 方法 国标方法
读值 模式	自动	自动	自动	手动	手动	手动	手动	手动	手动	手动
电池 模式	锂电池+插 电	干电池+ 插电	锂电池+插 电	干电池+插 电	锂电池	锂电池+插 电	锂电池	干电池+ 插电	锂电池+ 插电	镍铬电池+ 插电

2.3.2.2 急性毒性现场快速检测设备结构

急性毒性现场快速检测设备主要对发光细菌在新陈代谢时发光强度受受试物质的抑制情况进行检测，主要由光电检测模块、控制模块和控温模块组成。

光电检测模块：对发光细菌进行发光强度检测的装置，目前国内外便携式水质毒性分析仪最终检测的主要是光子计数，单位为 C/s，用来表示发光强度。

控制模块：控制仪器检测模块工作，并控制终端的数据采集以及测试等命令。

控温模块：控制样品测试管的温度保持恒定。国家海洋局生态环境保护司 2015 年 10 月发布的《污水生物毒性急性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试-费歇尔弧菌法》（试行）中规定生物发光光度计要带有控温反应模块（ $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）^[21]，目前市场上的台式或在线毒性分析仪上比较常见，比如英国现代水务公司（Modern Water）的实验室型毒性分析仪 Microtox Model 500 和力合科技（湖南）股份有限公司的 LFTOX-Z2010 水质综合毒性分析仪配有可调节的控温模块。便携式水质毒性分析仪配备控温模块的较少，意大利 SmarTox 便携式生物毒性检测仪配有 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷藏试剂仓和 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温控反应仓，以色列切克莱特公司（CheckLight）的 ToxScreen III 可选配电子制冷的恒温制冷反应器，控制温度为 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2.3 急性毒性检测设备校准规范

2025 年 2 月 8 日国家市场监督管理总局发布了《水质毒性分析仪校准规范》（JJF 2203—2025）并于 2025 年 8 月 8 日开始实施^[22]，对毒性分析仪的性能检验进行了规范。详细规定了用于检测水体中有害物质浓度或生物毒性的设备在使用前、使用中以及定期维护时所需遵循的校准程序和方法，以确保测量结果的准确性和可靠性。改变了过去检测仪器没有统一校准方法，仪器的性能对结果造成误差较大影响的情况，为急性毒性检测标准方法的制定提供了仪器设备支撑，也是制定现场快速测定标准方法的基础。该标准从背景噪声值、发光强

度测量重复性、线性相关系数、EC₅₀（半数效应浓度）时发光抑制率的相对线性误差、孔温度示值误差、孔温度稳定性和培养孔孔间温度差 7 个方面对水质毒性分析仪的计量特性进行了规范。用于现场快速检测的便携式水质毒性分析仪要求体积小、携带方便，现场检测特别是应急检测时要求快速检测毒性结果，因此在现场不易做工作曲线和 EC₅₀，因此背景噪声值和发光强度测量重复性是便携式水质毒性分析仪重点要校准和关注的指标，当设备配有恒温模块时，还需对孔温度示值误差、孔温度稳定性和培养孔孔间温度进行校准。

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标准分析方法研究

自 1672 年 R. Boyle 观察到发光的菌体所发出的光易被化学物质抑制后，许多科学家相继对细菌的发光效应进行了大量的研究。20 世纪 80 年代初，Bulich^[23-24]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 Microtox Test（发光细菌测试）。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 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^[25]。美国材料与试验协会（American Society for Testing and Materials, ASTM）于 1996 年颁布了《Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium (D5660)》（使用发光海洋细菌毒性试验评估微生物修复化学污染水和土壤的标准试验方法）^[26]，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，2014 年由于使用较少撤销。美国公共卫生协会（American Public Health Association, APHA）于 1999 年将发光细菌测试方法（Bacterial Bioluminescence Test, BBT）编入《Standard methods for the examination of water and wastewater, 20nd》（水和废水标准检验方法），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^[27]对该方法进行了补充完善。国际标准化组织（ISO）在 1998 年发布了第一版有关用 *Vibrio fischeri* 菌（最新的拉丁名为 *Aliivibrio fischeri*）进行发光细菌抑制效果实验的标准，即 ISO 11348-1998，分别采用新鲜制备细菌法、液体干燥细菌法和冻干细菌法，其中 ISO 11348-3-1998 冻干细菌法因稳定易操作应用最广。随后，欧盟、英国、德国、法国标准学会组织相继颁布标准，等同采用 ISO 11348-3-1998 的版本。随着研究的深入，ISO 又在 2007 年发布了第二版代替第一版，即《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》（水质 水样对费氏弧菌发光抑制作用的测定（发光细菌试验）第 3 部分：冻干细菌法）（ISO 11348-3-2007）^[28]，2008-2009 年，欧盟、英国、德国、法国也相继对原有标准进行了修订，2018 年 ISO 又对标准进行了修正，见表 3-2。

3.2 国内相关分析方法研究

国内检测水质急性毒性的方法有国家标准 GB/T 15441—1995《水质 急性毒性的测定

发光细菌法》^[29]、GB/T 13266—1991《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》、GB/T 13267—1991《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》、GB/T 21814—2008《工业废水的试验方法 鱼类急性毒性试验》、海洋生态环境保护规程《污水生物毒性急性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试-费歇尔弧菌法》（试行）（2015年）^[21]、SN/T 5103—2019《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》^[30]、HJ 1069—2019《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》^[31]和《水和废水监测分析方法》（第四版）（2002年）中的发光细菌的急性毒性试验-明亮发光杆菌 T₃法和青海弧菌 Q67法^[32]。近些年陆续出台了一批地方标准，如2017年台湾颁布了《水样急性毒性检测方法 细菌冷光法》（NIEA B301.10C）^[33]；2020年黑龙江省和山东省分别发布了DB 23/T 2750—2020《水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法》^[34]和DB 37/T 4298—2020《绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法》^[35]。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/SSES6—2023）^[36]；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）^[37]，见表3-2。

表 3-2 国内外发光细菌法急性毒性相关标准分析方法

序号	标准号	标准名称	介质	发光细菌	反应温度	反应时间
1	GB/T 15441—1995	水质 急性毒性的测定 发光细菌法	工业废水、纳污水体及实验室条件下可水溶性化学物质	明亮发光杆菌 T ₃ 小种	室温 20~25 °C，同一批样品在测试过程中要求温度波动不超过±1 °C	15 min
2	ISO 11348-3-2007	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	废水、水提取物或滤出物、地表水或者地下水、盐水和咸水、沉淀物物质提取液、孔隙水、稀释在水中的物质	费氏弧菌	15 °C ± 1 °C	15 min 或 30 min
3	APHA: method 8050	Standard methods for the examination of water and wastewater, method 8050: Bacterial Bioluminescence Test	废水、地下水、沉积物、危险废物等	费氏弧菌(前身为发光杆菌)	室温或 15°C	5、15、30 min
4	ASTM: D5660	Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium	受污染土壤和沉积物产生的废水及水提取液	发光细菌磷菌株 NRRL B-11177	15°C	5、15、30 min
5	海洋生态环境保护规程（试行）	污水生物毒性急性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试-费歇尔弧菌法	海水、入海排污口污水、沉积物间隙水、淡水及实验室条件下化合物溶液等各类水体（盐度小于 40）	费歇尔弧菌	15 °C ± 1 °C	15 min

续表

序号	标准号	标准名称	介质	发光细菌	反应温度	反应时间
6	SN/T 5103—2019	国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法	国境口岸区域内自来水源（包括地表水和地下水），口岸以外当地集中供水部门供应的末梢水、二次供水以及商品化的包装矿泉水、纯净水等成品水	明亮发光杆菌 T ₃ 小种	15 ℃～25 ℃，同一批样本在测定时要求温度波动不超过±5 ℃	5 min
7	《水和废水监测分析方法》（第四版）（2002年）	发光细菌的急性毒性试验	工业废水、纳污水体及实验室条件下可水溶性化学物质	明亮发光杆菌 T ₃ 小种	室温 20～25 ℃，同一批样品在测试过程中要求温度波动不超过±1 ℃	15 min
			一般水体或污染物、一般化学品	青海弧菌 Q67	室温 18～30 ℃均可进行，便测试过程中要求温度波动在±1 ℃内	15 min
8	NIEA B301.10C	水样急毒性检测方法 细菌冷光法	地表水、地下水、放流水、废水、污水、孔隙水及沉淀物溶出液及以水稀释的单一化学物质	费氏弧菌	15 ℃±1 ℃	5、15、30 min
9	DB 23/T 2750—2020	水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法	工业废水、纳污水体及实验室条件下可水溶性化学物质	青海弧菌 Q67	室温 20～25 ℃，同一批样品在测试过程中要求温度波动不超过±1 ℃	15 min
10	DB 37/T 4298—2020	绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法	绿潮发生海域绿潮藻腐烂液	费氏弧菌	调节室内温度与采样地温度接近，温差控制在±2 ℃	5 min
11	T/SSESB 6—2023	水质 急性毒性 高通量发光细菌测试方法	地表水，地下水，饮用水、生活污水，工业废水及海水	费氏弧菌	14～16 ℃，在一次测试中温度偏差不超过±1 ℃	5、15、30 min
12	T/CSTM 01433—2025	水质 急性毒性现场快速监测 发光细菌法	地表水、地下水、工业废水和生活污水中发光细菌法急性毒性的现场快速监测及实验室内检测	明亮发光杆菌 T ₃ 小种、费氏弧菌	明亮发光杆菌 T ₃ 小种 20℃～25 ℃，费氏弧菌时 15℃±1℃同一批样品在测定过程中要求温度波动不超过±1℃。	15 min

国内标准方法介质各异，测试温度要求不同，反应时间以 15 min 为主，也有采用 5 min 和 30 min，受试发光细菌除明亮发光杆菌 T₃ 小种、费氏弧菌和青海弧菌。采用费氏弧菌测

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，青海弧菌测试方法修改自明亮发光杆菌的国标方法。以上标准、规程都详细描述了实验室内对水样中急性毒性的检测过程及原理，但都局限于实验室范围内，没有对急性毒性的现场快速检测进行规范。并且目前国标方法相对陈旧、适用性较差，应用越来越少。国标方法及正在修订的方法均以氯化汞当量浓度表示毒性，氯化汞为剧毒物质，实验室管控很严，现场应急检测时会对现场造成二次污染，并且检测过程繁琐耗时较长，不适用于现场快速检测。因此根据便携式仪器和冻干粉的特点制定适用于快速检测的方法用于现场及应急检测可避免以上标准的不足，是对急性毒性标准体系的有效补充和完善。

3.3 文献资料研究

发光细菌急性毒性测定法适用范围较广，可适用于地表水和地下水样品^[38]、复杂废水^[39]、城市污水和沉积物^[40-41]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^[42-43]。HE 等采用国标方法对温州黑臭水体的急性进行检测^[44]，YU 等采用国标方法对江苏 12 个工业污水处理厂的急性毒性检测^[45]，孙成华等利用发光细菌毒性测试技术对北京市水环境进行监测^[46]，发光细菌法在水质污染突发事件^[47-48]等快速应急监测等方面也得到广泛应用。力合科技（湖南）股份有限公司 2020 年利用发光细菌法对武汉市新冠肺炎疫情期间南湖水质进行监测^[49]，朱文杰等用淡水发光菌青海弧菌对四川地震灾区的水质急性毒性进行检测^[50]，嵇志远等采用快速毒性测定仪测定水源水和自来水的综合毒性^[51]，陈晓东等利用发光细菌法对炼油废渣的综合急性毒性进行检测^[52]，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^[53-55]。近 25 年来我国采用发光细菌法检测急性毒性的文献中 87%采用国标检测模式，13%采用 ISO 检测模式，采用费氏弧菌的占 40%，明亮发光杆菌占 27%，青海弧菌的占 20%，还有 13%采用其他菌种。因没有快速检测的标准方法，文献中采用的检测模式、发光细菌、反应温度、样品的 pH 及盐度、反应时间等条件差异较大，缺乏数据之间的可比性。

3.4 与本方法标准的关系

我国目前标准和规程为实验室手工分析和在线监测方法，由于存在分析过程需人工参与、分析仪器不便携带等问题导致不适用于现场快速检测。本方法依据《突发环境事件应急监测技术规范》（HJ 589—2021）^[56]的要求，基于已有标准《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441—1995）^[29]及正在修订的方法（项目编号：993）、《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）^[28]，通过优化实验条件，研究适用于现场快速测定的方法，对现有分析标准方法体系进行了有力的补充，有利于提升我国现场监测技术水平。本标准 and GB/T 15441—1995 以及 ISO 11348-3-2007 主要技术内容比较见表 3-3。

表 3-3 发光细菌法急性毒性标准方法和本标准的主要技术内容比较

技术内容		GB/T 15441—1995	ISO 11348:3-2007	本标准
适用范围		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、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	地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水
样品保存		6 h 内分析, 否则 2~5 °C 保存, 但不超过 24 h	尽快分析, 48 h 内 2 °C~5 °C 避光冷藏, ≤-18 °C 冷冻保存不超过 2 个月, 不加任何固定剂	及时分析, 如不能及时分析, 应在 2 °C~5 °C 下避光保存样品, 并于 24 h 内测定
干扰和消除	浊度	离心或过滤	静置 1 h 或离心 (5000 g, 10 min) 或过滤	使用 0.45 μm 醋酸纤维或聚四氟乙烯滤膜进行过滤
	pH	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, 主要含有机化合物调至 7.0	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	若需排除 pH 影响的急性毒性, 通过加入盐酸溶液或氢氧化钠溶液将样品的 pH 值调节到 6.0 至 9.0
	余氯	不调节	不调节	若需排除余氯的影响, 采集后向每个采样瓶中加入 8 mg 的硫代硫酸钠
受试发光细菌	菌种	明亮发光杆菌 T ₃ 小种	费氏弧菌	明亮发光杆菌 T ₃ 小种; 费氏弧菌
	细胞密度	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 (5ml 测试管) 或 2.0×10 ⁴ cells/ml (2ml 测试管)	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	菌种测试液的明亮发光杆菌 T ₃ 小种应不少于 10 ⁵ 个/mL, 费氏弧菌应不少于 10 ⁷ 个/mL; 复苏的菌种悬浮液光子量不小于 100000 C/s
	稳定性	4 h 的 CK 发光量应 ≥400mV	反应 15min 或 30min, 空白的相对发光变化系数 \bar{r}_{kt} 介于 0.6~1.8	菌种悬浮液在实验温度下 15 min 后的发光强度应是初始发光强度的 0.6~1.8 倍
	敏感性	氯化汞 15min EC ₅₀ =0.10 mg/L ± 0.02 mg/L	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	2 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌使用液发光抑制率应 ≥60%, 2 次平行测试的相对偏差应 ≤10%
测试条件	测试温度	20 °C~25 °C, 波动不超过 ±1 °C	15 °C ± 1 °C	明亮发光杆菌 T ₃ 小种 20 °C~25 °C, 费氏弧菌 14 °C~16 °C
	测试时间	15 min	5、15、30 min	15 min
结果计算		待测样品发光强度的降低量与初始发光强度 (经校正) 的比值	待测样品发光强度的降低量与对照样品中发光强度的比值	待测样品发光强度的降低量与对照样品中或初始发光强度 (经校正) 的比值
质量控制和保证		样品 3 次测定结果的相对偏差应不大于 15%	\bar{r}_{kt} 值平行测定的相对偏差 ≤3%; 用于计算待测试样最低无效应稀释倍数 (LID) 或效应浓度 (EC) 的相对发光抑制率的偏差 ≤3%; 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	菌种悬浮液光子量不小于 100000 C/s; 菌种悬浮液在实验温度下 15 min 后的发光强度应是初始发光强度的 0.6~1.8 倍; 仪器背景噪声 <300 C/s; 阴性对照发光抑制率应不超过 ±10%; 阳性对照发光抑制率应 ≥60%, 2 次平行测试的相对偏差应 ≤10%; 样品 2 次平行测定的发光抑制率或相对发光度的相对偏差应 ≤15%

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)为实验室内利用生物发光光度计进行氯化汞毒性当量和半数有效浓度(EC₅₀)的测定;生态环境部正在修订的方法(项目编号:993)也为实验室内方法,首先进行发光抑制率测试,当发光抑制率满足一定条件时再进行氯化汞当量浓度(0%<发光抑制率<100%)、半数有效浓度(EC₅₀)(发光抑制率≥20%)和最低无效应稀释倍数(LID)(发光抑制率>50%)等检测。主要用于支撑排污许可管理、精准执法,需严格抗干扰(如pH、余氯等),强调数据准确性,但使用剧毒化学品氯化汞、样品和氯化汞稀释步骤多,计算过程复杂,不适用于现场快速检测。

本标准利用便携式水质毒性分析仪现场测定发光细菌的发光抑制率来表征水质急性毒性,通过发光抑制率阈值实现快速风险分级。采用便携设备,通过简化流程,突出快速响应的特点,满足现场快速初筛的需求。本标准定位为定性半定量检测,用于污染态势初步判别,污染溯源排查监测、水质趋势调查监测和应急监测,也可弥补固定监测站点不可移动的缺陷。发光抑制率≤30%的样品为低风险;30%<发光抑制率≤60%的样品为中风险,需进行污染确认;发光抑制率>60%的样品为高风险,需进行污染确认并采取应对措施。发光抑制率>30%进行污染确认时,可与正在修订的标准(项目编号:993)方法可衔接,开展后续的氯化汞当量浓度、EC₅₀和LID等检测。现场方法侧重快速和便携性,与实验室方法满足不同管理需求和定位,形成“初筛-验证”闭环。

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

(1) 本标准的编制原则是既参考国内外最新的标准、方法和技术,又考虑国内现有监测机构的监测能力和实际情况,依据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》^[57]和《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)^[58]的要求,参照我国现有标准方法和研究成果而编制,确保方法标准的科学性,先进性,可行性和可操作性,满足环境应急监测工作的实际需要。

(2) 在充分进行资料调研和第一手实测数据的基础上,依靠系统的分析方法,通过科学的统计技术进行分析,使标准的制定更具有科学性。

(3) 方法准确可靠,满足环境应急等现场检测的要求,方法适用于市场上主流的便携式水质毒性分析仪。

(4) 方法具有普遍适用性,适合我国国情,可操作性强,易于推广使用。

4.2 标准制订的技术路线

目前监测水质急性毒性主要是实验室内测定,水样采集后返回实验室进行分析耗时长,难以满足紧急事件的现场检测要求。因此需要研究可以在现场快速测定、检测过程自动完成的急性毒性现场快速检测分析方法,可用于污染态势初步判别,污染溯源排查监测、水质趋势调查监测和应急监测等现场快速监测。

(1) 收集国内外急性毒性分析的相关方法标准及最新研究成果。

(2) 制定总体技术路线, 开展样品浊度、盐度、pH 及测试温度、温度波动和加菌量等条件实验, 并对背景噪声、阴性对照、阳性对照和水样测试进行了实验。并分别与《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995) 和《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) 进行方法比对。

(3) 根据《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168) 的要求, 进行实验室间的验证试验, 涵盖了我国不同地区的 7 家实验室及市场上主流的 3 家国产仪器及 2 家进口仪器, 验证标准在不同地区和不同仪器的适用性。并参考《海洋监测规范 第 4 部分: 海水分析》(GB 17378.4)、《地表水环境质量监测技术规范》(HJ 91.2)、《污水监测技术规范》(HJ 91.1)、《地下水环境监测技术规范》(HJ 164) 和《突发环境事件应急监测技术规范》(HJ 589) 编写方法文本。

本标准的内容主要包括样品采集与保存、样品前处理与干扰消除、分析步骤、结果计算与表示、有效性、敏感性与精密度、质量保证和质量控制等。本标准在编写时还考虑到国内分析工作的实际情况和国际上关于急性毒性分析技术的发展趋势, 在保证可操作性的基础上, 按照工作流程叙述, 力求条理清晰、文字简洁。标准制订的技术路线图, 见图 1。

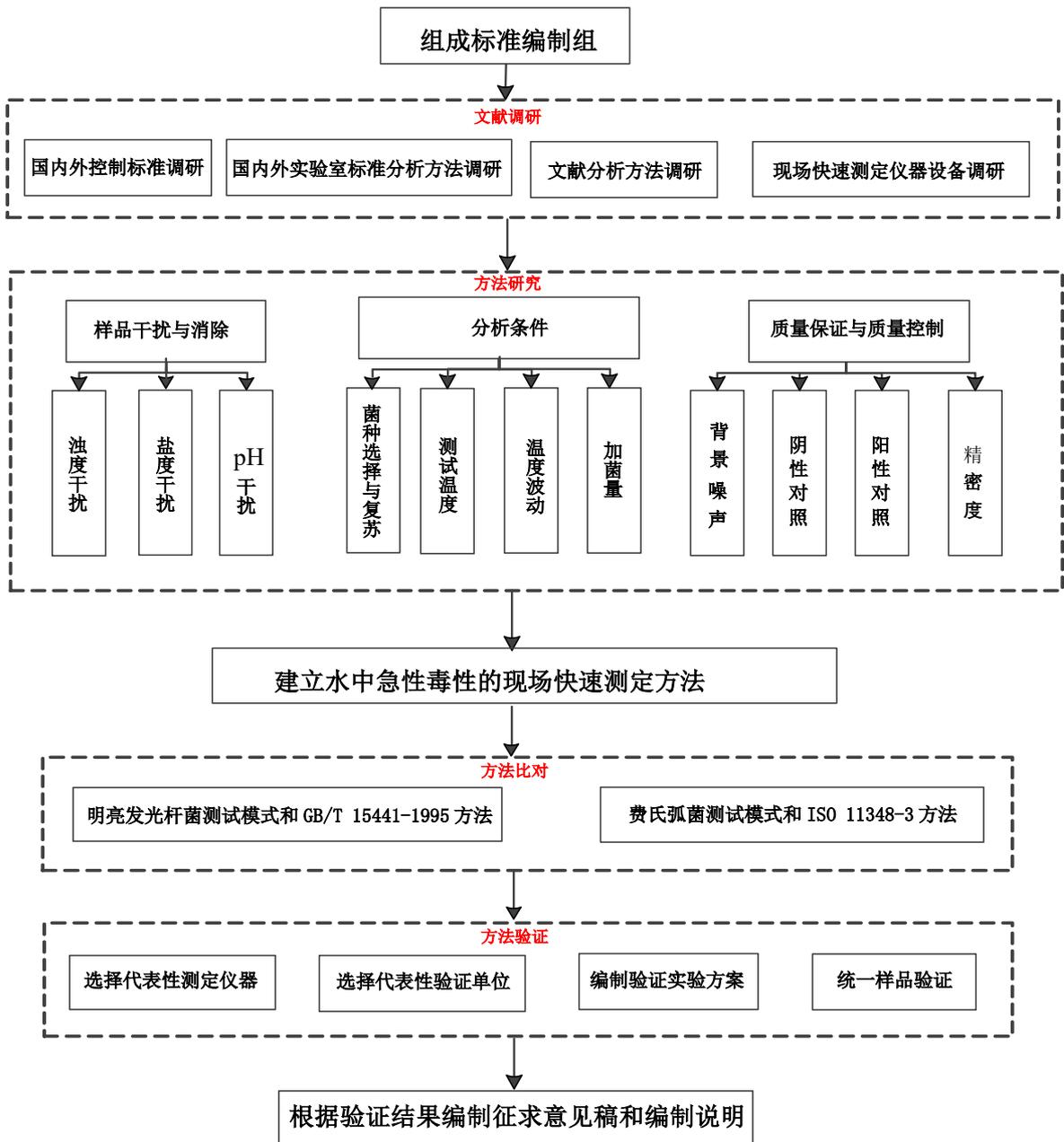


图 1 技术路线图

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

根据项目任务书要求，本标准规定了测定水质综合毒性的现场快速监测发光细菌法，适用于对地表水、地下水、工业废水和生活污水综合毒性的快速测定，同时适用于发光细菌法原理的水质综合毒性分析仪的性能检验。由于 2025 年 2 月 8 日国家市场监督管理总局发布了《水质毒性分析仪校准规范》（JJF 2203—2025）^[22]，对毒性分析仪的性能检验进行了规

范,因此将原适用范围中的发光细菌法原理的水质毒性分析仪的性能检验从本标准中予以去除。根据征求意见稿技术审查会的意见,增加了海水中急性毒性的检测,因此将本标准的适用范围修改为对地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水等水体急性毒性的现场快速测定。

(2) 本标准测定指标为发光细菌法急性毒性的依据和理由

水质测定方法可以划分为单个(类)具体物质检测方法和综合检测方法,其中单个(类)具体物质检测方法主要是针对单个(类)物质浓度开展定量的分析,而综合检测方法主要是针对水环境综合表征指标的分析,两者互为补充。水质发光细菌法急性毒性是对水体综合污染程度的表征指标,其方法检测操作简便,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。

目前国标方法《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)及正在修订的《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(项目编号:993)和国际标准方法《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)均为实验室内方法。本标准在实验室方法的基础上,对现场适用的分析仪器、测试菌种、测试条件、测试步骤、结果计算、质量控制与保证以及样品采集与保存、干扰与消除等关键技术环节进行优化及验证,使本方法更适用于现场快速测定的需求。

(3) 本标准拟达到的技术要求

根据《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)中的要求,生物毒性测试方法的特性指标参照定性方法确定,可根据具体方法增加其他指标。本标准非定量测试方法,因此正确度不适用,用精密度衡量方法的性能。《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)对精密度的要求是“样品3次重复测定结果的相对偏差应不大于15%”,鉴于本方法适用于现场快速测定,因此对精密度的要求是2次重复结果的相对偏差应不大于15%。由于样品的发光抑制率在低值时离散程度较大,高值时则离散程度较小,为避免对精密度计算的影响,将精密度要求修改为相对发光度或发光抑制率平行测定结果的相对偏差应 $\leq 15\%$ 。

对于生物检测方法,通常使用阴性对照和阳性对照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,本方法通过验证确定阴性对照样品发光抑制率应不超过 $\pm 10\%$,阳性对照样品发光抑制率应 $\geq 60\%$,2次平行测试的相对偏差应 $\leq 10\%$ 。

(4) 本标准与实验室方法相比的关键条件和优势

与实验室检测相比,现场检测最重要、最关键的条件是:检测系统的稳定性、便携性与抗干扰能力的综合保障,以实现在复杂环境下的快速、可靠、可重复的毒性响应。

a) 检测系统的稳定性:包括发光细菌活性维持:受现场环境(温度等)影响大,需确

保发光菌在储存、运输和使用过程中保持稳定的生理状态和发光强度，本标准可采用市售冻干粉和复苏液，分别冷冻或冷藏保存，冻干粉一步复苏及测试悬浮液的质控保证发光细菌活性。试剂稳定性：具有市售复苏液为预封装或即用型，便于携带。仪器稳定性：便携式仪器需具备稳定的光源控制、温度控制和高灵敏度的光信号检测能力，已出台的仪器校准规范和现场背景噪声质控保证仪器的稳定性。

b) 操作简便性与自动化：现场操作人员可能非专业技术人员，检测流程必须简单、快速、步骤少，因此现场方法测定发光抑制率的步骤和计算简单，便于现场操作。

c) 抗基质干扰能力：现场水样常含有悬浮物、强氧化/还原剂等，可能非特异性地抑制发光或干扰光信号检测，现场检测方法通过样品简单预处理模块（如过滤）来降低基质效应。

d) 快速响应时间：现场检测的核心优势是“快”，发光细菌现场检测时菌种冻干粉可提前在实验室复苏，到达现场后样品准备和检测可在 30 分钟内完成并得到样品急性毒性的结果，远快于传统生物测试以及带回实验室后再测；

e) 便携性与环境适应性：目前便携式整套设备（仪器、试剂、电源）轻便、坚固，适合野外携带，能在较宽的温度范围和湿度条件下正常工作，具备一定的防水、防尘能力。

本标准可在缺乏实验室环境支持时，确保检测系统（发光细菌+试剂+仪器）的整体稳定性与可靠性，从而快速获得可信赖的急性毒性数据结果，满足现场快速初筛和风险判别、污染溯源排查监测、污染态势初步判别和突发环境事件应急监测的需求。

5.2 术语和定义

(1) 急性毒性 acute toxicity

参考《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》（SN/T 5103-2019）^[30]中饮用水生物毒性定义，并修改为“急性毒性是水体中所有物质共存时，短期暴露发生的毒性效应，反映各种物质共暴露对水生生物的综合影响。本方法所涉及检测方法为发光细菌法，分为明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式和费氏弧菌测试模式。”

(2) 发光细菌 luminescent bacteria

参考《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》（SN/T 5103-2019）^[30]中发光细菌的定义，根据本方法的所使用的发光细菌修改为“在新陈代谢中，能产生发光物质的一类细菌，其发光强度与毒性物质浓度、毒性大小呈负相关性。本方法使用的菌种为明亮发光杆菌 T₃ 小种（*Photobacterium phosphoreum* sp. strain T₃）或费氏弧菌（*Aliivibrio fischeri*）。”

(3) 相对发光度 relative luminous intensity

参考《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441—1995）^[29]中相对发光度的计算和描述，以及《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》（SN/T 5103-2019）^[30]和《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）^[59]中相对发光度的定义，因本方法增加了和经校正的初始发光强度的比值，因此修改为“加入待测样

品中的受试发光细菌发光强度与对照样品中或初始（经校正）的发光细菌发光强度的比值，以百分比（%）表示。”

（4）发光抑制率 luminescence inhibition rate

参考《绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法》^[35]（DB 37/T 4298—2020）中光抑制率、《污水生物毒性急性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试-费歇尔弧菌法》（试行）（2015年）^[15]和《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）^[59]中抑制率的定义，修改为“在规定条件下，受试发光细菌与待测样品接触 15 min 后，其发光强度的降低量与对照样品中或初始发光强度（经校正）的比值，以百分比（%）表示。发光抑制率=100%—相对发光度。”

5.3 方法原理

发光细菌体内的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，将受试发光细菌与样品接触 15 min，根据样品与对照样品中或初始（经校正）的发光细菌发光强度比值，通过计算得到样品的发光抑制率，用发光抑制率表征样品的急性毒性。

5.4 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准分析纯试剂。实验用水为蒸馏水。

5.4.1 发光细菌。

a) 发光细菌（luminescent bacteria）是一类在正常的生理条件下能够发射可见荧光的细菌，这种可见荧光波长在 450~490 nm 之间。目前已发现的发光细菌有发光异短杆菌、明亮发光杆菌、费氏弧菌、青海弧菌、羽田希瓦氏菌等，均是非致病性的革兰氏阴性细菌，兼性厌氧或好氧，国内常用的发光细菌有明亮发光杆菌、费氏弧菌和青海弧菌。《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441—1995）中采用明亮发光杆菌、《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）中采用费氏弧菌、《水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法》（DB 23/T 2750—2020）中采用青海弧菌。青海弧菌是在青海湖的鱼体内提取的菌种，属淡水菌，适用于低温条件的测试，具有更宽的 pH 耐受范围，无需调节待测样品的渗透压，在测试饮用水时有较大优势，但其发光强度随温度升高先增强后减弱，不适合于现场温度条件影响大的测试。明亮发光杆菌和费氏弧菌属于海洋细菌，相同测试条件下发光强度比青海弧菌高，适用的温度范围宽。费氏弧菌菌液保存在 2~5 °C 条件下可完成不超过 7 d 的有效测试，对不同重金属、有机毒物具有较高的敏感度，氯化汞的 EC₅₀ 值为 0.03 mg/L^[60]，可满足限值标准中 0.07 mg/L 氯化汞当量浓度的有效性标准要求，因此现场快速监测方法选择费氏弧菌或明亮发光杆菌。

b) 明亮发光杆菌 T₃ 小种（*Photobacterium phosphoreum* sp. strain T₃）或费氏弧菌（*Aliivibrio fischeri*）冻干粉，-18 °C ~ -20 °C 避光冷冻保存，有效期半年。明亮发光杆菌 T₃ 小种购自中国普通微生物菌种保藏管中心（保藏编号：CGMCC 1.3740），费氏弧菌购自

中国典型培养物保藏中心（保藏编号：CCTCC DB 20082971），或购买商品化的菌种冻干粉。有馆藏号或市售商品均应提供菌种来源、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。

c) 冻干粉应真空密闭包装完好，呈白色粉末状，加入菌种复苏液（5.4.2）复苏后，应迅速溶解，呈乳白色，无明显悬浮颗粒物。

d) 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，按 5.7.3 步骤复苏后的菌种悬浮液采用稀释平板法测定细胞密度，明亮发光杆菌 T₃ 小种应不少于 10⁵ 个/mL，费氏弧菌应不少于 10⁷ 个/mL。生态环境部正在修订方法（项目编号：993）中冻干粉是 0.5g 稀释到 100mL 进行的计数，ISO 方法中用于细胞计数的菌种悬浮液不是直接加到样品中用于测试的，而是稀释 50 倍后再用于测试，本方法是 1 克冻干粉稀释到 20mL 用于测试及细胞计数，对于细胞计数的要求和和其它 2 个方法不同。

e) 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，开展菌种冻干粉的质量控制、阴性对照和阳性对照试验，结果应符合相关要求方可用于测试。

f) 水样检测当天，在现场首次使用前需使用发光强度直读模式对复苏的菌种悬浮液进行一次测试，若光子量不小于 100000 C/s 则视为质量合格。

g) 菌种悬浮液在实验温度下 15 min 后的发光强度应是初始发光强度的 0.6~1.8 倍。



图 2 明亮发光杆菌 T₃ 小种和费氏弧菌细胞计数结果

5.4.2 菌种复苏液。

称取 30 g 氯化钠固体溶解于 1 L 水中。置于 2 °C~5 °C 冰箱备用，保存期 1 个月。

5.4.3 氯化钠（NaCl）。

5.4.4 七水合硫酸锌（ZnSO₄·7H₂O）。

5.4.5 氢氧化钠（NaOH）。

5.4.6 硫代硫酸钠（Na₂S₂O₃）。

按每 100 mL 样品添加 8 mg 硫代硫酸钠比例提前准备带至现场。

5.4.7 盐酸： $\rho(\text{HCl}) = 1.19 \text{ g/mL}$ ， $w \in [36.0\%, 38.0\%]$ ，优级纯。

5.4.8 氯化钠溶液： $\rho(\text{NaCl}) = 0.30 \text{ g/mL}$ 。

称取 30 g 氯化钠（5.4.3）溶解于 100 mL 水中。赴现场前配好。

5.4.9 硫酸锌储备液： $\rho(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 1000 \text{ mg/L}$ ，以 Zn^{2+} 计。

称取密封保存良好的七水合硫酸锌（5.4.4）4.4154 g 放于烧杯中，用水溶解，转移至 1000 mL 容量瓶，用水润洗烧杯 2~3 次同样转入容量瓶，定容，置于 $2 \text{ }^\circ\text{C} \sim 5 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用，保存期 6 个月。

5.4.10 硫酸锌使用液： $\rho(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 2 \text{ mg/L}$ ，以 Zn^{2+} 计。

移取 2 mL 硫酸锌储备液（5.4.9）于 1000 mL 容量瓶，用水定容至刻度。测定海水样品时用人工海水（配置方法及理化特性见表 5-1）定容至刻度，赴现场前配好。

5.4.11 盐酸溶液： $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$ 。

移取 8.6 mL 浓盐酸（5.4.7），用水定容到 100 mL。赴现场前配好。

表 5-1 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	电导率 ($\mu\text{S/cm}$) ($20 \text{ }^\circ\text{C}$)	$47\,000 \pm 1\,000$
	盐度 ($20 \text{ }^\circ\text{C}$)	31 ± 1
	pH值	7.5 ± 0.2

5.4.12 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$ 。

称取 4 g 氢氧化钠（5.4.5）溶解于 100 mL 水中。赴现场前配好。

5.4.13 广泛 pH 试纸：比色卡读数范围包含 1~14。

5.5 仪器和设备

5.5.1 采样瓶：符合 HJ 494 要求的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，带聚四氟乙烯衬垫瓶盖^[61]，容积为 100 mL。

5.5.2 便携式水质毒性分析仪：可测光谱范围：420 nm~670 nm；反应时间：15 min；光子计数范围：0 C/s~500 万 C/s；按照 JJF 2203 方法测定的背景噪声值<300 C/s，发光强度测量重复性≤5%；带控温反应模块或配备恒温培养箱。

5.5.3 恒温培养箱：室温 20 °C~25 °C（明亮发光杆菌 T3 小种测试模式）或 14 °C~16 °C（费氏弧菌测试模式）。

5.5.4 盐度计：测量范围 0~80，最小分度为 0.1。

5.5.5 一般常用仪器和设备。

5.6 样品

（1）采样瓶使用带有聚四氟乙烯衬垫的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，务必清洁、干燥。采集水样时，样品沿瓶壁缓慢倒入采样瓶（5.5.1），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。

（2）急性毒性测定应在采样后 6 h 内进行，如不能及时分析，应在 2 °C~5 °C 下避光保存样品，并于 24 h 内测定，报告中应写明水样采集时间和测定时间。

（3）待测样品在试验开始前，放置于恒温培养箱中，避光平衡至 20 °C~25 °C（明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式）或 15 °C（费氏弧菌测试模式）后用于试验。便携式水质毒性分析仪带控温模块时，待仪器预热完成到达测试温度后将混匀后的检测管放置于检测孔位平衡 10 min。

（4）高色度样品或者混浊溶液由于光吸收或者光散射会导致的光损失，可能会导致测试结果偏高。高色度的样品按 GB/T 15441 校正色度后分析。

（5）浑浊溶液会导致测试结果偏高，含固体悬浮物的样品须使用 0.45 μm 醋酸纤维或聚四氟乙烯滤膜进行过滤，至浑浊度小于 100 NTU 以去除干扰，

（6）若需排除余氯的影响，对经加氯消毒处理的污水样品，参考 SN/T 5103-2019 标准中用硫代硫酸钠去除余氯干扰的方式，以及《污水监测技术规范》（HJ 91.1）中测定总大肠菌群等生物指标时 1 L 水中加入 80 mg 的五水硫代硫酸钠去除余氯的方法，采集时向每个采样瓶中加入 8 mg 的硫代硫酸钠并上下颠倒混匀，以去除残余氯。

（7）测定包括 pH 影响在内的急性毒性，不调节样品 pH。若需排除 pH 的影响，应首先测量样品的 pH 值，当 pH<6.0 或>9.0 时，通过少量多次加入不多于总体积 5% 的盐酸溶液（5.4.11）或氢氧化钠溶液（5.4.12）将样品的 pH 值调节到 6.0 至 9.0。

（8）样品测试过程中应调节氯化钠的加入量，高盐度应进行稀释，使待测样品中含相当于 3% 的氯化钠。样品中盐度参考 GB 17378.4 29.1 盐度计法^[62]进行测量。海水样品通常不需要调节盐度。

（9）采用实验用水或经验证发光抑制率不超过±5%的水作为空白样品。测定海水样品时采用人工海水作为空白样品。

5.7 分析步骤

5.7.1 测定条件

(1) 实验操作过程应在 5 °C~30 °C 环境温度、相对湿度≤90% RH 下进行。

(2) 发光细菌为明亮发光杆菌 T₃ 小种时，测试温度为 20 °C~25 °C，发光细菌为费氏弧菌时，测试温度为 14 °C~16 °C。

(3) 目前实验室标准方法中的反应时间主要有 15 min 和 30 min，本方法为现场快速方法，因此在保证结果准确可靠的基础上时间上要求快速测定，统一反应时间为 15 min 既保证快速又保证数据的可靠性。

5.7.2 仪器的预热

打开便携式水质毒性分析仪电源，静置等待仪器预热完成。

5.7.3 发光细菌准备

将发光细菌冻干粉(5.4.1)和菌种复苏液(5.4.2)放入 2 °C~5 °C 冷藏箱中平衡 10 min，打开装有发光细菌冻干粉的包装瓶，按每 1 g 冻干粉 20 mL 菌种复苏液的比例，快速将菌种复苏液倒入冻干粉瓶中，盖上瓶塞，颠倒 5 次摇晃均匀形成菌种悬浮液，应为乳白色均匀液体，静置后无絮凝沉淀。菌种悬浮液于 2 °C~5 °C 条件下复苏 30 min 后，备用，2 °C~5 °C 贮存条件下 6 h 以内使用有效。1 g 冻干粉复苏后的菌种悬浮液可用于 400 个（明亮发光杆菌 T₃ 小种）或 200 个（费氏弧菌）测试管的检测，可以满足现场检测工作的需要。

5.7.4 测试条件的确定

5.7.4.1 测试温度的影响

温度主要影响菌种酶的活性，温度不适宜时，菌种稳定发光时间短或者不会稳定发光，实验了 15 °C~35 °C 不同温度下实验用水中菌种发光强度稳定性（表 5-2）、2.0 mg/L 阳性对照样（5.4.10）发光抑制率变化趋势（表 5-3）来测试方法的适用温度。结果表明明亮发光杆菌 T₃ 小种菌种在 15 °C~30 °C 区间基本可以保证 15 min 内稳定发光，35 °C 时菌种发光强度降低明显，不适合菌种生存，菌种在 15 °C~30 °C 之间测试阳性对照样时，发光抑制率为 65.0%~82.8% 之间，且随温度增高发光抑制率逐渐增大，所以菌种可在 15 °C~30 °C 进行测试。实验了 15 °C~30 °C 不同温度下不同梯度阳性对照样发光抑制率变化趋势（表 5-4）来测试方法的适用温度。采用 F 值和对数方程的相关系数（R²）判断硫酸锌浓度对发光细菌影响的显著性，15 °C~30 °C 的 F 值分别为 721、288、610 和 204，R² 分别为 0.6783、0.9957、0.9652 和 0.9458，表明 20 °C 和 25 °C 时阳性对照样不同浓度和发光抑制率具有显著性相关。参考 GB/T 15441—1995 中明亮发光杆菌 T₃ 小种测试温度为 20 °C~25 °C 及文献中菌种的适宜温度，考虑现场测试环境温度情况，测试的最佳温度为 20 °C~25 °C。

表 5-5 为费氏弧菌菌种在 10 °C~35 °C 之间测试 2.0 mg/L 阳性对照样品结果，在 10 °C~25 °C 之间时发光抑制率为 37.7%~94.5%，且随温度增高发光抑制率逐渐增大，当温度为 30 °C 和 35 °C 时，阳性对照样品发光抑制率接近 100%，不能表达出更高毒性样品的

毒性升高变化。表 5-6 为不同浓度阳性对照样品采用费氏弧菌菌种时随温度变化的结果，10 °C~25 °C 的 F 值分别为 52、587、225 和 276，R² 分别为 0.8790、0.9674、0.9734 和 0.9855，表明 15 °C 时阳性对照样不同浓度和发光抑制率具有显著性相关。参考 ISO 11348:3—2007 中费氏弧菌测试温度为 15 °C ± 1 °C 及文献中菌种的适宜温度，因此考虑现场测试环境温度情况，最佳测试温度为 15 °C。

表 5-2 不同温度时菌种发光强度稳定性（明亮发光杆菌 T₃ 小种）

温度	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
5 min	2303623	4681394	4619425	4388613	5289343
10 min	2525520	5235621	5387148	4669348	611634
15 min	2844388	5663163	5897049	4596967	70064
15 min 发光强度变化	9.58%	4.36%	2.33%	7.63%	98.7%

表 5-3 不同温度时 2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）阳性对照发光抑制率稳定性（明亮发光杆菌 T₃ 小种）

发光强度/发光抑制率				
温度	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
5 min	3079004 6.8%	4460047 4.7%	4389561 5.0%	3996965 16.7%
10 min	1510014 54.3%	2105931 55.0%	1640786 64.5%	1285720 73.2%
15 min	1156536 65.0%	1393466 70.2%	1118182 75.8%	823536 82.8%

表 5-4 不同温度对不同浓度（以 Zn^{2+} 计）阳性对照的发光抑制率（明亮发光杆菌 T_3 小种）

发光强度/发光抑制率								
温度	15 °C		20 °C		25 °C		30 °C	
对照样品	352259	/	728941	/	795929	/	764664	/
	321325		720634		754796		886095	
0.05mg/L	243260	27.8%	509211	29.7%	778471	-0.1%	574407	30.4%
	241925	28.2%	507628	30%	729165	3.7%	567871	31.2%
0.25mg/L	209794	37.7%	324794	55.2%	504771	33.3%	411459	50.1%
	207809	38.3%	315095	56.5%	463585	38.8%	337936	59.1%
0.5mg/L	212159	37.0%	223314	69.2%	199899	73.6%	100373	87.8%
	211185	37.2%	190598	73.7%	204213	73%	94119	88.6%
0.75mg/L	205469	39.0%	139603	80.7%	92242	87.8%	39573	95.2%
	201263	40.2%	162501	77.6%	88416	88.3%	25394	96.9%
1mg/L	152893	54.6%	128221	82.3%	59657	92.1%	18304	97.8%
	150327	55.4%	121682	83.2%	72322	90.4%	21725	97.4%

表 5-5 不同温度时 2.0 mg/L（以 Zn^{2+} 计）阳性对照发光抑制率稳定性（费氏弧菌）

温度	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
初始发光 1	1,521,468	2,795,444	760,196	2,089,085	1,135,402	754,503
初始发光 2	1,529,758	2,785,908	769,352	2,049,713	1,352,031	634,752
平均值	1525613	2790676	764774	2069399	1243717	694628
15min 发光强度	950457	814877	140718	113817	7462	42
发光 抑制率	37.7%	70.8%	82.0%	94.5%	99.4%	100%

表 5-6 不同温度对不同浓度（以 Zn²⁺计）阳性对照的发光抑制率（费氏弧菌）

发光强度/发光抑制率								
温度	10 °C		15 °C		20 °C		25 °C	
对照样品	913184	/	2023878	/	1489710	/	764664	/
	1018875		1871831		1362160		886095	
0.05mg/L	865562	10.4%	1743330	10.5%	1130766	20.7%	1001113	35.5%
	848174	12.2%	1739434	10.9%	1193508	16.3%	1067853	31.2%
0.25mg/L	791178	18.1%	1277793	34.4%	819913	42.5%	620845	60%
	805669	16.6%	1310906	32.7%	764301	46.4%	582042	62.5%
0.5mg/L	740945	23.3%	810307	58.4%	477688	66.5%	242130	84.4%
	701337	27.4%	814203	58.2%	416373	70.8%	260755	83.2%
0.75mg/L	662696	31.4%	675906	65.3%	303724	78.7%	155211	90.1%
	621157	35.7%	714863	63.3%	250965	82.4%	86918	94.4%
1mg/L	585414	39.4%	555139	71.5%	238131	83.3%	77606	95%
	609565	36.9%	479172	75.4%	236605	83.7%	43459	97.2%

5.7.4.2 温度变化的影响

实验环境温度从 20 °C 上升至 25 °C 时，测试采用明亮发光杆菌 T₃ 小种时 2.0 mg/L 阳性对照样（表 5-7）的发光抑制率稳定性。结果表明，在温度波动 ±1 °C 时发光抑制率变化小于 10%，温度波动 5 °C 时阳性对照样的发光抑制率为 83.3%~94.5%，极差为 11.2%。因此现场快速应急监测中，测试温度变化在 20 °C~25 °C 范围作为可接受的温度波动范围。

实验环境温度 15 °C 波动 ±2 °C 时，测试采用费氏弧菌时 2.0 mg/L 阳性对照样的发光抑制率稳定性（表 5-8）。结果表明，15 °C ±1 °C 温度波动时阳性对照样的发光抑制率为 62.2%~73.3%，极差为 11.1%，温度波动 ±2 °C 时阳性对照样的发光抑制率极差为 21.5%。因此现场快速应急监测中，测试温度在 14 °C~16 °C 作为可接受的温度波动范围。

表 5-7 温度波动时阳性对照发光抑制率稳定性（明亮发光杆菌 T₃ 小种）

温度	20℃	21℃	22℃	23℃	24℃	25℃
初始发光 1	2213725	1658994	954200	841972	536531	538741
初始发光 2	2110454	1571476	998796	863569	567839	559273
平均值	2162090	1615235	976498	852771	552185	549007
15min 发光强度	361069	232594	133780	93805	41414	30195
15 min 发光抑制率	83.3%	85.6%	86.3%	89.0%	92.5%	94.5%

表 5-8 温度波动时阳性对照发光抑制率稳定性（费氏弧菌）

温度	13℃	14℃	15℃	16℃	17℃
初始发光 1	687,140	639,731	2,795,444	1,902,729	1,832,288
初始发光 2	660,738	674,018	2,785,908	2,120,796	1,703,377
平均值	673939	656875	2790676	2011763	1767833
15min 发光强度	305294	248299	814877	537141	420744
15 min 发光抑制率	54.7%	62.2%	70.8%	73.3%	76.2%

5.7.4.3 调节液盐度干扰

分别使用不同氯化钠浓度的复苏液对同一菌种悬浮液进行测试（表 5-9 和表 5-10），比较不同氯化钠浓度测得的发光强度，选择发光强度最大调节液盐度视为无干扰。发光强度随氯化钠浓度升高略微升高（1%~3%），但在 3.5%时发光强度又略微下降，根据 15 min 衰减率判断，盐度在 1%、1.5%和 3.5%（费氏弧菌）时衰减率较其他浓度更高，综合考虑选取氯化钠浓度 3%为最终盐度。

表 5-9 不同调节液盐度时发光强度结果（明亮发光杆菌 T₃ 小种）

盐度	1%	1.5%	2%	2.5%	3%	3.5%
5 min	5763525	7056045	8084123	8880216	9339212	8444852
10 min	4635329	5602740	6816445	7486143	7592636	6191673
15 min	3930992	4865105	6142564	6872708	7019403	6664802
15 min 衰减	31.8%	31.1%	24.0%	22.6%	24.8%	21.0%

表 5-10 不同调节液盐度时发光强度结果（费氏弧菌）

盐度	1%	1.5%	2%	2.5%	3%	3.5%
5 min	1694650	1874607	2278138	2304231	2350898	1652045
10 min	1691352	1820582	2219044	2218998	2269264	1615479
15 min	1754185	1764397	2106690	2148128	2214619	1623435
15 min 衰减	30.1%	19.7%	16.0%	14.4%	11.7%	35.3%

5.7.4.4 样品 pH 的影响

分别用盐酸和氢氧化钠将实验用水配制成 pH 值分别为 1~2, 3~5, 6~7, 8~9, 10~14 的五个梯度, 将同一菌种分别加入多个梯度样品中, 测试多个 pH 梯度实验用水中发光菌的发光强度和稳定性, 间隔 5 分钟测试一次, 总共测试 6 次 (结果见表 5-11 和 5-12)。在 pH 值为 6~9 时发光细菌稳定性较好且发光强度较大, 因此选择 6~9 为 pH 值适宜区间。

表 5-11 不同 pH 值时发光细菌发光强度及稳定性结果 (明亮发光杆菌 T₃ 小种)

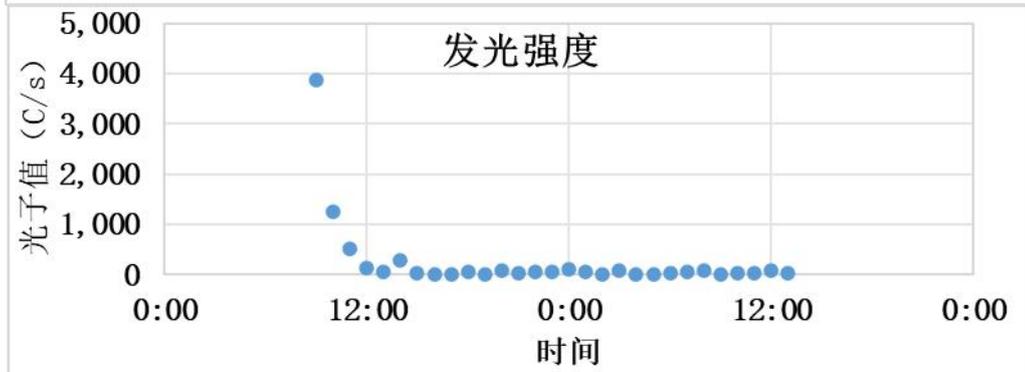
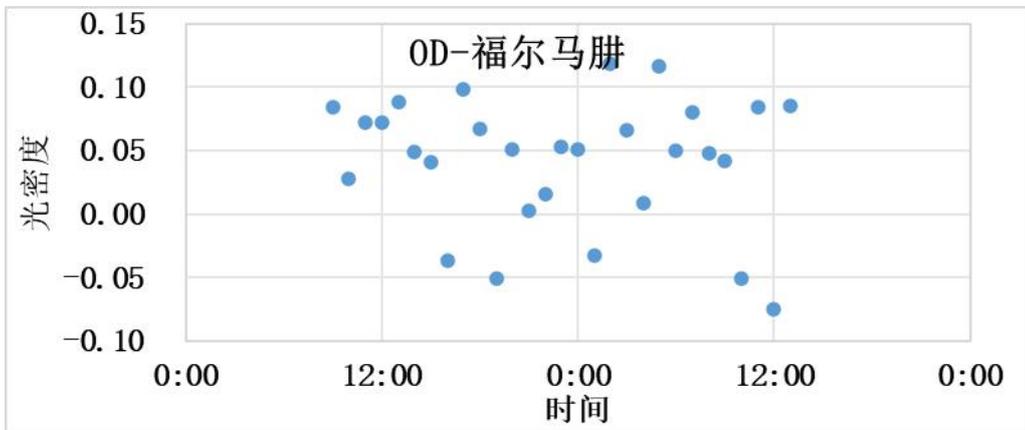
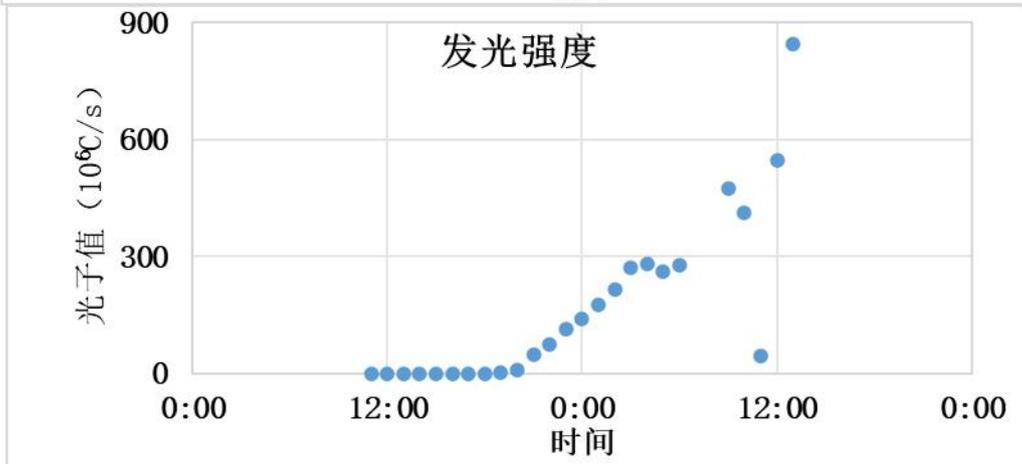
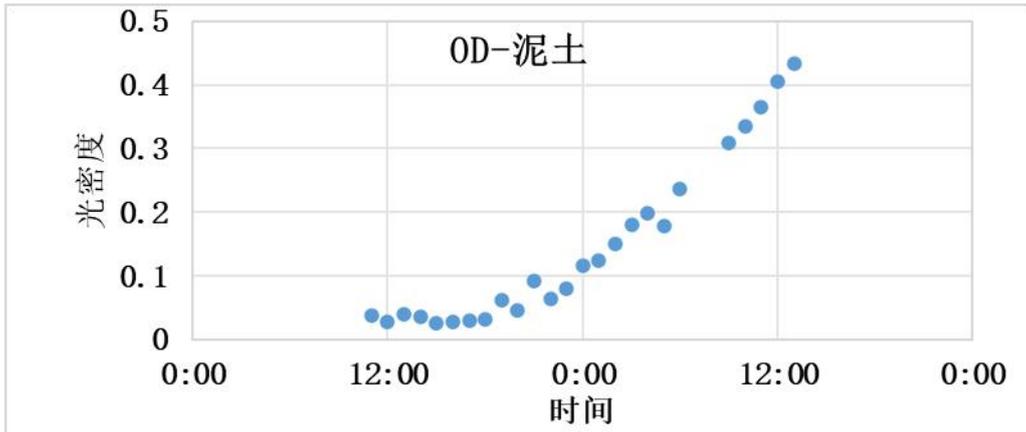
pH 值	1~2	3~5	6~7	8~9	10~14
5 min	16130	15175	4941212	5821846	11178
10 min	12713	10810	3735726	4748182	3899
15 min	11409	10806	3637617	4353679	2849

表 5-12 不同 pH 值时发光细菌发光强度及稳定性结果 (费氏弧菌)

pH 值	1~2	3~5	6~7	8~9	10~14
5 min	937	131259	3354843	3285453	2256
10 min	918	19673	3043150	2967589	2076
15 min	687	8166	2768419	2712046	1826

5.7.4.5 样品浊度的干扰

浊度高的样品由于光吸收或者光散射导致的光损失会影响测试结果。浊度物质可能会对仪器测试或发光细菌的生长造成影响, 因此先选择不同物质进行发光细菌的生长曲线实验。浊度标准福尔马胂对菌种有抑制作用, 加入后菌种无法生长繁殖; 加入普通黄泥或淀粉成分的培养基, 在生长曲线测试中 OD 和发光强度正常。由于浊度标准物质具有毒性, 选取不同质量的普通黄泥加到实验用水配制成浊度分别为 10.4 NTU, 124 NTU 和 267 NTU 的三个梯度, 将同一菌种分别加入多个梯度样品中, 测试实验用水中发光菌的相对发光度衰减, 拟合计算出衰减 10% 时的浊度 107.6 NTU (明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式) 和 142.5 NTU (费氏弧菌测试模式) 为无影响浊度值。最终选择浊度为 100 NTU 时作为无干扰浊度值。



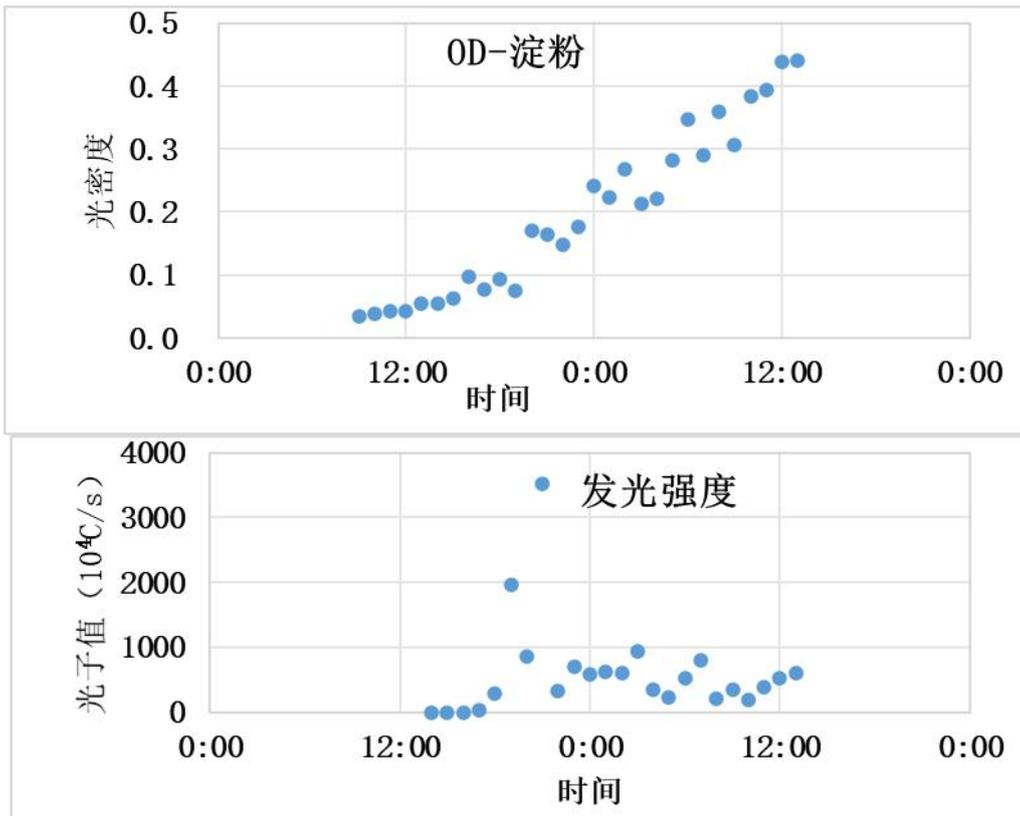


图3 不同浊度样品对发光菌生长影响结果

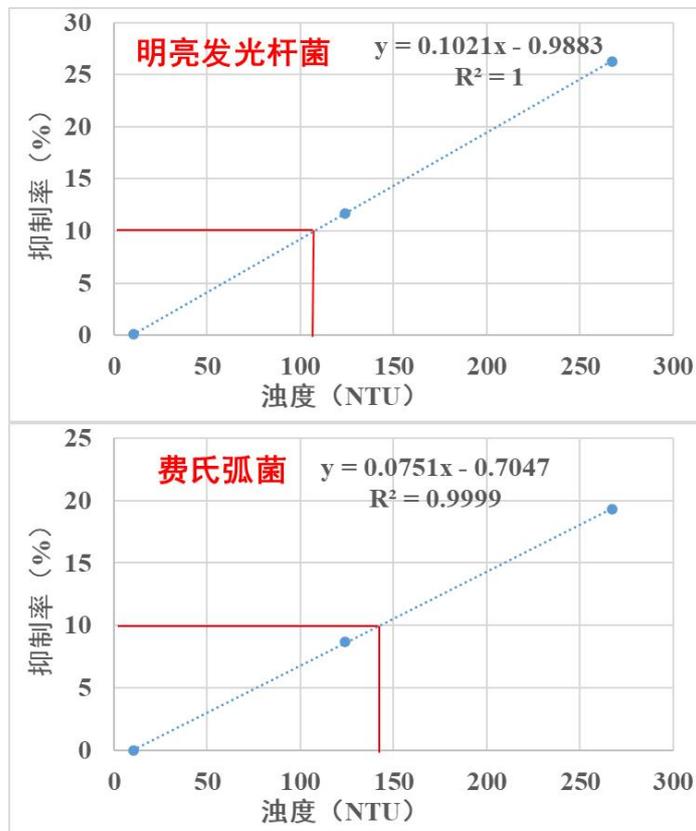


图4 不同浊度时发光细菌相对发光度衰减曲线

5.7.4.6 仪器检测光子量的线性关系

由于本方法中样品的发光抑制率为样品（阴性对照、阳性对照和实际水样）中发光细菌的发光强度与对照样品或初始（经校正）发光细菌的发光强度比值，仪器检测到的光子量与菌种复苏液中发光细菌的含量具有线性关系时，计算出的发光抑制率才具有可比性。选取不同体积的明亮发光杆菌 T₃ 小种加到实验用水中配制成 6 个梯度，测试实验用水中发光菌的光子量，拟合出不同菌液体积和光子量的对应关系。测试结果的相关系数（R²）为 0.9974，表明仪器检测到的光子量与菌种体积具有线性关系，检测计算出的发光抑制率具有可比性。对方法验证另外 4 个型号的仪器进行仪器检测到的光子量与菌种体积线性关系实验，结果也表明不同型号的仪器检测到的光子量与菌种体积均具有线性关系。

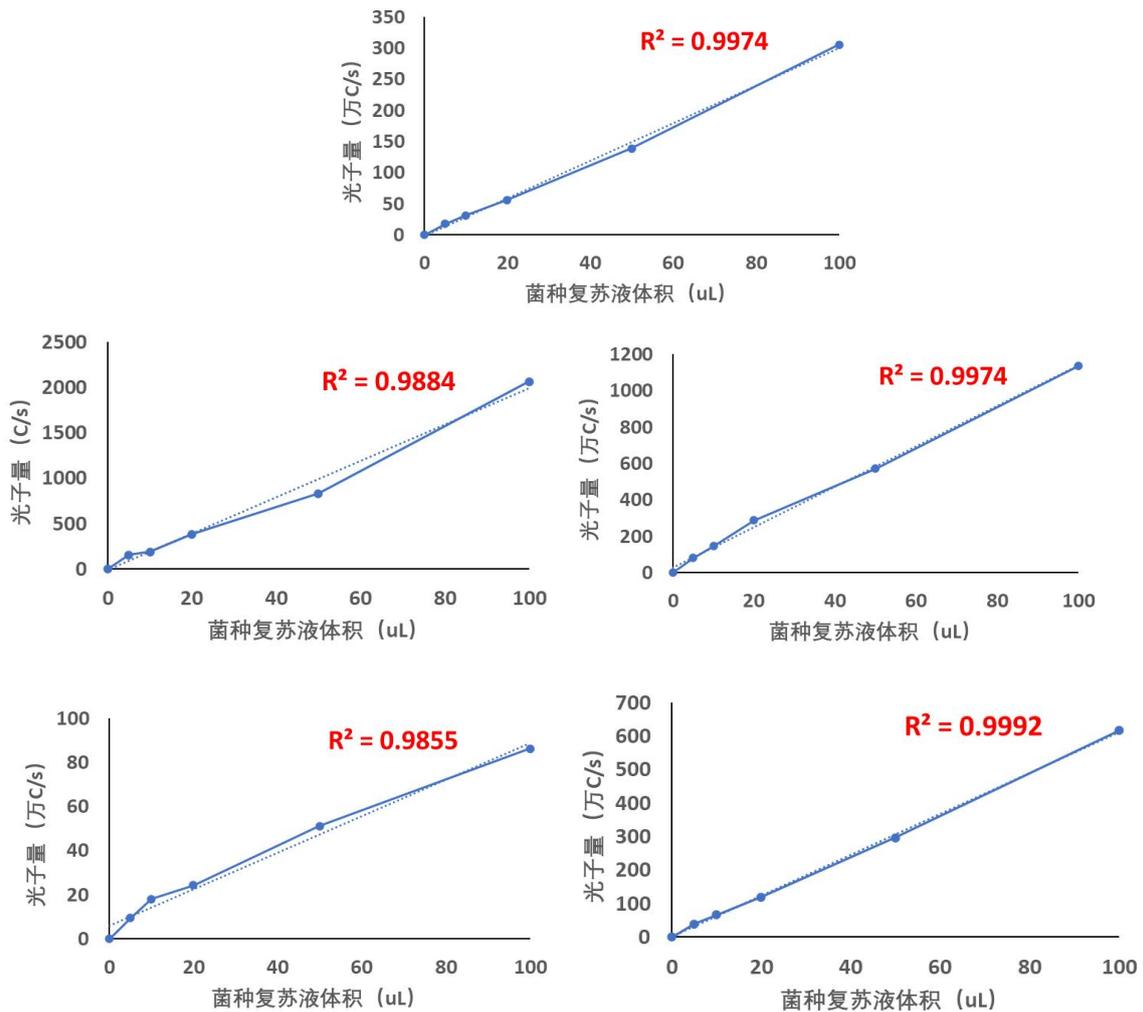


图 5 不同体积发光细菌和光子量线性关系（从上到下、从左到右仪器型号依次为 LFTOX-B2010、LumiFox、DeltaTox II、ToxScreen-III 和 BHP9514）

5.7.4.7 不同浓度阳性对照样的发光抑制率的相关性

为验证发光抑制率与样品中毒性物质浓度的相关性，用实验用水配制成 0 mg/L、0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.25 mg/L、0.50 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L 和 2.0 mg/L（以 Zn^{2+} 计）的硫酸锌溶液 8 个梯度，测试发光抑制率，拟合出不同浓度阳性对照和发光抑制率的对应关系。测试结果表明明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式和费氏弧菌测试模式中不同阳性对照浓度和发光抑制率均不是线性关系，因此样品的发光抑制率和稀释倍数不具有线性相关，报告结果时需写明稀释倍数和急性毒性。

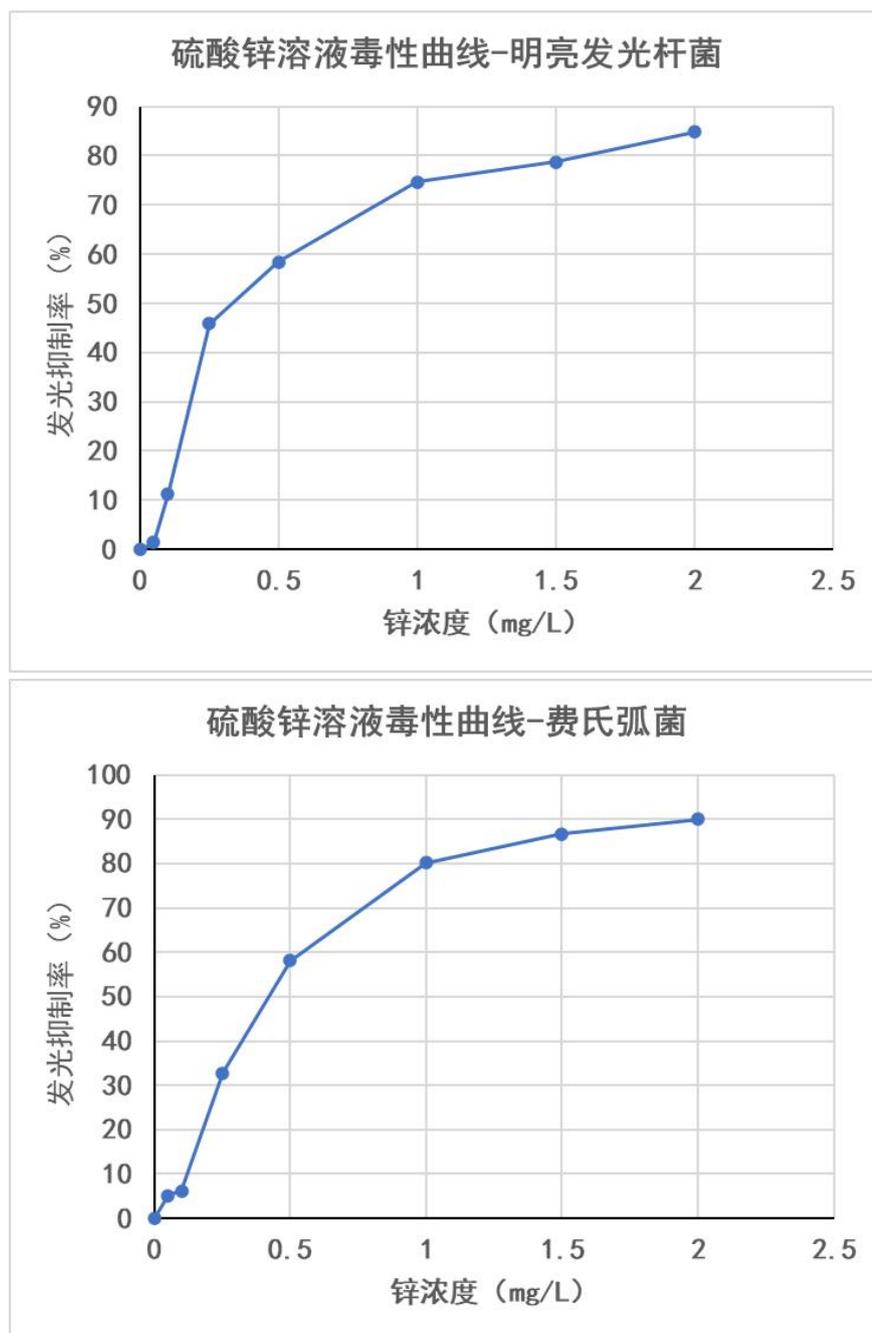


图 6 不同浓度阳性对照和发光抑制率的关系

5.7.4.8 不同浓度氯化汞的发光抑制率的相关性

为验证发光抑制率与样品中氯化汞浓度的相关性，用实验用水配制成 0 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L、0.06 mg/L、0.08 mg/L、0.10 mg/L、0.12 mg/L、0.14 mg/L 和 0.16 mg/L（以 HgCl₂ 计）的氯化汞溶液 9 个梯度，测试发光抑制率，拟合出不同浓度氯化汞和发光抑制率的对应关系。测试结果表明明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式和费氏弧菌测试模式中不同氯化汞浓度和发光抑制率为线性关系，根据线性方程计算出 0.07 mg/L 氯化汞对应的发光抑制率分别为 53.9%和 45.2%。

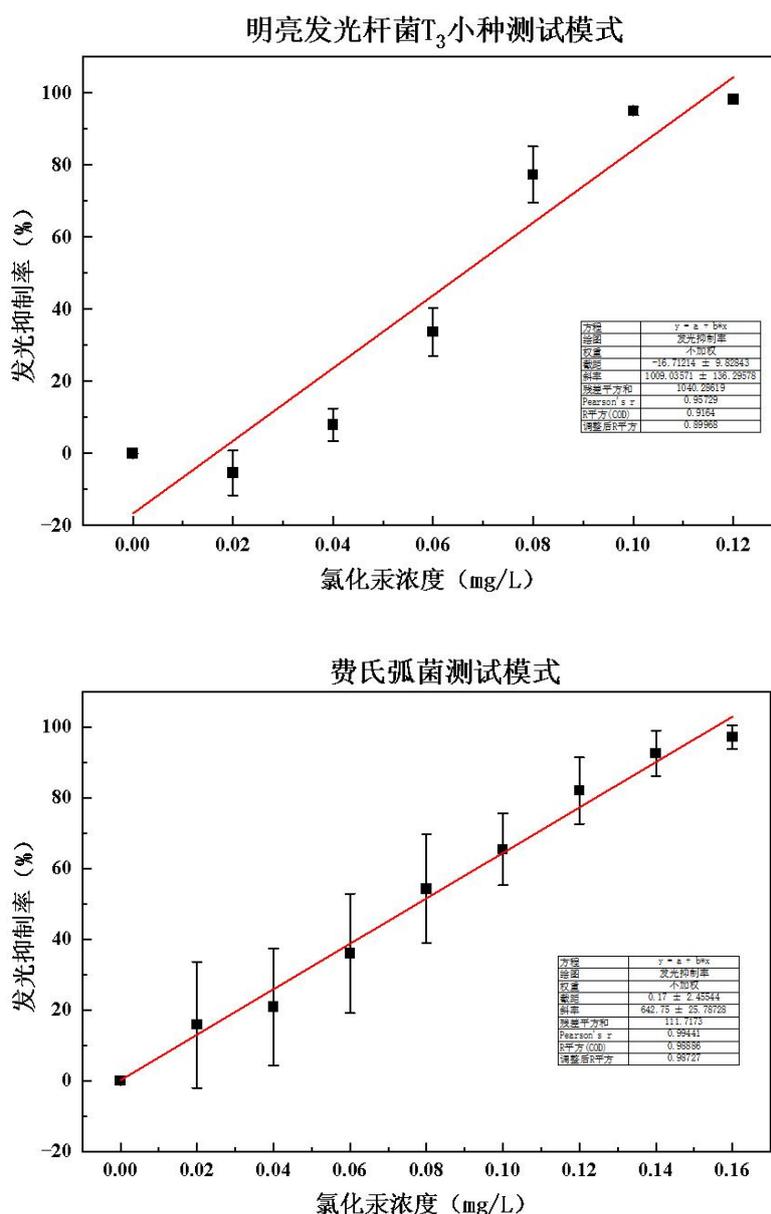


图 7 不同浓度氯化汞和发光抑制率的关系

5.7.5 明亮发光杆菌 T₃小种测试模式流程

设定便携式水质毒性分析仪，使其适用于明亮发光杆菌 T₃小种测试模式。

- a) 打开便携式水质毒性分析仪电源，静置，等待仪器预热完成。
- b) 按照空白样品、待测样品、阳性对照和阴性对照的顺序排列检测管，分别设置 2 个平行。
- c) 向 b) 中各检测管加入 200 μL 氯化钠溶液 (5.4.8)，再依次加入空白样品 (5.6 (10))、待测样品、阳性对照和阴性对照各 1800 μL，摇晃混匀后放置于检测孔位平衡 10 min。测试海水样品时在检测管中分别加入 2 mL 的人工海水或待测海水样品
- d) 取 50 μL 明亮发光杆菌 T₃小种悬浮液 (5.7.3) 依次加入到步骤 c) 的各检测管中，轻微摇晃后，迅速放置于仪器对应检测孔位或恒温培养箱中。
- d) 待反应 15 min 后，按照菌液加入顺序依次各检测管的发光强度。

注：c) 中具体加入体积根据不同样品盐度可变化，使最终待测样品中含相当于 3%的氯化钠。

5.7.6 费氏弧菌测试模式流程

设定便携式水质毒性分析仪，使其适用于费氏弧菌测试模式。

- a) 打开便携式水质毒性分析仪电源，静置，等待仪器预热完成。
- b) 按照空白样品、待测样品、阳性质控和阴性质控的顺序排列检测管，分别设置 2 个平行。
- c) 向 b) 中各检测管加入 100 μL 氯化钠溶液 (5.4.8)，再依次加入空白样品 (5.6 (10))、待测样品、阳性对照和阴性对照各 900 μL，摇晃混匀后放置于检测孔位平衡 10 min。测试海水样品时在检测管中分别加入 1 mL 的人工海水或待测海水样品。
- d) 取 100 μL 费氏弧菌悬浮液 (5.7.3) 加入另一组检测管中，依次置于仪器检测孔位测试费氏弧菌菌种悬浮液的初始发光强度，空白样品管初始发光强度记为 I_0 ，待测样品管、阳性对照管和阴性对照管的初始发光强度记为 I_t 。
- e) 取 900 μL 步骤 c) 调节好氯化钠浓度的空白样品、待测样品、阳性对照和阴性对照，加入到步骤 d) 对应的检测管中，轻微摇晃后，迅速放置于仪器对应检测孔位或恒温培养箱中。
- f) 待反应 15 min 后，按照样品加入顺序依次读取各检测管的发光强度。

注：c) 中具体加入体积根据不同样品盐度可变化，使最终待测样品中含相当于 3%的氯化钠。

5.8 结果计算与表示

5.8.1 明亮发光杆菌 T₃小种测试模式

样品的相对发光度按公式 (1) 计算：

$$RLI = \frac{I_{Tt}}{I_{kt}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

RLI ——待测样品、阳性对照和阴性对照分别与菌种悬浮液反应 15 min 时的相对发光度，%；

I_{Tt} ——待测样品、阳性对照和阴性对照分别与菌种悬浮液反应 15 min 时的发光强度，C/s；

I_{kt} ——对照样品与菌种悬浮液反应 15 min 时的发光强度，C/s。

样品的急性毒性（发光抑制率）按公式（2）计算：

$$H_t = 100\% - RLI \quad (2)$$

式中：

H_t ——待测样品、阳性对照和阴性对照分别与菌种悬浮液反应 15 min 时的发光抑制率，%；

RLI ——待测样品、阳性对照和阴性对照分别与菌种悬浮液反应 15 min 时的相对发光度，%。

注：空白样品作为对照样品。

5.8.2 费氏弧菌测试模式

校正因子按公式（3）计算：

$$f_t = I_{kt}/I_0 \quad (3)$$

式中：

f_t ——反应时间为 15 min 的校正因子；如有多个空白样品，则取 f_t 的平均值 \bar{f}_t ；

I_{kt} ——对照样品与菌种悬浮液反应 15 min 时的发光强度，C/s；

I_0 ——对照样品所用菌种悬浮液的初始发光强度，C/s。

待测样品、阳性对照和阴性对照所用菌种悬浮液的初始发光强度的校正值 I_{ct} 按公式（4）计算。

$$I_{ct} = \bar{f}_t \times I_t \quad (4)$$

式中：

I_{ct} ——待测样品、阳性对照和阴性对照所用菌种悬浮液的初始发光强度校正值，C/s；

I_t ——待测样品、阳性对照和阴性对照所用菌种悬浮液的初始发光强度，C/s。

待测样品、阳性对照和阴性对照的相对发光度和急性毒性（发光抑制率）按公式（5）和（6）计算：

$$RLI = \frac{I_{Tt}}{I_{ct}} \times 100\% \quad (5)$$

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \times 100\% \quad (6)$$

式中：

RLI ——待测样品、阳性对照和阴性对照分别与菌种悬浮液反应 15 min 时的相对发光度，%；

H_t ——待测样品、阳性对照和阴性对照分别与菌种悬浮液反应 15 min 时的发光抑制率，%；

I_{ct} ——待测样品、阳性对照和阴性对照所用菌种悬浮液的初始发光强度校正值，C/s；

I_{Tt} ——待测样品、阳性对照和阴性对照分别与菌种悬浮液反应 15 min 时的发光强度，

C/s。

5.8.3 结果表示

样品的报告结果为 2 次平行测定的平均值，保留 3 位有效数字。

报告内容应至少包括水样采集时间、测试时间、样品稀释倍数、原始 pH 值、使用菌种、测试模式、发光抑制率和阴性对照、阳性对照的测试结果。

本标准中水质急性毒性风险级别的判定，综合考量了现有相关标准限值要求、与《水质急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441）和 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)》— Part3: Method using freeze-dried bacteria (ISO 11348-3) 进行方法比对的结果、采用本标准对不同浓度氯化汞溶液的发光抑制率的结果、不同实验室采用不同仪器对多种实际样品、阴性质控样品和不同浓度七水硫酸锌进行测试的结果，同时结合了科研文献及国内外相关资料的调研成果，将样品的风险分为低、中、高三个等级，发光抑制率 $\leq 30\%$ 的样品为低风险； $30\% < \text{发光抑制率} \leq 60\%$ 的样品为中风险，需进行污染确认；发光抑制率 $> 60\%$ 的样品为高风险，需进行污染确认并采取应对措施。

在充分进行国内外资料调研的基础上，综合统计我国饮用水的发光抑制率（表 5-13）基本低于 30%，大部分地表水和地下水的发光抑制率也低于 30%（国标方法测试模式），大部分 I 和 II 类地表水的发光抑制率低于 20%（ISO 方法测试模式），未经处理的污水的发光抑制率可以达到 90%以上，经过处理后其发光抑制率可达 30%以下，属于低风险，而少量受污染地表水的发光抑制率可以达到 30%~60%之间，属于中风险级别，建议设置作为饮用水水源的地表水和地下水以 30%的发光抑制率为低风险阈值，作为预警级别。2008 年原环境保护部发布六个制药工业水的排放标准中对急性毒性的限值均为 0.07 mg/L HgCl₂ 毒性当量。本方法测试不同浓度 HgCl₂ 发光抑制率（5.7.4.8）拟合线性方程后计算出 0.07 mg/L 氯化汞对应的发光抑制率分别为 53.9%（明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式）和 45.2%（费氏弧菌测试模式），属于中风险级别。未经处理的生活污水和工业废水、投毒事件中水样的发光抑制率为 60%以上，为高风险。

5.9 质量保证和质量控制

5.9.1 菌种冻干粉的质量控制

（1）菌种冻干粉为乳白色的蓬松轻质固体，能迅速溶解于复苏液中，液体呈均匀乳白色，若发现冻干粉发黄或不溶解等现象请勿使用。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，按 5.7.3 步骤复苏后的菌种悬浮液采用稀释平板法测得的细胞密度明亮发光杆菌 T₃ 小种应不少于 10⁵ 个/mL，费氏弧菌应不少于 10⁷ 个/mL。

（2）菌种冻干粉需冷冻保存，运输过程中需冷链运输，添加足量的干冰或冰袋来保质，采用隔温材料进行包装。到达目的地后尽快放置于-20 ℃及以下环境中保存。

（3）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，开展空白对照、阴性对照和阳性对照试验，结果应符合 5.9.3 和 5.9.4 的要求方可用于测试。

(4) 复苏后的菌液置于 2℃~5℃环境中冷藏保存并于 6 h 内使用, 避免其在高温环境中失效。

表 5-13 我国水质综合急性毒性调研结果

序号	水样类型	样点	综合急性毒性	测试模式	数据来源
1	地表水	浙江	±18%	ISO 方法	[63]
2		江苏常州	-5%~20%	ISO 方法	[64]
3		上海	0%~34.63%	国标方法	[65]
4		苏州	31.0%~52.8%	国标方法	[66]
5		宁波	-8%~44%	ISO 方法	[67]
6		黄河花园口	-1.70%~52.84%	ISO 方法	[68]
7		武汉南湖	-17.7%~39.6%	未说明	[49]
8		武汉南湖	-24.02%~17.95%	未说明	[49]
9		辽宁鞍山	-9.30%~33.81%	国标方法	[69]
10		河北洋河	负值~25%	国标方法	[70]
11		北京密云水库	8%~15%	未说明	[71]
12		北京市	平均值为负值	ISO 方法	[46]
13		北京市城市下游	-3.40%~1.69%	ISO 方法	[46]
14		贵州枫树屯水库	±20% (I类)	ISO 方法	实验室测试
15		云南大理洱海	±20% (II类)	ISO 方法	
16		广东东江	±10%~±20% (II类)	ISO 方法	
17		河南南水北调干渠	±10% (II类)	ISO 方法	
18		福建八井水厂	±30% (III类)	ISO 方法	
19		四川岷江	±10%~±30% (III类)	ISO 方法	
20	地下水	北京市农村	负值	ISO 方法	[46]
21		北京市水源井	负值和 21%	ISO 方法	[46]
22		武汉	低于 30% (渍水)	未说明	[72]
23	污水处理厂出水	高碑店污水厂	负值~24%	国标方法	[71]
24		污水处理厂出水	负值和 4%	ISO 方法	[46]
25		浙江温州水厂	3%~39%	ISO 方法	[65]
26		武汉南湖	-22.51%~27.5%	未说明	[49]
27	生活污水	江苏省污水厂	25.9%~100%	国标方法	[45]
28		江苏省污水厂	18.5%~91%	国标方法	[45]
29	工业废水	/	-20%~90%	ISO 方法	[46]
30		河南安阳	22.1%~100%	国标方	[66]

序号	水样类型	样点	综合急性毒性	测试模式	数据来源
				法	
31	黑臭水体	温州	17.15±9.57%~84.37±12.52%	国标方法	[73]
32	水井投毒事件	浙江永嘉	投毒中心：94%逐渐降至10%	ISO方法	[63]

(5) 水样检测当天，在现场首次使用前需使用发光强度直读模式对复苏的菌种悬浮液进行一次测试，若光子量不小于 100000 C/s 则视为质量合格。

(6) 菌种悬浮液在实验温度下 15 min 后的发光强度应是初始发光强度的 0.6~1.8 倍。

5.9.2 背景噪声

背景噪声利用仪器探测器在没有信号光时直接测值，能体现仪器探测器本底的稳定性，将仪器设备打开预热 10 min 后，利用仪器单次测试模式，直接测试计数器在纯黑条件下所有通道计数器读值，重复 6 次，检测结果均 < 300 C/s。

表 5-14 背景噪声测试数据表

背景噪声 (C/s)												
轮数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
重复 1	0	0	0	53	0	0	0	0	68	0	0	0
重复 2	0	0	0	0	0	0	65	0	0	0	0	0
重复 3	0	0	85	0	0	0	57	0	0	0	0	74
重复 4	0	72	0	27	0	0	0	0	0	0	67	0
重复 5	46	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59
重复 6	0	0	0	0	38	54	0	0	0	0	22	0

5.9.3 阴性对照

明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

采用实验用水作为阴性对照样，同时利用实验用水做对照样品，采用仪器明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试阴性对照样发光抑制率，共测试 6 组，检测结果均在 ±10% 内，相对发光度的相对标准偏差为 0.31%。

表 5-15 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式阴性对照测试数据表

测试类型	阴性对照样测试数据表 (%)					
	1	2	3	4	5	6
阴性对照样	-1.94	-1.45	-1.77	-1.41	-2.22	-1.91

费氏弧菌测试模式

采用实验用水作为阴性对照样，同时利用实验用水做对照样品，采用仪器费氏弧菌测试模式测试阴性对照样发光抑制率，总共测试 6 组，检测结果均在±10%内，相对发光度的相对标准偏差为 0.99%。

表 5-16 费氏弧菌测试模式阴性对照测试数据表

测试类型	阴性对照样测试数据表 (%)					
	1	2	3	4	5	6
阴性对照样	1.90	1.90	1.60	2.00	2.70	4.20

本方法研制单位和验证单位对阴性对照样品的检测结果均在±5%内，方法验证时重复性限分别为 6.0%和 7.7%，因此考虑到现场测定条件，设定为阴性对照的检测结果显示不超过±10%。

5.9.4 阳性对照和重复性

明亮发光杆菌 T₃小种测试模式

采用 2.0 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌使用液作为阳性对照样，同时利用实验用水做对照样品，采用仪器明亮发光杆菌 T₃小种测试模式测试阳性对照样发光抑制率，总共测试 6 组。同时采用 0.5 mg/L 和 1 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌溶液平行测试 6 组，计算相对标准偏差即为重复性。0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 七水硫酸锌测试数据相对标准偏差≤15%，2.0 mg/L (以 Zn²⁺计) 的阳性对照样测试数据均>60%，相对标准偏差≤10%。

表 5-17 明亮发光杆菌 T₃小种测试模式阳性对照测试数据表

测试类型	阳性对照样测试数据表 (%)					
	1	2	3	4	5	6
0.5 mg/L 硫酸锌溶液	43.6	47.0	38.8	39.7	45.0	45.0
相对标准偏差	7.5					
1.0 mg/L 硫酸锌溶液	51.8	54.0	50.6	55.7	57.0	59.0
相对标准偏差	5.8					
2.0 mg/L 硫酸锌溶液	76.8	77.2	81.7	81.3	79.7	78.1
相对标准偏差	2.6					

费氏弧菌测试模式

采用 2 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌使用液作为阳性对照样，同时利用实验用水做对照样品，采用仪器费氏弧菌测试模式测试阳性对照样发光抑制率，总共测试 6 组。同时采用 0.5 mg/L 和 1 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌溶液平行测试 6 组，计算相对标准偏差即为重复性。0.5 mg/L 和 1.0 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌溶液测试数据相对标准偏差≤15%，2.0 mg/L (以 Zn²⁺计) 的阳性对照样测试数据均>60%，相对标准偏差≤10%。

表 5-18 费氏弧菌测试模式阳性对照测试数据表

测试类型	阳性对照样测试数据表 (%)					
	1	2	3	4	5	6
0.5 mg/L 硫酸锌溶液	49.4	42.6	48.2	45.8	45.1	45.7
相对标准偏差	5.2					
1.0 mg/L 硫酸锌溶液	56.1	57.1	60.5	56.5	57.3	59.8
相对标准偏差	3.1					
2.0 mg/L 硫酸锌溶液	83.5	83.8	85.5	84.4	80.6	85.8
相对标准偏差	2.2					

《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)中给出 0.10 mg/L 氯化汞对应的发光抑制率为 50%±10%，ISO 方法中 2.2 mg/L 硫酸锌溶液发光抑制率要求 20%~80%，文献^[74]中 0.07 mg/L 氯化汞对应的发光抑制率 42.84%和 0.10 mg/L 氯化汞对应的发光抑制率 61.57%，陈继红等报道费氏弧菌测试氯化汞的 EC₅₀ 值为 0.03 mg/L^[60]，工业废水排放标准 0.07 mg/L HgCl₂ 毒性当量采用青海弧菌(Q67)测试对应的发光抑制率应在 20%~50%之间^[34]，本方法测试不同浓度 HgCl₂ 发光抑制率(5.7.4.8)拟合线性方程后计算出 0.07 mg/L 氯化汞对应的发光抑制率分别为 53.9% (明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式)和 45.2% (费氏弧菌测试模式)。本方法研制时 2 mg/L (以 Zn²⁺计)硫酸锌使用液阳性对照样品的检测结果为 76.8%~85.8%，验证单位对 2 mg/L (以 Zn²⁺计)硫酸锌使用液对照样品的检测结果为 87.6%~100%，方法验证时重复性限分别为 1.9%和 3.1%，再现性限分别为 5.7%和 10%。《水质 急性毒性 高通量发光细菌测试方法》中测试的硫酸锌(以 Zn²⁺计)的 EC₅₀ 为 0.66~0.80 mg/L^[33]。本方法和 GB/T 15441 方法比对时，工业废水和生活污水发光抑制率高出 10%~45%，和 ISO 11348:3 方法比对时，工业废水和生活污水发光抑制率高出 30%~50%，本方法在测定发光抑制率≥30%的样品时具有更好的灵敏度。因此考虑到现场测定条件，设定为 2 mg/L (以 Zn²⁺计)硫酸锌使用液阳性对照的检测应≥60%，2 次平行测试的相对偏差应≤10%。

5.9.5 水样测试

明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

实验采用地表水，生活污水，工业废水，地下水和海水样品，采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试水样发光抑制率，每种样品平行测试 6 次。对于发光抑制率平均值接近于零的样品，其相对标准偏差会显著放大误差，因此对于发光抑制率 < 30% 的样品采用相对发光度的相对标准偏差表示结果的精密度，实际样品的相对标准偏差均 ≤ 15%。

表 5-19 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式实际样品测试结果

序号	水样测试	水样测试数据表 (%)					
		1	2	3	4	5	6
1	地表水样品	-0.4	1.3	6.6	2.5	8.8	8.4
	相对标准偏差	9.2					
2	生活污水样品 1	60.6	69.5	65.3	67.8	64.0	67.0
	相对标准偏差	4.8					
3	生活污水样品 2	44.1	36.5	40.2	41.1	42.5	37.1
	相对标准偏差	7.4					
4	生活污水样品 3	52.4	62.0	57.7	59.3	57.3	63.5
	相对标准偏差	6.7					
5	工业废水样品 1	86.6	82.3	82.4	84.6	88.1	84.4
	相对标准偏差	2.7					
6	工业废水样品 2	91.1	82.3	82.7	85.3	90.6	85.1
	相对标准偏差	4.4					
7	地下水样品	2.3	-1.5	0.1	-5.0	-4.9	0.1
	相对标准偏差	7.3					
8	海水样品	-0.66	4.2	-1.6	0.28	-7.2	0.71
	相对标准偏差	3.7					

费氏弧菌测试模式

实验采用地表水，生活污水，工业废水，地下水和海水样品，采用费氏弧菌测试模式测试水样发光抑制率，每种样品平行测试 6 次，实际样品的相对标准偏差均 $\leq 15\%$ 。

表 5-20 费氏弧菌测试模式实际样品测试结果

序号	水样测试	水样测试数据表 (%)					
		1	2	3	4	5	6
1	地表水样品	6.10	7.50	7.40	7.10	7.80	7.20
	相对标准偏差	1.7					
2	生活污水样品 1	53.4	60.3	55.6	53.5	53.6	58.7
	相对标准偏差	5.3					
3	生活污水样品 2	33.8	34.7	41.5	35.8	44.4	32.7
	相对标准偏差	13					
4	生活污水样品 3	57.8	55.4	50.5	48.4	54.0	58.2
	相对标准偏差	7.3					
5	工业废水样品 1	78.0	78.2	78.8	82.3	81.0	83.5
	相对标准偏差	2.9					
6	工业废水样品 2	81.2	79.0	83.6	85.5	76.6	81.4
	相对标准偏差	3.9					
7	地下水样品	4.10	4.40	3.90	4.80	4.00	3.90
	相对标准偏差	0.90					
8	海水样品	1.71	5.19	6.61	6.80	8.00	3.99
	相对标准偏差	2.4					

本方法研制单位和验证单位对实际样品检测的相对发光度或发光抑制率的相对标准偏差的结果均 $\leq 15\%$ ，方法验证时重复性限均 $\leq 15\%$ ，因此考虑到现场测定条件，设定为实际样品 2 次平行测定的相对偏差 $\leq 15\%$ 。

6 方法比对

6.1 方法比对方案

明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式与《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995) 进行方法比对，费氏弧菌测试模式与《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) 进行方法比对。分别采集地表水、地下水、海水、2 种不同来源工业废水、3 种不同生活污水样品各 7 个用于方法比对，海水样品均不调节样品盐度。不同方法的主要测试条件见表 6-1。

表 6-1 方法比对主要测试条件对照表

比对条件	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式	国标方法	费氏弧菌测试模式	ISO 方法
菌种复苏方式	复苏液复苏	盐水复苏	复苏液复苏	混合盐水复苏
复苏液类型及浓度	(3g 氯化钠定容至 100mL)	(2.5g 氯化钠定容至 100mL)	(3g 氯化钠定容至 100mL)	20g 氯化钠、2.035g 六水氯化镁、0.3g 氯化钾定容至 1L
反应温度	20°C	20°C	15°C	15°C
反应体系体积	50μL 菌种悬浮液+2mL 水样 (含 3%氯化钠)	10μL 菌种悬浮液+2mL 水样 (含 3%氯化钠)	100μL 菌种悬浮液+900μL 水样 (含 3%氯化钠)	500μL 菌种悬浮液+500μL 水样 (含 2%氯化钠)
反应时间	15min	15min	15min	15min

6.2 方法比对过程及结论

6.2.1 方法比对过程

分别采集地表水、地下水、2 种不同来源工业废水、3 种不同生活污水和海水样品各 7 个使用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式和《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441-1995) 方法进行测定, 每个样品测定 2 个平行, 平行双样测定的平均值记为测定值, 2 种不同来源工业废水的测试结果均为 100%, 因此分别稀释 5 倍 (工业废水 1, 制药废水) 和 125000 倍 (工业废水 2, 锌冶炼厂处理工艺段废水) 后进行比对实验, 实验的测定值以及显著性差异检验结果见表 6-2。

表 6-2 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式方法比对测定结果表

样品类型	样本数量	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式测定值 (%)	GB/T 15441-1995 测定值 (%)	配对差值 (%)	P
地表水	1	-24.0	-8.2	-15.7	0.0873
	2	-17.9	-4.3	-13.6	
	3	-19.6	-9.4	-10.6	
	4	-23.5	-9.4	-14.1	
	5	-24.4	-16.1	-8.3	
	6	-24.2	-8.8	-14.4	
	7	-3.3	-19.6	16.3	
地下水	1	-27.5	-6.9	-20.6	0.2134
	2	-27.4	-19.6	-7.7	

样品类型	样本数量	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式测定值 (%)	GB/T 15441-1995 测定值 (%)	配对差值 (%)	P
	3	-23.7	-17.5	-6.2	
续表 样品类型	样本数量	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式测定值 (%)	GB/T 15441-1995 测定值 (%)	配对差值 (%)	P
	4	-29.9	-35.4	5.5	
	5	-29.4	-31.6	2.2	
	6	-37.2	-29.9	-7.3	
	7	-31.2	-33.0	1.8	
工业废水 1	1	84.3	43.7	40.6	4.127*10 ⁻⁸
	2	83.5	46.2	37.4	
	3	84.0	46.8	37.2	
	4	84.9	46.6	38.3	
	5	84.7	42.1	42.6	
	6	85.5	39.8	45.7	
	7	84.9	42.9	42.0	
工业废水 2	1	91.0	47.9	43.1	1.215*10 ⁻⁹
	2	90.5	43.7	46.7	
	3	90.8	48.8	42.0	
	4	90.9	45.6	45.3	
	5	90.3	42.9	47.4	
	6	89.5	44.7	44.9	
	7	89.2	43.2	46.0	
生活污水 1	1	44.2	33.9	10.3	5.068*10 ⁻⁶
	2	44.4	28.8	15.7	
	3	45.9	28.5	17.4	
	4	46.5	31.3	15.2	
	5	42.9	27.3	15.6	
	6	44.2	31.9	12.3	
	7	42.8	25.8	17.0	
生活污水 2	1	73.8	49.9	23.9	4.174*10 ⁻⁸
	2	72.8	44.3	28.5	
	3	73.2	46.1	27.1	
	4	73.2	43.4	29.9	
	5	71.1	45.3	25.8	
	6	73.9	44.6	29.3	

续表
续表

样品类型	样本数量	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式测定值 (%)	GB/T 15441-1995 测定值 (%)	配对差值 (%)	P
	7	72.1	45.7	26.4	

样品类型	样本数量	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式测定值 (%)	GB/T 15441-1995 测定值 (%)	配对差值 (%)	P
生活污水 3	1	66.9	32.6	34.3	7.979*10 ⁻⁹
	2	64.8	30.6	34.2	
	3	64.6	30.7	33.8	
	4	63.4	26.0	37.4	
	5	62.6	26.5	36.1	
	6	62.7	31.7	30.9	
	7	62.7	28.8	34.0	
海水	1	2.90	-2.86	4.70	0.7315
	2	-0.149	-0.287	3.18	
	3	1.72	-1.69	1.54	
	4	-2.21	-1.51	3.23	
	5	-6.88	-0.910	-1.30	
	6	-3.68	-0.707	-6.17	
	7	2.90	-2.09	-1.59	

分别采集地表水、地下水、2种不同来源工业废水、生活污水和海水样品各7个使用费氏弧菌测试模式和《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)方法进行测定,每个样品测定2个平行,平行双样测定的平均值记为测定值,2种不同来源工业废水的测试结果均为100%,因此分别稀释5倍和125000倍后进行比对实验,实验的测定值以及显著性差异检验结果见表6-3。

表 6-3 费氏弧菌测试模式方法比对测定结果表

样品类型	样本数量	费氏弧菌测试模式测定值 (%)	ISO 11348-3-2007 测定值 (%)	配对差值 (%)	P
地表水	1	-21.9	-14.6	7.3	0.0523
	2	-22.7	-23.4	-0.8	
	3	-19.8	-4.7	15.1	
	4	-15.8	-17.0	-1.3	

续表

样品类型	样本数量	费氏弧菌测试模式测定值 (%)	ISO 11348-3-2007 测定值 (%)	配对差值 (%)	<i>P</i>
	5	-24.1	-16.3	7.8	
	6	-23.7	-21.0	2.7	
	7	-20.1	-14.9	5.2	
地下水	1	-9.5	-27.4	17.9	0.2390
	2	-6.5	-3.9	-2.6	

样品类型	样本数量	费氏弧菌测试模式测定值 (%)	ISO 11348-3-2007 测定值 (%)	配对差值 (%)	<i>P</i>
	3	-4.5	-9.4	5.0	
	4	-0.8	-4.9	4.1	
	5	-2.5	-4.1	1.6	
	6	-4.0	-3.6	-0.4	
	7	-5.1	-3.7	-1.4	
工业废水 1	1	88.3	34.3	54.0	1.216*10 ⁻¹²
	2	87.3	34.0	53.4	
	3	86.5	32.5	54.0	
	4	88.1	32.4	55.7	
	5	86.5	32.4	54.1	
	6	86.1	31.8	54.3	
	7	85.6	31.8	53.8	
工业废水 2	1	81.3	22.0	59.3	1.900*10 ⁻¹¹
	2	79.9	23.4	56.5	
	3	80.2	21.3	58.9	
	4	80.1	22.3	57.8	
	5	79.0	22.6	56.4	
	6	79.4	22.2	57.2	
	7	80.0	23.8	56.2	
生活污水 1	1	49.5	11.2	38.3	2.560*10 ⁻⁸
	2	50.3	10.6	39.7	
	3	51.9	11.4	40.5	
	4	49.9	11.5	38.4	
	5	53.1	10.2	42.9	
	6	52.2	10.5	41.7	
	7	51.4	4.8	46.6	

续表

样品类型	样本数量	费氏弧菌测试模式测定值 (%)	ISO 11348-3-2007 测定值 (%)	配对差值 (%)	<i>P</i>
生活污水 2	1	92.7	38.1	54.6	6.984*10 ⁻¹²
	2	92.9	37.7	55.2	
	3	92.8	37.1	55.8	
	4	93.0	40.0	53.0	
	5	92.8	37.4	55.5	
	6	93.0	38.1	54.9	
	7	92.9	39.1	53.8	

样品类型	样本数量	费氏弧菌测试模式测定值 (%)	ISO 11348-3-2007 测定值 (%)	配对差值 (%)	<i>P</i>
生活污水 3	1	87.6	38.5	49.1	1.283*10 ⁻¹²
	2	88.0	38.8	49.2	
	3	87.8	38.7	49.1	
	4	87.6	40.1	47.5	
	5	87.8	38.9	48.9	
	6	87.4	37.8	49.6	
	7	87.5	39.1	48.4	
海水	1	10.2	-4.29	14.5	0.0540
	2	7.98	-4.07	12.0	
	3	5.93	-2.63	8.56	
	4	-2.13	-3.50	1.37	
	5	2.36	-1.51	3.87	
	6	1.54	-0.683	2.22	
	7	-1.23	1.74	-2.97	

6.2.2 方法比对结论

结论：本方法的明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式和费氏弧菌测试模式测定地表水、地下水和海水时，与国标方法（GB/T 15441—1995）和 ISO 方法（ISO 11348-3-2007）的显著性水平分别为 0.0873、0.2134、0.0523、0.2390、0.7315 和 0.0540，均大于 0.05，说明本方法在测定发光抑制率 < 30% 的样品时与现有国标方法（GB/T 15441—1995）和 ISO 方法（ISO 11348-3-2007）方法没有显著差异。生活污水和工业废水测定结果的差异显著性均小于 0.05，且本方法测定的发光抑制率分别高于相应的国标方法（GB/T 15441—1995）和 ISO 方法（ISO 11348-3-2007）方法，说明本方法在测定发光抑制率 ≥ 30% 的样品时与国标方法（GB/T 15441—1995）和 ISO 方法（ISO 11348-3-2007）均有显著差异，且本方法在测定发光抑制率大于

30%的样品时具有更好的灵敏度。

原因分析和实施建议：对发光抑制率 $<30\%$ 的样品，方法的明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式和费氏弧菌测试模式测试结果一致。对于发光抑制率 $\geq 30\%$ 的样品，本方法由于使用的复苏液不同，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试灵敏度高于 GB/T 15441—1995 的测试结果，因为菌种本身在不同盐度的情况下存在着活性差异，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式中菌种复苏液的氯化钠含量为 3%，它的衰减程度方面相较于国标方法中的 2.5%^[29]更有优势；其次在从含有 2.5%氯化钠的复苏液转到含有 3%氯化钠的样品检测情况下存在环境变化，菌种对于变化环境存在适用期。其次费氏弧菌测试模式测试灵敏度高于 ISO 11348-3-2007 的测试结果，因为 ISO 方法中菌种复苏液添加含量比较高、荧光强度比较强，同样毒性的水样情况下相较于添加较少的菌种差值较小，变化会显示灵敏度低（计算结果是百分比），同时微生物普遍存在群体效应（感应调节系统），在面对相对外界环境胁迫下较多数量的微生物更有优势抵抗外界环境变化。另外 ISO 方法中水样只有 500 μL 体积，检测时加入 500 μL 菌种复苏液^[28]相当于样品稀释了 2 倍，而费氏弧菌测试模式稀释了 1/10，因此检测发光抑制率 $\geq 30\%$ 的样品时发光抑制率更低。

6.2.3 不同方法比对影响因素分析

本标准中明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式、费氏弧菌测试模式和 GB/T 15441、ISO 11348-3 方法的主要区别有温度、复苏液盐含量和菌种复苏液体积，进行正交实验比较不同条件的影响，从表 6-4 可以看出，温度对整个结果的影响较显著，呈现随温度上升越发显著情况；次显著影响的为复苏液氯化钠比例、在 1~5%的梯度中 3%为最佳条件；从加菌体积的结果看出从 10 μL 到 150 μL 的梯度之间不具有明显的差异，因此在实际应用中可根据实际情况进行选择（这一部分也是因为虽然菌体积不同但计算过程是扣除了背景计算的差值，因此初始菌体积并不会呈现明显差距），但菌种复苏液体积增大到 500 μL 时（ISO 11348-3 方法），具有明显的差异。

表 6-4 方法影响因素正交实验结果表

编号	反应温度	加菌体积	复苏液氯化钠含量	抑制率（均值）
1	10 °C	10 μL	1%	5.04%
2	10 °C	25 μL	3%	51.45%
3	10 °C	50 μL	5%	22.40%
4	10 °C	100 μL	2%	5.21%
5	10 °C	150 μL	4%	31.25%
6	15 °C	10 μL	5%	27.00%
7	15 °C	25 μL	2%	15.65%
8	15 °C	50 μL	4%	40.65%
9	15 °C	100 μL	1%	26.75%
10	15 °C	150 μL	3%	47.00%
11	20 °C	10 μL	4%	49.00%
12	20 °C	25 μL	1%	45.70%
13	20 °C	50 μL	3%	54.00%
14	20 °C	100 μL	5%	38.75%
15	20 °C	150 μL	2%	54.95%
16	25 °C	10 μL	3%	64.00%
17	25 °C	25 μL	5%	49.00%
18	25 °C	50 μL	2%	60.90%
19	25 °C	100 μL	4%	56.90%
20	25 °C	150 μL	1%	49.60%
21	30 °C	10 μL	2%	92.35%
22	30 °C	25 μL	4%	92.15%
23	30 °C	50 μL	1%	74.80%
24	30 °C	100 μL	3%	94.10%
25	30 °C	150 μL	5%	71.40%
K ₁	115.35%	237.39%	201.89%	/

K ₂	157.05%	253.95%	229.06%	/
K ₃	242.40%	252.75%	310.55%	/
K ₄	280.40%	221.71%	269.95%	/
K ₅	424.80%	254.20%	208.55%	/
K _{1avg}	23.07%	47.48%	40.38%	/
K _{2avg}	31.41%	50.79%	45.81%	/
K _{3avg}	48.48%	50.55%	62.11%	/
K _{4avg}	56.08%	44.34%	53.99%	/
K _{5avg}	84.96%	50.84%	41.71%	/
R	0.6189	0.065	0.2173	/

7 方法验证

7.1 方法验证方案

7.1.1 验证单位及人员情况

验证实验室和验证人员的基本情况见表 7-1。

表 7-1 参加验证实验室和人员的基本情况表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	从事相关分析工作年限	验证单位
杨晓红	女	52	正高级工程师	化学工程	29	云南省生态环境监测中心
毕丽玫	女	36	高级工程师	环境工程	10	
杜泽瑞	男	35	工程师	生物化学与分子生物学	9	北京市生态环境监测中心
刘康	男	46	工程师	生物工程	21	
朱瑞瑞	女	39	高级工程师	分析化学	13	湖南省生态环境监测中心
刘艳菊	女	53	高级工程师	化学工程	16	
魏凤	女	35	工程师	环境工程	10	
李和通	男	49	高级工程师	环境工程	16	河南省郑州生态环境监测中心
平小凡	男	43	高级工程师	物理化学	16	
魏君	女	47	高级工程师	环境工程	25	河北省生态环境监测中心
赵怡聪	女	30	工程师	海洋生态	2	
郭珍	女	38	高级工程师	工商管理	13	北京众合智能检测技术服务有限公司
丁雄	男	35	工程师	环境工程	12	
马恒	男	33	工程师	环境工程	6	
马超	男	38	高级工程师	化学工程	12	新疆维吾尔自治区生态环境监测总站
李欣	女	42	高级工程师	应用化学	17	
马莹	女	36	高级工程师	化学工程	10	

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	从事相关分析工作年限	验证单位
李萌萌	男	32	工程师	化学	9	

7.1.2 验证方案

背景噪声

背景噪声利用仪器探测器在没有信号光时直接测值，能体现仪器探测器本底的稳定性，各验证实验室将仪器设备打开预热 10 min 后，利用仪器单次测试模式，直接测试计数器在纯黑条件下所有通道探测器读值，重复 6 次。背景噪声结果均 < 300 C/s。

阴性对照

(1) 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

各验证实验室采用实验用水作为阴性对对照样，同时利用实验用水做对照样品，利用仪器单次测试模式采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试阴性对对照样发光抑制率，共测试 6 组。阴性对对照样测试数据在 ±10% 内。

(2) 费氏弧菌测试模式

各验证实验室采用实验用水作为阴性对对照样，同时利用实验用水做对照样品，利用仪器单次测试模式采用费氏弧菌测试模式测试阴性对对照样发光抑制率，共测试 6 组，阴性对对照样测试数据在 ±10% 内。

阳性对对照样及重复性

采用阳性对对照样连续测定 6 次，计算 6 次测定值的相对标准偏差 RSD 即为重复性。

(1) 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

各验证实验室采用 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌溶液作为阳性对对照样，同时利用实验用水做对照样品，利用仪器单次测试模式采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试阳性对对照样发光抑制率，共测试 6 组，0.5 mg/L 和 1.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌溶液测试数据相对标准偏差 ≤ 15%，2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌使用液阳性对对照样测试数据 ≥ 60%，测试数据相对标准偏差 ≤ 10%。

(2) 费氏弧菌测试模式

各验证实验室采用 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌溶液作为阳性对对照样，同时利用实验用水做对照样品，利用仪器单次测试模式采用费氏弧菌测试模式测试阳性对对照样发光抑制率，共测试 6 组，0.5 mg/L 和 1.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌溶液测试数据相对标准偏差 ≤ 15%，2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌使用液阳性对对照样测试数据 ≥ 60%，测试数据相对标准偏差 ≤ 10%。

水样测试

(1) 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

各验证实验室采用地表水样品 2 个，地下水样品 1 个，海水样品 1 个，生活污水样品 3 个，工业废水样品 2 个（工业废水 1 为制药废水，稀释 5 倍；工业废水 2 为锌冶炼厂处理工艺段废水，稀释 125000 倍），利用仪器单次测试模式采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试水样发光抑制率，每种样品平行测试 6 次，分别发光抑制率 < 30% 样品相对发光度和发光抑制率 ≥ 30% 样品发光抑制率的相对标准偏差。发光抑制率 < 30% 样品相对发光度和发光抑制率 ≥ 30% 样品发光抑制率的相对标准偏差 ≤ 15%。

(2) 费氏弧菌测试模式

各验证实验室采用地表水样品 2 个，地下水样品 1 个，海水样品 1 个，生活污水样品 3 个，工业废水样品 2 个（工业废水 1 为制药废水，稀释 5 倍；工业废水 2 为锌冶炼厂处理工艺段废水，稀释 125000 倍），利用仪器单次测试模式采用费氏弧菌测试模式测试水样发光抑制率，每种样品平行测试 6 次，分别发光抑制率 < 30% 样品相对发光度和发光抑制率 ≥ 30% 样品发光抑制率的相对标准偏差。发光抑制率 < 30% 样品相对发光度和发光抑制率 ≥ 30% 样品发光抑制率的相对标准偏差 ≤ 15%。

7.2 验证过程及结论

7.2.1 主要工作过程

通过筛选确定方法验证单位。按照方法验证方案准备实验用品，与验证单位确定验证时间。在方法验证前，参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。进行数据记录、处理；最后按 HJ 168—2020 的要求完成方法验证报告。验证过程中遇到问题及时沟通、交流和解决。

7.2.2 统一样品

7 家实验室按《水质急性毒性的现场快速测定发光细菌法》分别采用经验证过的实验用水作为阴性对照样、0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌溶液作为阳性对照样以及地表水样品 2 个、地下水样品 1 个、海水样品 1 个，生活污水样品 3 个和工业废水样品 2 个（工业废水 1 为制药废水，稀释 5 倍；工业废水 2 为锌冶炼厂处理工艺段废水，稀释 125000 倍）作为统一样品进行实验。实际水样统一从北京采集后经灭菌后 2℃~5℃ 冷藏运输至各家实验室进行测试，每个样品均重复测试 6 次。

7.2.3 方法验证结论

(1) 方法的背景噪声：7 家实验室验证结果背景噪声均 < 300 C/s。

(2) 方法的有效性及敏感性：7 家实验室对阴性对照统一样品重复测定 6 次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率平均值为 -3.72%~2.47%，总平均值为 0.0114%，相对发光度实验室内相对标准偏差为 1.0%~3.3%，实验室间相对标准偏差为 2.3%；费氏弧菌测

试模式下发光抑制率平均值为-2.80%~0.513%，总平均值为-0.516%，相对发光度实验室内相对标准偏差为1.6%~3.6%，实验室间相对标准偏差为1.1%，满足5.9.3要求。

7家实验室分别对阳性对照统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率平均值为93.8%~98.2%，总平均值为95.6%，实验室内相对标准偏差为0.12%~1.1%，实验室间相对标准偏差为2.0%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率平均值为89.7%~100%，总平均值为92.9%，实验室内相对标准偏差为0%~1.9%，实验室间相对标准偏差为3.7%，满足5.9.4要求。

(3) 方法的精密度：7家实验室分别对 Zn²⁺浓度为0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 的硫酸锌溶液统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为3.3%~9.4%、0.63%~6.7%、0.12%~1.1%；实验室间相对标准偏差分别为6.2%、3.0%、2.0%；重复性限分别为6.8%、8.9%、1.9%；再现性限分别为8.4%、9.9%、5.7%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为1.7%~9.3%、1.2%~5.0%、0%~1.9%；实验室间相对标准偏差分别为9.0%、2.9%、3.7%；重复性限分别为6.7%、8.0%、3.1%；再现性限分别为12%、9.1%、10%。

7家实验室分别地表水1、地下水和海水统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下相对发光度的实验室内相对标准偏差分别为1.3%~3.7%、0.35%~5.1%、1.5%~2.9%；实验室间相对标准偏差分别为2.7%、5.5%、1.5%；发光抑制率的重复性限分别为9.3%、9.2%、6.4%；再现性限分别为12%、19%、7.1%；费氏弧菌测试模式下相对发光度的实验室内相对标准偏差分别为2.2%~4.3%、0.93%~4.4%、2.1%~5.5%；实验室间相对标准偏差分别为2.1%、3.1%、6.7%；发光抑制率的重复性限分别为10%、9.6%、11%；再现性限分别为11%、13%、20%。

7家实验室分别对地表水2、生活污水1、生活污水2、生活污水3、工业废水1（稀释5倍）、工业废水2（稀释125000倍）统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为3.3%~15%、1.4%~3.1%、1.5%~4.1%、0.70%~2.6%、1.1%~4.9%、0.48%~1.0%；实验室间相对标准偏差分别为13%、5.6%、4.3%、12%、5.3%、2.7%；重复性限分别为9.1%、4.7%、4.8%、2.3%、7.0%、2.1%；再现性限分别为13%、13%、7.8%、18%、14%、7.4%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为6.9%~12%、0.71%~1.9%、1.2%~3.7%、5.4%~7.0%、0.19%~5.6%、0.98%~3.81%；实验室间相对标准偏差分别为12%、4.6%、3.8%、7.4%、5.0%、5.0%；重复性限分别为9.1%、4.7%、4.3%、6.3%、7.3%、5.2%；再现性限分别为13%、11%、7.9%、9.3%、14%、12%。

不同浓度阳性对照样品和实际样品的相对发光度或发光抑制率的相对标准偏差均≤15%。

(4) 方法各项特性达到方法背景噪声、有效性及敏感性和精密度的要求。

样品验证结果见表7-2—表7-5。方法验证数据具体见附件一《方法验证报告》。

表 7-2 方法的阴性对照结果

序号	分析方法	发光抑制率总平均	发光抑制率平均值 (%)	相对发光度实验室内相对标准偏	相对发光度实验室间相对标准偏差
----	------	----------	--------------	----------------	-----------------

		值 (%)		差 (%)	(%)
1	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式	0.0114	-3.72~2.47	1.0~3.3	2.3
2	费氏弧菌测试模式	-0.516	-2.80~0.513	1.6~3.6	1.1

表 7-3 方法的阳性对照结果

序号	分析方法	发光抑制率总平均值 (%)	发光抑制率平均值 (%)	相对发光度实验室内相对标准偏差 (%)	相对发光度实验室间相对标准偏差 (%)
1	明亮发光杆菌 T ₃ 小种测试模式	95.6	93.8~98.2	0.12~1.1	2.0
2	费氏弧菌测试模式	92.9	89.7~100	0~1.9	3.7

表 7-4 方法的精密度验证结果 (明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式)

序号	样品类型	总平均值 (%)	实验室内相对标准偏差 (%)	实验室间相对标准偏差 (%)	重复性限 (%)	再现性限 (%)
1	0.5 mg/L (以 Zn ²⁺ 计)硫酸锌溶液	33.3	3.3~9.4	6.2	6.8	8.4
2	1.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计)硫酸锌溶液	69.3	0.63~6.7	3.0	8.9	9.9
3	2.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计)硫酸锌溶液	95.6	0.12~1.1	2.0	1.9	5.7
4	地表水 1	-22.5	1.3~3.7	2.7	9.3	12
5	地表水 2	30.5	3.3~15	13	9.1	13
6	地下水	-13.2	0.35~5.1	5.5	9.2	19
7	海水	0.731	1.5~2.9	1.5	6.4	7.1
8	生活污水 1	78.5	1.4~3.1	5.6	4.7	13
9	生活污水 2	55.6	1.5~4.1	4.3	4.8	7.8
10	生活污水 3	56.3	0.70~2.6	12	2.3	18

11	工业废水 1	81.8	1.1~4.9	5.3	7.0	14
12	工业废水 2	93.0	0.48~1.0	2.7	2.1	7.4

注：地表水 1、地下水和海水样品采用相对发光度结果计算实验室内相对标准偏差和实验室间相对标准偏差，其余结果均采用发光抑制率结果计算获得。

表 7-5 方法的精密度验证结果（费氏弧菌测试模式）

序号	样品类型	总平均值 (%)	实验室内相对 标准偏差 (%)	实验室间相对 标准偏差 (%)	重复性限 (%)	再现性限 (%)
1	0.5 mg/L（以 Zn ²⁺ 计）硫酸锌 溶液	41.4	1.7~9.3	9.0	6.7	12
2	1.0 mg/L（以 Zn ²⁺ 计）硫酸锌 溶液	67.8	1.2~5.0	2.9	8.0	9.1
3	2.0 mg/L（以 Zn ²⁺ 计）硫酸锌 溶液	92.9	0~1.9	3.7	3.1	10
4	地表水 1	-14.1	2.2~4.3	2.1	10	11
5	地表水 2	30.6	4.9~12	12	9.1	13
6	地下水	-14.7	0.93~4.4	3.1	9.6	13
7	海水	9.36	2.1~5.5	6.7	11	20
8	生活污水 1	77.4	0.71~1.9	4.6	4.7	11
9	生活污水 2	65.7	1.2~3.7	3.8	4.3	7.9
10	生活污水 3	35.4	5.4~7.0	7.4	6.3	9.3
11	工业废水 1	92.0	0.19~5.6	5.0	7.3	14
12	工业废水 2	81.0	0.98~3.8	5.0	5.2	12

注：地表水 1、地下水和海水样品采用相对发光度结果计算实验室内相对标准偏差和实验室间相对标准偏差，其余结果均采用发光抑制率结果计算获得。

8 与开题报告的差异说明

无。

9 标准征求意见稿技术审查情况

2025年7月4日，生态环境部生态环境监测司以腾讯会议方式召开《水质 综合急性毒性的现场快速监测 发光细菌法》征求意见稿技术审查会，专家组听取了标准主编单位所作的标准文本和编制说明的内容介绍，经质询、讨论，形成以下审查意见：

- 一、标准主编单位提供的材料齐全、内容较完整；
- 二、标准主编单位对国内外方法标准及文献进行了充分调研；
- 三、标准定位准确，技术路线合理可行，方法验证内容较完善。

专家组通过该标准征求意见稿的技术审查。建议按照以下意见修改完善后，提请公开征求意见：

- 1、建议将标准名称修改为：水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法；
- 2、本标准需充分考虑与实验室标准的衔接；确定标准适用范围；删除毒性分级标准；完善菌种验收等文本内容；
- 3、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。

按照审查委员会审查意见，标准编制组对标准文本征求意见稿和编制说明进行了修改：将标准名称修改为《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法》；在前期海水样品测试的基础上，增加了对海水样品的测试并对海水样品进行了7家实验室的验证，验证结果满足方法质控的要求，在适用范围中增加了海水的内容；删除了标准中毒性分级的相关内容；补充完善了菌种的验收技术要求；与正在修订的实验室方法《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（项目编号：993）进行协调衔接，对相同内容的不同表述方式进行了协商修改；按照《环境监测分析方法标准制定技术导则》（HJ 168—2020）和《环境保护标准编制出版指南》（HJ 565—2010）的要求对标准文本和编制说明进行了规范性编辑，修改了文本错误和格式。修改完成后正式提交《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法（征求意见稿）》及其编制说明。

10 标准实施建议

本标准规定了水质急性毒性的现场快速测定方法。本标准适用于地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水中急性毒性的现场快速测定。标准的发布和实施是现场快速监测标准体系的重要补充，建议尽快实施。

11 参考文献

- [1] 张晟，殷鸿洋，王凯迪，等. 应用发光细菌和斑马鱼对印染废水的毒性评估分析[J]. 常州大学学报（自然科学版），2020, 32（02）：22-30.
- [2] 李再兴，尹青，赵俊娜，等. 发光细菌法测定水质急性毒性研究进展[J]. 河北科技大学学报, 2014, 35（05）：480-486.
- [3] 王英才，王树磊，胡文，等. 生物综合毒性监测技术进展与多源生物预警体系[J]. 人民长江, 2017, 48（11）：21-26.

- [4] 高品, 于晓霏, 杨婧, 等. 工业废水综合毒性评价方法及其应用研究进展[J]. 工业水处理, 2024, 44 (04) : 19-29.
- [5] 任国清. 电镀项目废水处理措施及环境影响评价要点探究[J]. 皮革制作与环保科技, 2024, 5 (23) : 111-113.
- [6] 张波, 梁颖, 王恺, 等. 尾矿库水污染隐患排查整治要点分析[J]. 皮革制作与环保科技, 2024, 5 (21) : 188-190.
- [7] 王佳琪, 柳蒙蒙, 汪志永, 等. 典型工业废水有机污染物特征和分析方法[J/OL]. 工业水处理, 1-46[2025-03-27].
- [8] 于波. 固定化黑曲霉对溴氰菊酯废水的修复[D]. 沈阳化工大学, 2018.
- [9] 狄军贞, 高梦晴, 姜洋洋, 等. 新型 MOF/壳聚气凝胶去除 Cu(II)及环丙沙星[J]. 环境科学与技术, 2025, 48 (03) : 210-219.
- [10] 王肖肖. 城市生活废水处理及环境保护措施研究[J]. 黑龙江环境通报, 2024, 37 (12) : 107-109.
- [11] 肖庆, 王国增, 韩静, 等. 微塑料生物毒性研究现状及热点可视化剖析[J]. 生物技术进展, 2023, 13 (04) : 619-627.
- [12] 张文娟. 印染废水与辽河典型区域河水的毒性特征研究[D]. 大连:大连理工大学, 2012.
- [13] US EPA . . Method guidance and recommendations for whole effluent toxicity (WET) testing [R]. Washington DC: US EPA Office of Water, 2000: 1-2.
- [14] 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.
- [15] 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>.
- [16] OSPAR Commission . OSPAR practical study 2005 on whole effluent assessment[R]. London, United Kingdom: OSPAR Commission, 2007.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 国家海洋局生态环境保护司. 污水生物毒性急性监测技术规程 发光细菌急性毒性测试-费氏弧菌法(试行)[S]. 2015:10.
- [22] 国家市场监督管理总局. 水质毒性分析仪校准规范: JJF 2203—2020[S]. 2025: 2.
- [23] Bulich A A, A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples [J]. Process Biochemistry, 1982, 17:45-47.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part3: Method using freeze-dried bacteria: ISO 11348-3-2007[S]. 2007:12.
- [29] 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: 中国标准出版社, 1995:3.
- [30] 中华人民共和国海关总署. 国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法: SN/T 5103—2019 [S]. 2019:9.
- [31] 生态环境部. 水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法: HJ 1069—2019 [S]. 2019:12.
- [32] 国家环境保护总局, 水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法(第四版): [G]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [33] 台湾环境保护署. 水样急毒性检测方法 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: DB 23/T 2750—2020 [S]. 2020:12.
- [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: DB 37/T 4298—2020 [S]. 2020:12.
- [36] 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/SSESB 6—2023[S], 2023.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Reemtsma T, Putschew A, Jekel M. Industrial wastewater analysis: A toxicity-directed approach[J]. Waste Management, 1999, 19(2): 181-188.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] HE D F, CHEN R R, ZHU E H, et al. Toxicity bioassays for water from black-odor rivers in Wenzhou, China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22: 1731-1741.
- [45] YU Y, WU B, JIANG L M, et al. Comparative analysis of toxicity reduction of wastewater in twelve industrial park wastewater treatment plants based on battery of toxicity assays[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 3751-3760.
- [46] 孙成华, 刘康. 发光细菌毒性测试在水环境监测中的初步应用: 中国环境科学学会学术年会论文集(第四卷)[C]. 昆明, 2013.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 力合科技(湖南)股份有限公司. 武汉市新冠肺炎疫情南湖水质监测阶段性报告[R]. 2020.
- [50] 朱文杰, 王晓媛, 王菁, 等. 淡水发光菌青海弧菌在四川地震灾区水质急性毒性检测中的应用[C]. 中国微生物学会学术年会, 2008.
- [51] 嵇志远, 孟炯, 黄允河. 采用快速毒性测定仪测定水源水和自来水的综合毒性[J]. *净水技术*, 2018, 37(9): 73-77, 131.
- [52] 陈晓东, 辛素梅, 罗苹, 等. 应用生物发光技术评价炼油废水的综合急性毒性[J]. *石油化工环境保护*, 1989, 03: 20-21, 39.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 皇甫鑫, 廖肿, 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.
- [56] 生态环境部. 突发环境事件应急监测技术规范: HJ 589—2021[S]. 2021:12.
- [57] 环境保护部. 国家环境保护标准制修订工作管理办法[S]. 2017:2.
- [58] 生态环境部. 环境监测分析方法标准制订技术导则: HJ 168—2020[S]. 北京: 中国环境出版社, 2020:12.
- [59] 广东省环境保护厅, 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: DB 44/T 1946—2016[S]. 2016:12.
- [60] 陈继红, 王富生, 舒易强, 等. 发光细菌法在水质综合毒性在线检测中的应用[J]. *环境工程学报*, 2013, 7(10): 4144-4148.
- [61] 环境保护部. 水质 采样技术指导: HJ 494—2009 [S]. 2009:9.
- [62] 国家质量监督检验检疫总局. 海洋监测规范 第4部分: 海水分析: GB 17378.4—2007 [S]. 2007:10.
- [63] 黄灿克, 刘婷婷, 汤晓畏. 发光细菌毒性法在饮用水水质评估与预警中的应用[J]. *环境监控与预警*, 2015, 7(3): 4-7,21.
- [64] 吴礼裕, 沈丽娟, 张翔. 生物毒性在线监测方法在常州地表水水质预警监测的应用研究[J]. *环境保护与循环经济*, 2017, 37(12): 39-43.
- [65] ZHANG L L, QIAN L, LING C, et al. Toxicity of surface water from Huangpu River to

- luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis* SP. Q67) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 112: 137-143.
- [66] 岳舜琳. 用发光细菌监测水质突发性污染[J]. *净水技术*, 2008, 27 (1): 65-68.
- [67] 潘海祥, 楼小平, 王军海. 发光细菌法用于给水系统的毒性监测及预警[J]. *中国给水排水*, 2008, 24 (8): 73-76.
- [68] 张宁, 王玥劫, 张世敏, 等. 发光细菌测试技术在黄河水质评价中的应用[J]. *人民黄河*. 2013, 35 (12): 61-63.
- [69] 付海龙, 王阿欣. 鞍山市河流的生物毒性影响研究[J]. *环境保护与循环经济*, 1998, 18 (3): 38-40.
- [70] 马梅, 王子健. 利用主动和被动采样技术和发光菌毒性测试评价水中有机污染物的毒性[J]. *环境科学学报*, 2004, 24 (4): 684-689.
- [71] 中国城镇供水协会. 明亮发光杆菌毒性数据索引: 毒性快速检测论文集[C]. 广州, 2005.
- [72] 刘俊玲, 何振宇, 汪耀, 等. 2016年武汉市渍水水质变化过程监测与分析[J]. *卫生研究*, 2017, 46 (6): 956-959.
- [73] HE D F, CHEN R R, ZHU E H, et al. Toxicity bioassays for water from black-odor rivers in Wenzhou, China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22: 1731-1741.
- [74] 梁淑轩, 汤景梅, 刘山, 等. 汪洋沟水质及生物毒性评价[J]. *环境与健康杂志*, 2014, 31 (6): 532-534.

附件一

方法验证报告

方法名称：水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法

项目主编单位：中国科学院生态环境研究中心

验证单位：云南省生态环境监测中心、北京市生态环境监测中心、湖南省生态环境监测中心、新疆维吾尔自治区生态环境监测总站、河北省生态环境监测中心、河南省郑州生态环境监测中心、北京众合智能检测技术服务有限公司、

项目负责人及职称：李红岩 正高级工程师

通讯地址：北京市海淀区双清路 18 号 电话：13718507197

报告编写人及职称：于志勇 高级工程师

报告日期：2025 年 8 月 8 日

1 原始测试数据

1.1 实验室基本情况

本方法的7家验证实验室分别为：云南省生态环境监测中心、北京市生态环境监测中心、湖南省生态环境监测中心、河南省郑州生态环境监测中心、河北省生态环境监测中心、北京众合智能检测技术服务有限公司、新疆维吾尔自治区生态环境监测总站，参加验证的人员情况详见附表1-1，参加验证单位仪器情况见附表1-2，参加验证单位试剂及溶剂情况见附表1-3。

附表 1-1 参加验证实验室和人员的基本情况表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	从事相关分析工作年限	验证单位
杨晓红	女	52	正高级工程师	化学工程	29	云南省生态环境监测中心
毕丽玫	女	36	高级工程师	环境工程	10	
杜泽瑞	男	35	工程师	生物化学与分子生物学	9	北京市生态环境监测中心
刘康	男	46	工程师	生物工程	21	
朱瑞瑞	女	39	高级工程师	分析化学	13	湖南省生态环境监测中心
刘艳菊	女	53	高级工程师	化学工程	16	
魏凤	女	35	工程师	环境工程	10	
李和通	男	49	高级工程师	环境工程	16	河南省郑州生态环境监测中心
平小凡	男	43	高级工程师	物理化学	16	
魏君	女	47	高级工程师	环境工程	25	河北省生态环境监测中心
赵怡聪	女	30	工程师	海洋生态	2	
郭珍	女	38	高级工程师	工商管理	13	北京众合智能检测技术服务有限公司
丁雄	男	35	工程师	环境工程	12	
马恒	男	33	工程师	环境工程	6	
马超	男	38	高级工程师	化学工程	12	新疆维吾尔自治区生态环境监测总站
李欣	女	42	高级工程师	应用化学	17	
马莹	女	36	高级工程师	化学工程	10	
李萌萌	男	32	工程师	化学	9	

附表 1-2 参加验证单位仪器情况登记表

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
便携式水质毒性分析仪	LumiFox	A12312227	良好	云南省生态环境监测中心
	DeltaTox II	DT104711	良好	北京市生态环境监测中心
	ToxScreen-III	LB9509	良好	湖南省生态环境监测中心
	LFTOX-B2010	L19010287	良好	河南省郑州生态环境监测中心
	BHP9514	N07217D	良好	河北省生态环境监测中心
	LFTOX-B2010	L19010293	良好	北京众合智能检测技术服务有限公司
	LFTOX-B2010	L20110333	良好	新疆维吾尔自治区生态环境监测总站

附表 1-3 参加验证单位试剂及溶剂情况登记表

名称	生产厂家、规格	纯度	验证单位
氯化钠	上海国药集团, 500g	分析纯	云南省生态环境监测中心、北京市生态环境监测中心、湖南省生态环境监测中心、河南省郑州生态环境监测中心、河北省生态环境监测中心、北京众合智能检测技术服务有限公司、新疆维吾尔自治区生态环境监测总站
七水合硫酸锌	上海国药集团, 500g	分析纯	

7 家实验室按《水质 急性毒性的现场快速测定 发光细菌法》分别采用实验用水作为阴性对照样、0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L（以 Zn^{2+} 计）硫酸锌溶液作为阳性对照样以及地表水实验样品 2 个、地下水实验样品 1 个、海水实验样品 1 个，生活污水样品 3 个和工业废水样品 2 个（工业废水 1 为制药废水，稀释 5 倍；工业废水 2 为锌冶炼厂处理工艺段废水，稀释 125000 倍）作为统一样品进行实验。实际样品统一从北京采集后经灭菌后 2~5 °C 冷藏运输至各家实验室进行测试，每个样品均重复测试 6 次。

1.2 背景噪声

背景噪声利用仪器探测器在没有信号光时直接测值，能体现仪器探测器本底的稳定性，各验证实验室将仪器设备打开预热 10 min 后，利用仪器单次测试模式，直接测试计数器在纯黑条件下所有通道探测器读值，重复 6 次。测试结果见附表 1-4。

附表 1-4 背景噪声实验结果

背景噪声测试数据 (C/s)	重复次数					
	1	2	3	4	5	6
X ₁	0	0	0	0	0	0
X ₂	7	6	6	8	6	9
X ₃	0	1	1	0	1	1
X ₄	0	0	0	0	0	0
X ₅	0	0	0	0	0	0
X ₆	0	0	0	0	0	33
X ₇	0	0	0	0	0	0
X ₈	0	0	0	0	0	0
X ₉	0	0	0	0	0	0
X ₁₀	0	0	44	0	0	0
X ₁₁	33	0	0	0	0	79
X ₁₂	0	0	0	0	0	42
X ₁₃	0	36	33	0	0	0
X ₁₄	0	0	0	32	0	0
X ₁₅	35	0	0	0	0	0
X ₁₆	31	29	16	47	24	38
X ₁₇	32	27	36	21	16	34
X ₁₈	33	23	29	39	27	14
X ₁₉	34	23	30	34	29	49
X ₂₀	55	37	26	23	24	27
X ₂₁	31	96	25	33	36	15
X ₂₂	32	27	47	46	23	17
X ₂₃	28	26	28	44	46	24
X ₂₄	59	75	36	49	32	43
X ₂₅	24	26	17	25	32	36
X ₂₆	32	37	34	50	24	32
X ₂₇	43	44	35	29	25	32
X ₂₈	25	36	31	24	32	31
X ₂₉	26	56	42	67	39	24
X ₃₀	34	30	18	49	29	21
X ₃₁	46	54	34	56	42	33
X ₃₂	22	33	49	27	20	22
X ₃₃	55	27	60	19	20	29

续表

背景噪声测试数据(C/s)	重复次数					
	1	2	3	4	5	6
X ₃₄	0	0	0	0	0	0
X ₃₅	0	0	0	0	61	0
X ₃₆	0	0	0	37	0	0
X ₃₇	0	0	34	21	45	0
X ₃₈	41	0	0	0	0	0
X ₃₉	0	0	0	0	56	0
X ₄₀	0	0	0	0	25	0
X ₄₁	0	0	92	0	0	0
X ₄₂	0	0	0	0	0	0
X ₄₃	0	0	0	0	73	0
X ₄₄	32	0	0	0	0	0
X ₄₅	0	60	45	0	0	0
X ₄₆	0	0	0	0	0	0
X ₄₇	0	53	0	0	0	0
X ₄₈	0	0	0	34	37	0
X ₄₉	18	60	0	0	0	0
X ₅₀	0	0	0	0	0	0
X ₅₁	0	0	39	0	0	0
X ₅₂	0	0	0	0	0	0
X ₅₃	0	0	43	0	33	0
X ₅₄	28	0	0	0	45	0
X ₅₅	76	0	20	0	0	0
X ₅₆	0	27	0	0	0	35
X ₅₇	0	0	52	29	0	0

注：X₁.云南省生态环境监测中心；X₂.北京市生态环境监测中心；X₃.湖南省生态环境监测中心；X₄~X₁₅.河南省郑州生态环境监测中心；X₁₆~X₃₃.河北省生态环境监测中心；X₃₄~X₄₅.北京众合智能检测技术服务有限公司；X₄₆~X₅₇.新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

结论：背景噪声测试结果均<300 C/s。

1.3 阴性对照样

明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

各验证实验室采用实验用水作为阴性对照样，同时利用实验用水做对照样品，利用仪器单次测试模式采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试阴性对照样发光抑制率，共测试 6 组，测试结果见附表 1-5。

附表 1-5 阴性对照明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式试验结果

实验室 编号	阴性对对照样测试数据表 (%)					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	-2.22	-4.80	-4.56	-4.43	2.34	2.34
2	1.71	1.30	4.03	4.73	0.604	-0.962
3	-1.02	3.85	1.96	2.25	3.99	3.81
4	-4.87	-3.74	-3.39	-4.94	-3.45	-1.94
5	1.61	2.26	-0.0695	1.45	0.497	4.82
6	0.532	1.84	-0.268	-4.60	2.43	2.83
7	-0.371	-1.34	0.747	-2.05	-1.51	-0.919

注：1.云南省生态环境监测中心；2.北京市生态环境监测中心；3.湖南省生态环境监测中心；4.河南省郑州生态环境监测中心；5.河北省生态环境监测中心；6.北京众合智能检测技术服务有限公司；7.新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

结论：明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式阴性对对照样测试结果在 ±10% 内。

费氏弧菌测试模式

各验证实验室采用实验用水作为阴性对对照样，同时利用实验用水做对照组，利用仪器单次测试模式采用费氏弧菌测试模式测试阴性对对照样发光抑制率，共测试 6 组，测试结果见附表 1-6。

附表 1-6 阴性对对照费氏弧菌测试模式试验结果

实验室 编号	阴性对对照样测试数据表 (%)					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	-0.0940	-4.57	-2.83	0.772	0.772	2.26
2	-3.31	-0.977	2.18	-2.02	2.73	3.74
3	-4.41	-4.71	1.45	0.202	3.80	-1.94
4	-0.343	-3.34	-4.76	-3.34	-1.08	-3.91
5	-3.06	-1.75	4.08	4.03	-3.42	3.20
6	-3.37	-2.46	4.26	1.15	2.25	0.154
7	-2.44	2.08	-0.992	-0.725	0.613	-1.54

注：1.云南省生态环境监测中心；2.北京市生态环境监测中心；3.湖南省生态环境监测中心；4.河南省郑州生态环境监测中心；5.河北省生态环境监测中心；6.北京众合智能检测技术服务有限公司；7.新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

结论：费氏弧菌测试模式阴性对对照样测试结果在 ±10% 内。

1.4 阳性对对照样及重复性

明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

各验证实验室采用 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌溶液作为阳性对照样，同时利用实验用水做对照样品，利用仪器单次测试模式采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试阳性对照样发光抑制率，共测试 6 组，测试结果见附表 1-7。

附表 1-7 阳性对照明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式试验结果

实验室编号	0.5 mg/L（以 Zn ²⁺ 计）硫酸锌溶液测试数据表（%）						相对标准偏差（%）
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	
1	38.2	33.9	37.3	32.3	38.6	33.4	7.7
2	33.1	39.3	37.1	34.5	36.2	30.7	8.7
3	33.4	39.7	36.6	32.5	36.6	30.8	9.4
4	30.3	31.7	33.2	32.6	31.3	32.5	3.3
5	33.4	35.3	32.5	32.7	32.9	32.1	3.4
6	34.4	28.4	29.9	27.7	27.7	31.0	8.7
7	30.4	31.8	31.4	31.1	35.8	34.2	6.4
实验室编号	1.0 mg/L（以 Zn ²⁺ 计）硫酸锌溶液测试数据表（%）						相对标准偏差（%）
1	71.0	68.5	62.4	74.7	66.4	67.4	6.1
2	66.5	69.6	64.7	68.3	76.1	72.7	6.0
3	63.2	67.6	58.7	70.4	69.7	66.7	6.7
4	72.5	69.6	73.6	76.0	71.5	73.5	3.0
5	68.6	67.7	68.9	68.0	68.4	68.4	0.63
6	70.7	65.9	71.8	71.0	72.1	65.5	4.3
7	72.7	71.3	67.8	70.8	69.5	72.0	2.5
实验室编号	2.0 mg/L（以 Zn ²⁺ 计）硫酸锌溶液测试数据表（%）						相对标准偏差（%）
1	98.3	97.0	96.6	97.2	97.4	98.0	0.65
2	94.3	93.7	93.0	94.0	94.6	94.3	0.61
3	94.1	93.0	92.4	93.5	94.2	93.8	0.74
4	95.8	93.3	93.9	93.3	93.2	93.4	1.1
5	96.9	94.6	95.0	94.5	94.4	94.6	1.0
6	96.9	97.0	97.0	97.2	97.3	97.5	0.23
7	98.0	98.1	98.2	98.3	98.3	98.2	0.12

注：1.云南省生态环境监测中心；2.北京市生态环境监测中心；3.湖南省生态环境监测中心；4.河南省郑州生态环境监测中心；5.河北省生态环境监测中心；6.北京众合智能检测技术服务有限公司；7.新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

结论：明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌溶液测试数据相对标准偏差 ≤15%，2.0 mg/L（以 Zn²⁺计）硫酸锌使用液阳性对照样测试数据 ≥60%，测试数据相对标准偏差 ≤10%。

费氏弧菌测试模式

各验证实验室采用 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌溶液作为阳性对照样, 同时利用实验用水做对照样品, 利用仪器单次测试模式采用费氏弧菌测试模式测试阳性对照样发光抑制率, 共测试 6 组, 测试结果见附表 1-8。

附表 1-8 阳性对照费氏弧菌测试模式试验结果

实验室编号	0.5 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液测试数据表 (%)						相对标准偏差 (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	
1	40.9	37.1	41.3	41.5	41.5	49.0	9.3
2	42.2	44.9	45.5	40.2	40.4	48.2	7.3
3	47.2	47.9	46.1	46.3	47.5	48.0	1.7
4	37.1	35.5	37.8	37.5	36.2	39.4	3.6
5	41.6	44.0	40.2	40.6	42.2	43.3	3.5
6	38.4	42.5	44	38.1	42.6	45.1	6.9
7	34.4	36.8	35.5	37.5	34.9	37.8	3.9
实验室编号	1.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液测试数据表 (%)						相对标准偏差 (%)
1	67.4	65.7	71.6	66.1	72.4	71.6	4.4
2	66.3	70.2	66.8	73.3	69.7	70.3	3.7
3	65.9	68.5	71.5	65.5	57.8	68.5	7.1
4	66.3	67.7	65.9	64.7	64.0	69.9	3.2
5	72.0	68.9	71.1	68.3	72.6	72.3	2.6
6	65.8	65.4	66.9	66.0	64.5	65.4	1.2
7	66.6	67.9	72.0	63.1	63.4	68.3	5.0
实验室编号	2.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液测试数据表 (%)						相对标准偏差 (%)
1	100	100	100	100	100	100	0
2	92.2	92.3	93.4	93.8	93.7	94.6	1.0
3	92.9	92.3	92.9	94.4	94.9	95.0	1.2
4	91.8	87.6	88.4	89.3	91.3	89.8	1.8
5	94.0	89.8	89.8	90.5	92.9	90.7	1.9
6	89.8	90.7	91.8	90.9	91.1	90.5	0.73
7	90.7	91.5	90.9	92.1	90.6	91.6	0.65

注: 1.云南省生态环境监测中心; 2.北京市生态环境监测中心; 3.湖南省生态环境监测中心; 4.河南省郑州生态环境监测中心; 5.河北省生态环境监测中心; 6.北京众合智能检测技术服务有限公司; 7.新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

结论: 费氏弧菌测试模式下 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌溶液测试数据相对标准偏差 ≤ 15%, 2.0 mg/L (以 Zn²⁺计) 硫酸锌使用液阳性对照样测试数据 ≥ 60%, 测试数据相对标准偏差 ≤ 10%。

1.5 水样测试

明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式

各验证实验室采用地表水样品 2 个，地下水样品 1 个，海水样品 1 个，生活污水样品 3 个，工业废水样品 2 个（工业废水 1 为制药废水，稀释 5 倍；工业废水 2 为锌冶炼厂处理工艺段废水，稀释 125000 倍），利用仪器单次测试模式采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式测试水样发光抑制率，每种样品平行测试 6 次，分别计算发光抑制率 < 30% 样品相对发光度和发光抑制率 ≥ 30% 样品发光抑制率的相对标准偏差，测试结果见附表 1-9。

费氏弧菌测试模式

各验证实验室采用地表水样品 2 个，地下水样品 1 个，海水样品 1 个，生活污水样品 3 个，工业废水样品 2 个（工业废水 1 为制药废水，稀释 5 倍；工业废水 2 为锌冶炼厂处理工艺段废水，稀释 125000 倍），仪器单次测试模式采用费氏弧菌测试模式测试水样发光抑制率，每种样品平行测试 6 次，分别计算发光抑制率 < 30% 样品相对发光度和发光抑制率 ≥ 30% 样品发光抑制率的相对标准偏差，测试结果见附表 1-10。

附表 1-9 实际样品明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式的测定结果

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	地表水 1 样品	-26.2	-18.3	-28.1	-23.6	-25.0	-28.6
	相对标准偏差	3.0					
	地表水 2 样品	26.2	22.4	26.2	32.0	33.1	28.5
	相对标准偏差	14					
	地下水样品	-14.1	-8.19	-0.161	-4.82	-10.3	-0.884
	相对标准偏差	5.1					
	海水样品	9.88	6.01	-9.82	-3.99	-1.96	10.4
	相对标准偏差	2.9					
	生活污水 1 样品	82.4	85.3	87.2	87.7	89.0	89.6
	相对标准偏差	3.1					
	生活污水 2 样品	64.8	52.3	57.4	54.0	65.8	63.4
	相对标准偏差	9.8					
	生活污水 3 样品	54.1	56.7	55.4	59.3	55.2	58.0
	相对标准偏差	3.4					
	工业废水 1 样品	78.5	76.2	75.9	73.0	70.4	70.9
	相对标准偏差	4.4					
工业废水 2 样品	95.1	97.0	96.3	97.3	97.8	97.2	
相对标准偏差	0.99						
2	地表水 1 样品	-22.0	-23.1	-26.0	-15.9	-22.9	-19.5
	相对标准偏差	2.9					

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
	地表水 2 样品	27.4	34.1	35.8	38.8	27.7	38.4
	相对标准偏差	15					
	地下水样品	-13.3	-4.09	-3.02	-12.7	-8.12	-4.24
	相对标准偏差	4.2					
	海水样品	-3.10	0.62	3.81	-4.10	-0.0408	-2.44
	相对标准偏差	2.6					
	生活污水 1 样品	74.7	76.3	77.9	77.6	78.5	79.2
	相对标准偏差	2.1					
	生活污水 2 样品	53.7	54.3	54.8	53.1	58.7	56.8
	相对标准偏差	3.8					
	生活污水 3 样品	54.0	55.4	55.7	54.7	55.0	53.7
	相对标准偏差	1.4					
	工业废水 1 样品	82.5	77.9	81.5	82.4	79.2	77.5
	相对标准偏差	2.8					
	工业废水 2 样品	91.0	92.1	91.5	92.0	92.2	92.6
	相对标准偏差	0.62					
3	地表水 1 样品	-21.0	-21.9	-28.0	-23.6	-21.0	-21.6
	相对标准偏差	2.2					
	地表水 2 样品	33.4	32.4	31.9	37.8	37.2	32.8
	相对标准偏差	7.5					
	地下水样品	-11.3	-2.36	-2.07	-8.40	-6.74	-11.4
	相对标准偏差	3.9					
	海水样品	1.55	0.857	-3.45	-3.04	-2.30	-5.25
	相对标准偏差	2.0					
	生活污水 1 样品	72.5	75.2	77.5	76.6	77.9	77.5
	相对标准偏差	2.7					
	生活污水 2 样品	49.9	50.8	51.3	52.8	55.5	54.2
	相对标准偏差	4.1					
	生活污水 3 样品	52.4	54.4	55.3	54.2	54.1	53.6
	相对标准偏差	1.8					
	工业废水 1 样品	82.6	73.3	81.6	82.9	77.1	76.9
	相对标准偏差	4.9					
工业废水 2 样品	90.0	91.0	90.5	91.2	91.6	92.1	
相对标准偏差	0.83						

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
4	地表水 1 样品	-26.4	-27.0	-25.5	-25.3	-20.4	-25.3
	相对标准偏差	1.9					
	地表水 2 样品	21.2	25.1	23.8	22.4	22.3	26.0
	相对标准偏差	7.8					
	地下水样品	-12.9	-14.3	-10.9	-12.0	-13.8	-14.8
	相对标准偏差	1.3					
	海水样品	5.20	3.69	1.26	1.07	0.612	0.516
	相对标准偏差	2.6					
	生活污水 1 样品	75.9	73.7	73.8	72.6	74.3	72.9
	相对标准偏差	1.6					
	生活污水 2 样品	55.6	52.2	53.0	52.8	54.7	55.8
	相对标准偏差	2.9					
	生活污水 3 样品	63.4	63.7	64.0	63.8	64.4	64.6
	相对标准偏差	0.70					
	工业废水 1 样品	85.5	82.6	85.4	85.9	84.3	85.0
	相对标准偏差	1.4					
工业废水 2 样品	93.6	93.2	94.4	94.1	93.5	95.6	
相对标准偏差	0.92						
5	地表水 1 样品	-18.4	-24.0	-26.1	-15.6	-17.1	-17.8
	相对标准偏差	3.5					
	地表水 2 样品	32.8	33.7	34.7	35.0	35.4	35.9
	相对标准偏差	3.3					
	地下水样品	-19.6	-18.4	-19.5	-20.5	-22.2	-20.3
	相对标准偏差	1.1					
	海水样品	0.363	0.564	1.10	-2.50	4.16	4.41
	相对标准偏差	1.5					
	生活污水 1 样品	83.0	81.0	80.8	82.7	81.0	80.1
	相对标准偏差	1.4					
	生活污水 2 样品	59.7	56.2	57.4	60.5	59.3	59.5
	相对标准偏差	2.8					
	生活污水 3 样品	64.7	64.5	63.3	63.7	63.9	63.7
	相对标准偏差	0.83					
	工业废水 1 样品	80.8	85.3	87.6	83.8	85.7	86.8
	相对标准偏差	2.9					

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
	工业废水 2 样品	95.6	95.2	96.2	95.9	95.4	96.9
	相对标准偏差	0.65					
6	地表水 1 样品	-16.2	-21.1	-23.2	-12.7	-14.3	-13.8
	相对标准偏差	3.7					
	地表水 2 样品	25.7	26.1	29.0	28.9	31.5	31.8
	相对标准偏差	8.9					
	地下水样品	-18.1	-17.7	-18.3	-18.9	-17.9	-18.2
	相对标准偏差	0.35					
	海水样品	-1.19	0.856	1.31	1.74	1.58	2.45
	相对标准偏差	2.0					
	生活污水 1 样品	74.1	76.3	75.2	74.9	77.5	75.6
	相对标准偏差	1.6					
	生活污水 2 样品	55.2	54.7	54.0	55.3	54.7	56.5
	相对标准偏差	1.5					
	生活污水 3 样品	53.9	53.6	52.5	54.5	54.8	53.6
	相对标准偏差	1.5					
	工业废水 1 样品	86.5	86.6	86.7	88.4	86.5	85.5
	相对标准偏差	1.1					
	工业废水 2 样品	90.3	91.4	90.3	90.8	91.0	90.5
	相对标准偏差	0.48					
	地表水 1 样品	-23.2	-27.2	-25.6	-26.7	-26.1	-27.8
7	相对标准偏差	1.3					
	地表水 2 样品	27.8	29.5	30.2	30.8	31.4	33.2
	相对标准偏差	6.0					
	地下水样品	-19.3	-18.6	-21.1	-22.5	-16.5	-20.3
	相对标准偏差	1.7					
	海水样品	-0.356	-0.0487	0.840	2.07	2.27	5.10
	相对标准偏差	2.0					
	生活污水 1 样品	77.7	77.4	77.2	78.8	78.8	80.5
	相对标准偏差	1.6					
	生活污水 2 样品	56.4	59.6	55.8	58.4	57.5	59.7
	相对标准偏差	2.8					
	生活污水 3 样品	46.9	49.9	46.9	46.8	46.8	47.8
	相对标准偏差	2.6					

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
	工业废水 1 样品	81.0	83.3	85.7	82.9	83.3	79.3
	相对标准偏差	2.7					
	工业废水 2 样品	91.0	90.5	92.6	90.3	90.2	90.2
	相对标准偏差	1.0					

注：1.云南省生态环境监测中心；2.北京市生态环境监测中心；3.湖南省生态环境监测中心；4.河南省郑州生态环境监测中心；5.河北省生态环境监测中心；6.北京众合智能检测技术服务有限公司；7.新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

结论：明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率 < 30% 样品相对发光度和发光抑制率 ≥ 30% 样品发光抑制率的相对标准偏差 ≤ 15%。

附表 1-10 实际样品费氏弧菌测试模式的测定结果

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	地表水 1 样品	-12.7	-17.3	-10.5	-10.3	-18.4	-16.2
	相对标准偏差	3.1					
	地表水 2 样品	30.8	30.6	41.2	31.5	35.6	42.1
	相对标准偏差	15					
	地下水样品	-20.9	-19.5	-23.6	-18.6	-21.2	-15.7
	相对标准偏差	2.2					
	海水样品	7.65	10.6	12.4	11.7	15.6	21.0
	相对标准偏差	5.3					
	生活污水 1 样品	79.7	83.2	83.9	82.5	82.6	80.8
	相对标准偏差	1.9					
	生活污水 2 样品	64.2	57.3	52.6	56.1	54.2	64.2
	相对标准偏差	8.6					
	生活污水 3 样品	30.3	31.2	29.3	31.8	31.0	34.3
	相对标准偏差	5.4					
	工业废水 1 样品	88.3	88.1	78.5	80.8	80.3	78.1
	相对标准偏差	5.6					
	工业废水 2 样品	88.1	89.3	86.2	93.1	86.8	88.1
	相对标准偏差	2.8					
2	地表水 1 样品	-11.4	-16.5	-10.7	-15.7	-13.0	-9.99
	相对标准偏差	2.4					

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
	地表水 2 样品	26.2	32.3	34.0	36.2	33.2	36.9
	相对标准偏差	12					
	地下水样品	-13.0	-12.1	-12.0	-14.7	-13.4	-2.66
	相对标准偏差	3.9					
	海水样品	7.64	12.5	13.0	15.7	17.5	10.9
	相对标准偏差	4.0					
	生活污水 1 样品	71.5	72.4	72.9	76.0	76.2	76.9
	相对标准偏差	3.1					
	生活污水 2 样品	64.5	64.5	67.3	67.9	68.0	69.0
	相对标准偏差	2.9					
	生活污水 3 样品	31.7	29.9	32.6	33.8	35.3	31.9
	相对标准偏差	5.7					
	工业废水 1 样品	95.6	95.9	95.7	95.5	95.5	95.4
	相对标准偏差	0.19					
	工业废水 2 样品	81.7	82.4	82.2	80.6	83.5	83.2
	相对标准偏差	1.3					
3	地表水 1 样品	-15.2	-8.17	-7.13	-15.2	-8.56	-7.32
	相对标准偏差	3.5					
	地表水 2 样品	26.1	33.9	29.6	24.4	32.4	30.9
	相对标准偏差	13					
	地下水样品	-18.6	-24.5	-13.5	-18.1	-13.5	-25.8
	相对标准偏差	4.4					
	海水样品	0.466	-5.64	5.53	9.33	5.47	5.96
	相对标准偏差	5.5					
	生活污水 1 样品	70.7	69.7	72.0	76.1	72.1	75.4
	相对标准偏差	3.5					
	生活污水 2 样品	62.4	62.1	63.6	65.7	64.3	65.7
	相对标准偏差	2.4					
	生活污水 3 样品	34.4	32.8	38.1	39.1	37.8	35.2
	相对标准偏差	6.8					
	工业废水 1 样品	93.9	95.2	95.2	95.2	94.6	95.7
	相对标准偏差	0.66					
工业废水 2 样品	81.9	81.2	81.8	78.7	83.2	81.5	
相对标准偏差	1.8						

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
4	地表水 1 样品	-20.9	-17.1	-18.5	-11.9	-11.3	-12.2
	相对标准偏差	3.5					
	地表水 2 样品	21.5	25.9	23.7	25.4	23.5	23.6
	相对标准偏差	6.6					
	地下水样品	-18.4	-14.3	-8.89	-11.9	-8.79	-18.2
	相对标准偏差	3.8					
	海水样品	0.638	0.983	2.45	3.71	7.34	9.84
	相对标准偏差	3.8					
	生活污水 1 样品	74.0	76.7	75.4	78.0	76.5	75.4
	相对标准偏差	1.8					
	生活污水 2 样品	63.2	63.3	64.3	63.8	65.1	65.5
	相对标准偏差	1.5					
	生活污水 3 样品	32.4	37.1	39.8	39.0	37.2	38.0
	相对标准偏差	7.0					
	工业废水 1 样品	85.4	89.3	93.2	95.7	90.3	94.0
	相对标准偏差	4.1					
工业废水 2 样品	78.9	78.2	80.2	79.2	80.2	79.2	
相对标准偏差	0.98						
5	地表水 1 样品	-9.69	-15.1	-14.7	-11.1	-12.2	-15.7
	相对标准偏差	2.2					
	地表水 2 样品	32.9	30.7	31.6	26.6	28.6	32.0
	相对标准偏差	7.8					
	地下水样品	-12.4	-11.2	-9.79	-9.97	-10.4	-11.7
	相对标准偏差	0.93					
	海水样品	-0.702	-0.350	0.360	2.77	3.00	4.25
	相对标准偏差	2.1					
	生活污水 1 样品	81.6	81.4	80.0	81.9	83.8	81.9
	相对标准偏差	1.5					
	生活污水 2 样品	69.0	70.9	70.0	70.5	69.5	71.2
	相对标准偏差	1.2					
	生活污水 3 样品	36.6	36.2	36.1	41.6	38.8	40.5
	相对标准偏差	6.2					
	工业废水 1 样品	87.5	92.6	92.1	92.5	90.3	92.3
	相对标准偏差	2.2					

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
	工业废水 2 样品	78.4	83.2	81.5	83.9	82.6	83.1
	相对标准偏差	2.4					
6	地表水 1 样品	-17.7	-14.9	-6.20	-11.9	-18.1	-19.2
	相对标准偏差	4.3					
	地表水 2 样品	30.2	31.2	25.0	28.9	32.0	33.2
	相对标准偏差	9.6					
	地下水样品	-15.1	-11.9	-14.7	-14.7	-11.4	-13.0
	相对标准偏差	1.4					
	海水样品	19.3	16.9	15.7	15.2	12.5	23.7
	相对标准偏差	4.7					
	生活污水 1 样品	77.4	76.9	76.3	77.6	77.6	77.7
	相对标准偏差	0.71					
	生活污水 2 样品	62.6	67.2	62.5	64.6	68.4	65.6
	相对标准偏差	3.7					
	生活污水 3 样品	32.1	34.2	35.3	37.9	34.7	35.6
	相对标准偏差	5.4					
	工业废水 1 样品	94.4	94.2	93.8	94.9	92.6	94.3
	相对标准偏差	0.84					
	工业废水 2 样品	77.1	77.2	75.2	78.7	81.5	72.9
	相对标准偏差	3.8					
7	地表水 1 样品	-12.4	-17.4	-19.4	-21.7	-16.8	-21.1
	相对标准偏差	2.9					
	地表水 2 样品	34.4	31.5	30.5	32.3	30.0	31.9
	相对标准偏差	4.9					
	地下水样品	-18.7	-15.9	-11.1	-13.5	-12.6	-15.2
	相对标准偏差	2.4					
	海水样品	12.8	8.57	6.69	14.2	18.7	17.3
	相对标准偏差	5.4					
	生活污水 1 样品	79.0	79.3	77.4	76.7	75.8	78.3
	相对标准偏差	1.8					
	生活污水 2 样品	63.3	62.5	63.5	63.6	64.5	65.0
	相对标准偏差	1.4					
	生活污水 3 样品	34.3	37.6	34.9	40.7	37.1	39.9
	相对标准偏差	6.9					

续表

实验室 编号	水样类型	水样测试数据表 (%)					
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
	工业废水 1 样品	89.5	94.3	96.9	96.5	93.4	95.4
	相对标准偏差	2.9					
	工业废水 2 样品	77.4	74.6	77.4	76.0	76.3	77.1
	相对标准偏差	1.4					

注：1.云南省生态环境监测中心；2.北京市生态环境监测中心；3.湖南省生态环境监测中心；
4.河南省郑州生态环境监测中心；5.河北省生态环境监测中心；6.北京众合智能检测技术服务有限公司；7.新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

结论：费氏弧菌测试模式下发光抑制率 $\leq 30\%$ 样品相对发光度和发光抑制率 $\geq 30\%$ 样品发光抑制率的相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

2 方法验证结论

2.1 异常值检验

1) 柯克伦检验

分别计算 7 家实验室 12 个样品的标准偏差并进行柯克伦检验。明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式的计算结果见附表 2-1，费氏弧菌测试模式的计算结果见附表 2-2。

附表 2-1 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式发光抑制率标准偏差及柯克伦检验 (%)

实验室 <i>i</i>	样品名称												
	阴性对照	0.5mg/L 硫酸锌溶液	1.0mg/L 硫酸锌溶液	2.0mg/L 硫酸锌溶液	地表水 1	地表水 2	地下水	海水	生活污水 1	生活污水 2	生活污水 3	工业废水 1	工业废水 2
1	3.404	2.730	4.182	0.634	3.764	4.002	5.469	8.242**	2.655	5.821**	1.938**	3.229	0.958
2	2.136	3.051	4.175	0.571	3.474	5.067*	4.547	2.922	1.627	2.118	0.782	2.254	0.566
3	1.923	3.275	4.409	0.693	2.698	2.572	4.140	2.630	2.055	2.146	0.961	3.884	0.753
4	1.110	1.048	2.163	1.003	2.347	1.835	1.477	1.930	1.174	1.547	0.449	1.199	0.866
5	1.713	1.138	0.427	0.953	4.200	1.144	1.273	2.598	1.150	1.622	0.532	2.436	0.619
6	2.740	2.584	2.990	0.226	4.286	2.578	0.412	1.250	1.183	0.841	0.808	0.940	0.436
7	0.988	2.090	1.784	0.117	1.620	1.820	2.087	2.001	1.238	1.625	1.229	2.197	0.932
$\sum s^2$	32.502	40.927	71.348	3.186	77.662	62.938	76.048	99.418	19.551	51.345	7.938	43.668	3.995
$s_{\text{最大}}$	3.404	3.275	4.409	1.003	4.286	5.067	5.469	8.242	2.655	5.821	1.938	3.884	0.958
检验统计量值 <i>C</i>	0.357	0.262	0.273	0.316	0.236	0.408	0.393	0.683	0.360	0.660	0.473	0.345	0.230
柯克伦检验临界值 5%/1%	0.397/0.466												

附表 2-2 费氏弧菌测试模式发光抑制率标准偏差及柯克伦检验 (%)

实验室 <i>i</i>	样品名称												
	阴性对照	0.5mg/L 硫酸锌溶液	1.0mg/L 硫酸锌溶液	2.0mg/L 硫酸锌溶液	地表水 1	地表水 2	地下水	海水	生活污水 1	生活污水 2	生活污水 3	工业废水 1	工业废水 2
1	2.566	3.876	3.061	0.000	3.533	5.252	2.678	4.627	1.569	4.990**	1.694	4.647*	2.459
2	2.873	3.185	2.573	0.918	2.697	3.824	4.351	3.488	2.309	1.913	1.860	0.179	1.050
3	3.369	0.804	4.685	1.171	3.860	3.669	5.253	5.306	2.557	1.562	2.465	0.628	1.482
4	1.712	1.355	2.151	1.627	4.050	1.568	4.306	3.688	1.375	0.947	2.595	3.743	0.776
5	3.624	1.489	1.836	1.752	2.440	2.367	1.032	2.048	1.221	0.842	2.371	2.008	1.987
6	2.874	2.902	0.794	0.663	4.918	2.894	1.591	3.864	0.547	2.400	1.897	0.787	2.939
7	1.615	1.415	3.339	0.592	3.415	1.551	2.693	4.717	1.363	0.891	2.574	2.708	1.084
$\sum s^2$	53.120	40.295	57.720	8.721	92.855	74.513	83.080	116.710	19.875	39.161	34.986	48.014	23.710
$s_{\text{最大}}$	3.624	3.876	4.685	1.752	4.918	5.252	5.253	5.306	2.557	4.990	2.595	4.647	2.939
检验统计量值 C	0.247	0.373	0.380	0.352	0.260	0.370	0.332	0.241	0.329	0.636	0.193	0.450	0.364
柯克伦检验临界值 5%/1%	0.397/0.466												

对明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式进行柯克伦检验结果表明, 第 1 家实验室的海水样品、生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果大于 1% 临界值, 判定为统计离群值, 第 2 家实验室的地表水 2 样品小于 1% 临界值大于 5% 临界值, 为歧离值, 其余结果均小于 5% 临界值, 判定为正确值。对费氏弧菌测试模式进行柯克伦检验结果表明, 第 1 家实验室的生活污水 2 样品的结果大于 1% 临界值, 判定为统计离群值, 第 1 家实验室的工业废水 1 样品小于 1% 临界值大于 5% 临界值, 为歧离值, 其余结果均小于 5% 临界值, 判定为正确值, 因此剔除明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式第 1 家实验室的生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果以及费氏弧菌测试模式第 1 家实验室的生活污水 2 样品的结果后再次进行柯克伦检验, 计算结果见附表 2-3。

附表 2-3 剔除离群值第二轮柯克伦检验结果 (%)

实验室 i	测试模式及样品名称			
	明亮发光杆菌 T_3 小种测试模 式海水	明亮发光杆菌 T_3 小种测试模 式生活污水 2	明亮发光杆菌 T_3 小种测试模 式生活污水 3	费氏弧菌测试 模式生活污水 2
1	-	-	-	-
2	2.922	2.118	0.782	1.913
3	2.630	2.146	0.961	1.562
4	1.930	1.547	0.449	0.947
5	2.598	1.622	0.532	0.842
6	1.250	0.841	0.808	2.400
7	2.001	1.625	1.229	0.891
$\sum s^2$	31.489	17.463	4.183	14.257
s 最大	2.922	2.146	1.229	2.400
检验统计量值 C	0.271	0.264	0.361	0.404
柯克伦检验临界值 5%/1%		0.445/0.520		

对剔除第 1 家实验室明亮发光杆菌 T_3 小种测试模式的海水样品、生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果以及费氏弧菌测试模式的生活污水 2 样品的结果进行第二次柯克伦检验结果表明, 6 家实验室的结果均为正确值。

2) 格拉布斯检验

分别计算剔除第 1 家实验室明亮发光杆菌 T_3 小种测试模式的海水样品、生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果以及费氏弧菌测试模式的生活污水 2 样品的结果后 7 家实验室 12 个样品的平均值并进行格拉布斯检验。明亮发光杆菌 T_3 小种测试模式的计算结果见附表 2-4, 费氏弧菌测试模式的计算结果见附表 2-5。

附表 2-4 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式发光抑制率平均值及格拉布斯检验 (%)

实验室 <i>i</i>	样品名称												
	阴性对照	0.5mg/L 硫酸锌溶液	1.0mg/L 硫酸锌溶液	2.0mg/L 硫酸锌溶液	地表水 1	地表水 2	地下水	海水	生活污水 1	生活污水 2	生活污水 3	工业废水 1	工业废水 2
1	-1.888	35.617	68.400	97.417	-24.967	28.067	-6.409	-	86.867	-	-	74.150	96.783
2	1.902	35.150	69.650	93.983	-21.567	33.700	-7.578	-0.875	77.367	55.233	54.750	80.167	91.900
3	2.473	34.933	66.050	93.500	-22.850	34.250	-7.045	-1.939	76.200	52.417	54.000	79.067	91.067
4	-3.722	31.933	72.783	93.817	-24.983	23.467	-13.117	2.058	73.867	54.017	63.983	84.783	94.067
5	1.761	33.150	68.333	95.000	-19.833	34.583	-20.083	1.350	81.433	58.767	63.967	85.000	95.867
6	0.461	29.850	69.500	97.150	-16.883	28.833	-18.183	1.124	75.600	55.067	53.817	86.700	90.717
7	-0.907	32.450	70.683	98.183	-26.100	30.483	-19.717	1.646	78.400	57.900	47.517	82.583	90.800
\bar{x}	0.011	33.298	69.343	95.579	-22.455	30.483	-13.162	0.561	78.533	55.567	56.339	81.779	93.029
G _p	1.078	1.115	1.637	1.332	1.695	1.009	1.090	1.941	1.903	1.343	1.183	1.137	1.479
G _l	1.635	1.657	1.567	1.063	1.109	1.726	1.117	0.570	1.066	1.322	1.365	1.762	0.911
格拉布斯检验临界值 5%/1%	2.020/2.139							1.887/1.973	2.020/2.139	1.887/1.973		2.020/2.139	
2 个最大值 G	0.2364	0.2924	0.4128	0.5477	0.5789	0.2650	0.4476	0.0705	0.6355	0.4121	0.4919	0.2267	0.6267
2 个最小值 G	0.5710	0.5268	0.3131	0.3848	0.2084	0.5625	0.4957	0.6105	0.1040	0.1971	0.1803	0.5743	0.2022
格拉布斯检验临界值 5%/1%	0.0708/0.0308							0.0349/0.0116	0.0708/0.0308	0.0349/0.0116		0.0708/0.0308	

附表 2-5 费氏弧菌测试模式发光抑制率平均值及格拉布斯检验 (%)

实验室 <i>i</i>	样品名称												
	阴性对照	0.5mg/L 硫酸锌溶液	1.0mg/L 硫酸锌溶液	2.0mg/L 硫酸锌溶液	地表水 1	地表水 2	地下水	海水	生活污水 1	生活污水 2	生活污水 3	工业废水 1	工业废水 2
1	-0.615	41.883	69.133	100.00*	-14.233	35.300	-19.917	13.158	82.117	-	31.317	82.350*	88.600
2	0.391	43.546	69.433	93.346	-12.882	33.133	-11.310	12.873	74.317	66.867	32.533	95.600	82.267
3	-0.935	47.167	66.283	93.733	-10.263	29.550	-19.000	3.519	72.667	63.967	36.233	94.967	81.383
4	-2.796	37.250	66.436	89.700	-15.317	23.933	-13.413	4.160	76.000	64.200	37.250	91.317	79.317
5	0.513	41.983	70.867	91.283	-13.082	30.400	-10.910	1.555	81.767	70.183	38.300	91.217	82.117
6	0.331	41.783	65.667	90.800	-14.667	30.083	-13.467	17.222	77.250	65.150	34.967	94.033	77.100
7	-0.501	36.150	66.883	91.233	-18.133	31.767	-14.500	13.043	77.750	63.733	37.417	94.333	76.467
\bar{x}	-0.516	41.395	67.815	92.871	-14.082	30.595	-14.645	9.362	77.410	65.683	35.431	91.974	81.036
Gp	0.892	1.548	1.545	2.068	1.574	1.324	1.058	1.286	1.328	1.811	1.089	0.793	1.859
G1	1.977	1.407	1.088	0.920	1.669	1.875	1.493	1.277	1.339	0.785	1.561	2.104	1.123
格拉布斯检验临界值 5%/1%	2.020/2.139									1.887/ 1.973	2.020/2.139		
2 个最大值 G	0.1443	0.2525	0.5869	0.7219	0.3342	0.2426	0.1267	0.4263	0.4114	0.7474	0.1562	0.0860	0.4883
2 个最小值 G	0.6704	0.3942	0.3035	0.0981	0.4037	0.4841	0.5308	0.5502	0.2357	0.0417	0.5947	0.7541	0.2531
格拉布斯检验临界值 5%/1%	0.0708/0.0308									0.0349/ 0.0116	0.0708/0.0308		

对明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式进行单侧格拉布斯检验结果表明，剔除第 1 家实验室的海水样品、生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果后，第 1 家实验室的 2.0mg/L 七水硫酸锌样品小于 1%临界值大于 5%临界值，为歧离值，其余结果均小于 5%临界值，判定为正确值。对费氏弧菌测试模式进行格拉布斯检验结果表明，剔除第 1 家实验室的生活污水 2 样品的结果后，第 1 家实验室的工业废水 1 样品小于 1%临界值大于 5%临界值，为歧离值，其余结果均小于 5%临界值，判定为正确值。对明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式和费氏弧菌测试模式进行双侧格拉布斯单侧检验结果表明，剔除第 1 家实验室明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式的海水样品、生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果以及费氏弧菌测试模式的生活污水 2 样品的结果后 7 家实验室 13 个样品的平均值均为正确值。

因此计算精密度最终结果时剔除了第 1 家实验室明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式的海水样品、生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果以及费氏弧菌测试模式的生活污水 2 样品的结果，保留了其它测试结果。

3) 精密度最终结果

剔除第 1 家实验室的海水样品、生活污水 2 样品和生活污水 3 样品的结果后明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式的精密度最终结果见附表 2-6，剔除第 1 家实验室的生活污水 2 样品的结

果后费氏弧菌测试模式的精密度最终结果见附表 2-7。

附表 2-6 明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式精密度结果 (%)

序号	样品类型	总平均值 (%)	实验室内相对标准偏差 (%)	实验室间相对标准偏差 (%)	重复性限 (%)	再现性限 (%)
1	0.5 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液	33.3	3.3~9.4	6.2	6.8	8.4
2	1.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液	69.3	0.63~6.7	3.0	8.9	9.9
3	2.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液	95.6	0.12~1.1	2.0	1.9	5.7
4	地表水 1	-22.5	1.3~3.7	2.7	9.3	12
5	地表水 2	30.5	3.3~15	13	9.1	13
6	地下水	-13.2	0.35~5.1	5.5	9.2	19
7	海水	0.731	1.5~2.9	1.5	6.4	7.1
8	生活污水 1	78.5	1.4~3.1	5.6	4.7	13
9	生活污水 2	55.6	1.5~4.1	4.3	4.8	7.8
10	生活污水 3	56.3	0.70~2.6	12	2.3	18
11	工业废水 1	81.8	1.1~4.9	5.3	7.0	14
12	工业废水 2	93.0	0.48~1.0	2.7	2.1	7.4

注：地表水 1、地下水和海水样品采用相对发光度结果计算实验室内相对标准偏差和实验室间相对标准偏差，其余结果均采用发光抑制率结果计算获得。

附表 2-7 费氏弧菌测试模式精密度结果 (%)

序号	样品类型	总平均值 (%)	实验室内相对标准偏差 (%)	实验室间相对标准偏差 (%)	重复性限 (%)	再现性限 (%)
1	0.5 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液	41.4	1.7~9.3	9.0	6.7	12
2	1.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液	67.8	1.2~5.0	2.9	8.0	9.1
3	2.0 mg/L (以 Zn ²⁺ 计) 硫酸锌溶液	92.9	0~1.9	3.7	3.1	10
4	地表水 1	-14.1	2.2~4.3	2.1	10	11
5	地表水 2	30.6	4.9~12	12	9.1	13
6	地下水	-14.7	0.93~4.4	3.1	9.6	13
7	海水	9.36	2.1~5.5	6.7	11	20
8	生活污水 1	77.4	0.71~1.9	4.6	4.7	11
9	生活污水 2	65.7	1.2~3.7	3.8	4.3	7.9
10	生活污水 3	35.4	5.4~7.0	7.4	6.3	9.3
11	工业废水 1	92.0	0.19~5.6	5.0	7.3	14
12	工业废水 2	81.0	0.98~3.8	5.0	5.2	12

注：地表水 1、地下水和海水样品采用相对发光度结果计算实验室内相对标准偏差和实验室间相对标准偏差，其余结果均采用发光抑制率结果计算获得。

4) 方法特性指标结果

(1) 方法的背景噪声：7 家实验室重复测试 6 次验证结果背景噪声均 < 300 C/s。

(2) 方法的有效性及敏感性：7 家实验室对阴性对照统一样品重复测定 6 次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率平均值为 -3.72%~2.47%，总平均值为 0.0114%，相对发光度实验室内相对标准偏差为 1.0%~3.3%，实验室间相对标准偏差为 2.3%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率平均值为 -2.80%~0.513%，总平均值为 -0.516%，相对发光度实验室内相对标准偏差为 1.6%~3.6%，实验室间相对标准偏差为 1.1%。阴性对照样测试数据均在 ±10% 内。

7 家实验室分别对阳性对照统一样品重复测定 6 次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率平均值为 93.8%~98.2%，总平均值为 95.6%，实验室内相对标准偏差为 0.12%~1.1%，实验室间相对标准偏差为 2.0%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率平均值为 89.7%~100%，总平均值为 92.9%，实验室内相对标准偏差为 0%~1.9%，实验室间相对标准偏差为

3.7%。阳性对照样测试数据均 $\geq 60\%$ ，相对标准偏差均 $\leq 10\%$ 。

(3) 方法的阳性对照：7家实验室分别对 Zn^{2+} 浓度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L (以 Zn^{2+} 计) 的硫酸锌溶液统一样品重复测定 6 次，明亮发光杆菌 T_3 小种测试模式下平均值分别为 33.3%、69.3%、95.6%；实验室间相对标准偏差分别为 6.2%、3.0%、2.0%；重复性限分别为 6.8%、8.9%、1.9%；再现性限分别为 8.4%、9.9%、5.7%；费氏弧菌测试模式下平均值分别为 41.4%、67.8%、92.9%；实验室间相对标准偏差分别为 9.0%、2.9%、3.7%；重复性限分别为 6.7%、8.0%、3.1%；再现性限分别为 12%、9.1%、10%。两种测试模式下 2.0 mg/L (以 Zn^{2+} 计) 的硫酸锌使用液阳性对照样测试数据均 $\geq 60\%$ ，相对标准偏差均 $\leq 10\%$ 。

(4) 方法的精密度：7家实验室分别对 Zn^{2+} 浓度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L (以 Zn^{2+} 计) 的硫酸锌使用液统一样品重复测定 6 次，明亮发光杆菌 T_3 小种测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为 3.3%~9.4%、0.63%~6.7%、0.12%~1.1%；实验室间相对标准偏差分别为 6.2%、3.0%、2.0%；重复性限分别为 6.8%、8.9%、1.9%；再现性限分别为 8.4%、9.9%、5.7%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为 1.7%~9.3%、1.2%~5.0%、0%~1.9%；实验室间相对标准偏差分别为 9.0%、2.9%、3.7%；重复性限分别为 6.7%、8.0%、3.1%；再现性限分别为 12%、9.1%、10%。

7家实验室分别地表水 1、地下水和海水统一样品重复测定 6 次，明亮发光杆菌 T_3 小种测试模式下相对发光度的实验室内相对标准偏差分别为 1.3%~3.7%、0.35%~5.1%、1.5%~2.9%；实验室间相对标准偏差分别为 2.7%、5.5%、1.5%；发光抑制率的重复性限分别为 9.3%、9.2%、6.4%；再现性限分别为 12%、19%、7.1%；费氏弧菌测试模式下相对发光度的实验室内相对标准偏差分别为 2.2%~4.3%、0.93%~4.4%、2.1%~5.5%；实验室间相对标准偏差分别为 2.1%、3.1%、6.7%；发光抑制率的重复性限分别为 10%、9.6%、11%；再现性限分别为 11%、13%、20%。

7家实验室分别对地表水 2、生活污水 1、生活污水 2、生活污水 3、工业废水 1 (稀释 5 倍)、工业废水 2 (稀释 125000 倍) 统一样品重复测定 6 次，明亮发光杆菌 T_3 小种测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为 3.3%~15%、1.4%~3.1%、1.5%~4.1%、0.70%~2.6%、1.1%~4.9%、0.48%~1.0%；实验室间相对标准偏差分别为 13%、5.6%、4.3%、12%、5.3%、2.7%；重复性限分别为 9.1%、4.7%、4.8%、2.3%、7.0%、2.1%；再现性限分别为 13%、13%、7.8%、18%、14%、7.4%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为 6.9%~12%、0.71%~1.9%、1.2%~3.7%、5.4%~7.0%、0.19%~5.6%、0.98%~3.81%；实验室间相对标准偏差分别为 12%、4.6%、3.8%、7.4%、5.0%、5.0%；重复性限分别为 9.1%、4.7%、4.3%、6.3%、7.3%、5.2%；再现性限分别为 13%、11%、7.9%、9.3%、14%、12%。

实际样品的相对发光度或发光抑制率的相对标准偏差均 $\leq 15\%$ 。

(4) 方法各项特性达到方法背景噪声、阴性对照、阳性对照和精密度的要求。

5) 验证实验室的方法质控指标结果

(1) 验证实验室的背景噪声：7家实验室重复测试 6 次验证结果为 0 C/s、6 C/s~9 C/s、0 C/s~1 C/s、0 C/s~79 C/s、14 C/s~96 C/s、0 C/s~92 C/s、0 C/s~76 C/s，背景噪声均 $<$

300 C/s。

(2) 验证实验室的有效性和敏感性：7家实验室对阴性对照统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下测试值为-4.87%~4.82%，相对发光度实验室内相对标准偏差为1.0%~3.3%；费氏弧菌测试模式下测试值为-4.71%~4.26%，相对发光度实验室内相对标准偏差为1.6%~3.6%。阴性对照样测试数据均在±5%内。

7家实验室分别对 Zn²⁺ 浓度为 2.0 mg/L 的硫酸锌使用液阳性对照统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率平均值为93.8%~98.2%，总平均值为95.6%，实验室内相对标准偏差为0.12%~1.1%，实验室间相对标准偏差为2.0%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率平均值为89.7%~100%，总平均值为92.9%，实验室内相对标准偏差为0%~1.9%，实验室间相对标准偏差为3.7%。两种测试模式下2.0 mg/L 的七水硫酸锌阳性对照样测试数据均≥60%，相对标准偏差均≤10%。

(3) 验证实验室的精密度：7家实验室分别对 Zn²⁺ 浓度为0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 的硫酸锌溶液统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下实验室内相对标准偏差分别为3.3%~9.4%、0.63%~6.7%、0.12%~1.1%；费氏弧菌测试模式下实验室内相对标准偏差分别为1.7%~9.3%、1.2%~5.0%、0%~1.9%。两种测试模式下2.0 mg/L 的七水硫酸锌阳性对照样相对标准偏差均≤10%。

7家实验室分别地表水1、地下水和海水统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下相对发光度的实验室内相对标准偏差分别为1.3%~3.7%、0.35%~5.1%、1.5%~2.9%；费氏弧菌测试模式下相对发光度的实验室内相对标准偏差分别为2.2%~4.3%、0.93%~4.4%、2.1%~5.5%。7家实验室分别对地表水（中毒）、生活污水1、生活污水2、生活污水3、工业废水1（稀释5倍）、工业废水2（稀释125000倍）统一样品重复测定6次，明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为3.3%~15%、1.4%~3.1%、1.5%~4.1%、0.70%~2.6%、1.1%~4.9%、0.48%~1.0%；费氏弧菌测试模式下发光抑制率的实验室内相对标准偏差分别为6.9%~12%、0.71%~1.9%、1.2%~3.7%、5.4%~7.0%、0.19%~5.6%、0.98%~3.81%。实际样品的相对发光度或发光抑制率的相对标准偏差均≤15%。

(5) 各验证实验室的背景噪声、阴性对照、阳性对照和精密度均达到方法质控要求。

6) 方法的普适性

本标准方法采用市场上主流的国产（力合 LFTOX-B2010、滨松 BHP9514、朗石 LumiFox 3000）和进口（Modern water Deltatox II、Checklight ToxScreen-III）共5台仪器对9个实际水样、阴性对照、3个浓度的硫酸锌溶液在2种测试模式下进行验证，结果证明本标准对市售仪器具有普适性。

7) 测试结果使用的可行性

本标准分别采用明亮发光杆菌 T₃ 小种测试模式与费氏弧菌测试模式对9个实际水样、阴性对照、3个浓度的硫酸锌溶液进行了方法验证，实验结果说明本标准中两种发光细菌可单独出具结果，亦可同时使用两种发光细菌对结果进行佐证。