

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ 1455—2026

水质 急性毒性的测定 斑马鱼法

Water quality—Determination of the acute toxicity
—Zebrafish (*Danio rerio*) method

本电子版为正式标准文件，由生态环境部环境标准研究所审校排版。

2026-01-20发布

2026-05-01实施

生态环境部 发布

目 次

前言 II

1 适用范围 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 方法原理 2

5 干扰和消除..... 2

6 试剂和材料..... 2

7 仪器和设备..... 3

8 样品采集、保存及处理..... 4

9 测试步骤 5

10 结果计算与表示..... 7

11 有效性、敏感性与精密度..... 8

12 质量保证和质量控制..... 8

13 测试报告..... 8

附录A（资料性附录） 斑马鱼全长测量..... 10

附录B（规范性附录） 稀释水水质参数及浓度限值 11

附录C（资料性附录） 重铬酸钾对斑马鱼的急性毒性测试 12

附录D（资料性附录） 寇氏（Karber）法计算LC₅₀示例 13

附录E（资料性附录） 废水对斑马鱼急性毒性的LID测定示例 16

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规范水质斑马鱼急性毒性的测定方法，制定本标准。

本标准规定了地表水、地下水、生活污水与工业废水对斑马鱼急性毒性的测定方法。

本标准的附录 A、附录 C～附录 E 为资料性附录，附录 B 为规范性附录。

本标准与《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》（GB/T 13267-91）相比，主要差异如下：

- 修改了方法名称；
- 修改了“适用范围”和“方法原理”；
- 增加了部分术语定义、样品采集、保存和前处理方法、水质生物毒性测定 LID 法、质量保证和质量控制；
- 完善了标准稀释水和其他稀释用水的要求；
- 完善了样品测定和结果表示等内容；
- 增加了附录 A～E。

自本标准实施之日起，原国家环境保护局 1991 年 9 月 14 日批准发布的《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》（GB/T 13267-91）在相应的国家生态环境标准实施中停止执行。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位为生态环境部南京环境科学研究所、中国环境科学研究院、南京大学。

本标准验证单位：中国环境监测总站、沈阳沈化院测试技术有限公司、中国科学院广东微生物研究所、浙江省生态环境监测中心、贵州健安德科技有限公司、江苏省常州环境监测中心。

本标准生态环境部 2026 年 1 月 20 日批准。

本标准自 2026 年 5 月 1 日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 急性毒性的测定 斑马鱼法

警告：测试中使用的重铬酸钾具有较高的毒性，测试操作时应佩戴防护器具，避免接触皮肤和衣物。

1 适用范围

本标准规定了测定水质急性毒性的斑马鱼法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水的鱼类（斑马鱼）急性毒性最低无效应稀释倍数（LID）和半数致死浓度（LC₅₀）的测定。

2 规范性引用文件

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

- GB/T 13580.3 大气降水电导率的测定方法
- GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制
- HJ 91.1 污水监测技术规范
- HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范
- HJ 164 地下水环境监测技术规范
- HJ 501 水质 总有机碳的测定 燃烧氧化—非分散红外吸收法
- HJ 506 水质 溶解氧的测定 电化学探头法
- HJ 828 水质 化学需氧量的测定 重铬酸盐法
- HJ 1147 水质 pH 值的测定 电极法
- HJ 1396 水质 水温的测定 传感器法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

试样 test solution

直接用于测定的样品或样品经稀释水稀释配成的可供测试的溶液。

3.2

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

在规定条件的测试周期内，不会导致受试生物产生抑制或死亡等可见不良效应的最低稀释倍数。

注：本标准 LID 为至少 90%受试生物存活的最低稀释倍数。

3.3

半致死浓度 median lethal concentration(LC₅₀)

在规定条件的测试周期内，导致 50%受试生物死亡的试样浓度。

注：本标准试样浓度指试样中样品的体积分数（%）。

3.4

静态法 static test

测试周期内，不更换试样的测试方式。

3.5

半静态法 semi-static renewal test

测试周期内，为保证一定的暴露浓度而有计划地定期更换试样的测试方式。

3.6

参比（毒）物 reference toxicants; reference materials

为判断测试系统有效性而使用的化学物质。可用于不同实验室之间，同一实验室内不同时间或不同人员之间测定结果的可比性评价。

注：本标准简称参比物，选用重铬酸钾为参比物。

4 方法原理

在规定的测试条件下，将受试生物（斑马鱼，*Danio rerio*）置于不同浓度的试样中，在 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下暴露 96 h，根据受试生物的存活数量或死亡数量计算 LID 值或 LC_{50} ，以表征样品的急性毒性。

5 干扰和消除

样品不做预处理，以测定其对受试生物的急性毒性。样品中大颗粒悬浮物可能堵塞鱼鳃，可通过静置消除悬浮颗粒物，静置时间（T）为 $1\text{ h} < T \leq 2\text{ h}$ 。

6 试剂和材料

6.1 受试生物

6.1.1 选择符合 GB/T 39649 种质鉴定要求的斑马鱼（*Danio rerio*），推荐使用 AB 系或 TU 系野生型斑马鱼，处于性成熟前期，体长 $1\text{ cm} \sim 2\text{ cm}$ 。

6.1.2 测试前，受试生物应至少在测试实验室饲养 9 d，其中前 2 d 适应期，后至少 7 d 驯养期，及时挑出生长不正常的鱼或死亡鱼。饲养/驯养用水要求见 6.2.14 或 6.2.15，饲养环境条件如下：

- a) 水温： $22^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ ；
- b) pH 值：6.0~8.5；
- c) 水质硬度：40 mg/L~250 mg/L（以 CaCO_3 计）；
- d) 光暗比：16 h:8 h~12 h:12 h；
- e) 光照强度：540 lx~1 000 lx；
- f) 溶解氧： $\geq 7.1\text{ mg/L}$ （溶解氧饱和度 $\geq 80\%$ ）；
- g) 喂食：每天饲喂 2 次丰年虫幼虫活体或无化学添加的颗粒饲料，投喂量以 5 min~10 min 吃完为宜，直到测试前 24 h。

6.1.3 测试前 7 d，观测并记录死亡率，并按下列标准处理：

- a) 7 d 内死亡率 $>10\%$ ，该批鱼不能使用；
- b) 7 d 内死亡率在 5%~10%之间，继续驯养 7 d；
- c) 7 d 内死亡率 $<5\%$ ，可用于测试。

6.1.4 测试前,随机抽取同一批次的 10 尾鱼测量湿重和体长(全长)。将抽取的每尾鱼用吸水纸吸干体表水分后,分别放入装有饲养水的预称重小烧杯中称量,通过差减法确定受试生物的体重及平均体重;利用游标卡尺(7.7)测量吻尖到尾鳍末端的直线长度,全长测量方法参见附录 A。

注:用于测量湿重和体长的鱼不纳入测试。

6.2 试剂

除非另有说明,测试时均使用符合国家标准和分析纯试剂。储备液配制用水为纯水(电导率 $\kappa \leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$)。

6.2.1 氢氧化钠(NaOH)。

6.2.2 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

6.2.3 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。

6.2.4 碳酸氢钠(NaHCO_3)。

6.2.5 氯化钾(KCl)。

6.2.6 重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)。

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

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

量取 8.3 mL 盐酸(6.2.7),用水定容至 100 mL。

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

称取 4 g 氢氧化钠(6.2.1),溶于少量水中,用水定容至 100 mL。

6.2.10 氯化钙储备液: $\rho(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=11.76 \text{ g/L}$ 。

称取 11.76 g 氯化钙(6.2.2),溶于少量水中,用水定容至 1 000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

6.2.11 硫酸镁储备液: $\rho(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})=4.93 \text{ g/L}$ 。

称取 4.93 g 硫酸镁(6.2.3),溶于少量水中,用水定容至 1 000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

6.2.12 碳酸氢钠储备液: $\rho(\text{NaHCO}_3)=2.59 \text{ g/L}$ 。

称取 2.59 g 碳酸氢钠(6.2.4),溶于少量水中,用水定容至 1 000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

6.2.13 氯化钾储备液: $\rho(\text{KCl})=0.23 \text{ g/L}$ 。

称取 0.23 g 氯化钾(6.2.5),溶于少量水中,用水定容至 1 000 mL。室温条件下可保存 6 个月。

6.2.14 标准稀释水

a) 以 1 L 计,将氯化钙储备液(6.2.10)、硫酸镁储备液(6.2.11)、碳酸氢钠储备液(6.2.12)和氯化钾储备液(6.2.13)四种储备液各 25 mL 混合,用水定容至 1 000 mL。

b) 新配制的稀释水曝气至溶解氧浓度不低于 7.71 mg/L(溶解氧饱和度不低于 90%),必要时,用氢氧化钠溶液(6.2.9)或盐酸溶液(6.2.8)调节 pH 值, pH 值应保持在 7.8 ± 0.2 范围内,临用现配。

6.2.15 其他稀释水

在驯养和测试过程中鱼类没有表现出胁迫迹象的水也可作为稀释水,如脱氯过滤的自来水。稀释水的 pH 值应在 6.0~8.5 之间,水质硬度在 40 mg/L~250 mg/L(以 CaCO_3 计)之间。应对稀释水中的污染物进行检测,污染物限量要求见附录 B。

6.2.16 高纯空气:纯度 $\geq 99.999\%$ 。

7 仪器和设备

7.1 采水器:不锈钢材质。

7.2 筛网:不锈钢材质,孔径 2 mm~4 mm(10 目~5 目)。

- 7.3 混合缸：不锈钢或聚乙烯（或聚丙烯、聚四氟乙烯）材质，容积 ≥ 10 L。
- 7.4 采样瓶：聚乙烯（或聚丙烯、聚四氟乙烯）塑料瓶/袋，容积 ≥ 2 L。
- 7.5 冷藏箱：可移动，具有 6℃及以下冷藏功能。
- 7.6 冰箱或冷库：具有 6℃及以下冷藏功能和-18℃及以下冷冻功能。
- 7.7 游标卡尺：测量范围 0 mm~150 mm，最小分度为 0.1 mm。
- 7.8 温度计：测量范围 0℃~40℃，最小分度为 0.1℃。
- 7.9 pH 计：测量范围 0~14，最小分度为 0.01 pH 单位。
- 7.10 硬度计：测量范围 50 mg/L~500 mg/L（以 CaCO_3 计），最小分度为 1 mg/L。
- 7.11 便携式溶解氧测定仪：测量范围 0 mg/L~20 mg/L，最小分度为 0.1 mg/L。
- 7.12 电导率测定仪：测量范围 0 mS/cm~200 mS/cm，最小分度为 1 $\mu\text{S/cm}$ 。
- 7.13 恒温水浴槽或恒温光照培养箱：温控范围 15℃~30℃，温度控制偏差 $\leq 0.5^\circ\text{C}$ 。
- 7.14 照度计：测量范围 200 lx~2 000 lx，最小分度为 1 lx。
- 7.15 测试容器：玻璃容器（如玻璃烧杯），1 L~5 L；若样品有异味或疑似具有挥发性污染物时，应采用加盖的玻璃容器。
- 7.16 计泡器。
- 7.17 总有机碳（TOC）分析仪。
- 7.18 实验室常用玻璃器皿：移液管、烧杯、容量瓶、量筒等。

8 样品采集、保存及处理

8.1 样品的采集

- 8.1.1 地表水、地下水、生活污水和工业废水样品的采样频次、采样时间以及采样位置分别按照 HJ 91.2、HJ 164 以及 HJ 91.1 相关规定执行。其中，地表水和地下水一般采集瞬时样品。生活污水和工业废水根据水质的稳定性，采集瞬时样品或者混合样品。采集的样品混合前应及时于 6℃及以下避光保存。
- 8.1.2 用采水器（7.1）采集样品后，若样品中有较大的悬浮物或漂浮物，可使用孔径 2 mm~4 mm（10 目~5 目）的筛网（7.2）去除。宜采集不少于 10 L 的样品，样品置于混合缸（7.3）中充分混合均匀后，将样品沿采样瓶（7.4）内壁缓慢倒入，注意避免冲击产生气泡；样品应在采样瓶中过量溢出，形成凸面，拧紧瓶盖，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。
- 8.1.3 宜在采样时测定 pH、溶解氧、电导率等水质参数，pH、溶解氧、电导率测定分别按照 HJ 1147、HJ 506、GB/T 13580.3 方法执行。

8.2 样品的运输与保存

- 8.2.1 样品采集后，应立即置于冷藏箱（7.5）中，在 6℃及以下冷藏避光运输和保存，并在 24 h 以内开展测试；若不能在 24 h 内进行测试，样品应于 16 h 内运送回实验室并立即置于冰箱或冷库（7.6）中，在-18℃及以下冷冻保存，保存前将样品充分混匀，分装成 1 L~2 L 样品，保存期不超过 60 d。
- 8.2.2 样品到实验室后，混合均匀，采用 TOC 分析仪（7.17）按照 HJ 501 方法测定 TOC 或按照 HJ 828 方法测定化学需氧量（COD），以便后续质量控制，判断水质是否发生变化。

8.3 样品预处理

8.3.1 温度

冷冻保存的样品应在 $\leq 24^\circ\text{C}$ 条件下水浴解冻。测试开始前，将样品放置于 22℃~24℃条件下，按

照 HJ 1396 方法测定样品温度，待温度达到 22℃~24℃后用于测试。

8.3.2 pH 值

8.3.2.1 通常不调节样品 pH 值。

8.3.2.2 若需排除 pH 的影响，当样品的 pH>8.5 或<6.0 时，可使用盐酸溶液（6.2.8）或氢氧化钠溶液（6.2.9）调节样品 pH 值至 7.0，酸碱调节溶液的使用量应≤样品体积的 5%，以降低对样品浓度的影响。

8.3.3 溶解氧

8.3.3.1 通常不调节样品溶解氧浓度。

8.3.3.2 若需排除溶解氧的影响，当样品的溶解氧浓度<4 mg/L 时，可采用曝气的方式充氧≤20 min，使样品溶解氧含量小于饱和溶解氧。如果样品含有挥发性污染物，宜采用 9.1.4 方式充氧。

9 测试步骤

9.1 测试条件

9.1.1 光照

光照强度应在 540 lx~1 000 lx 之间，光照周期光暗比为 16 h:8 h~12 h:12 h 之间。

9.1.2 温度

测试过程中试样温度应保持在 23℃±1℃之间。

9.1.3 pH 值

测试过程中不调节 pH。排除 pH 影响的急性毒性，试样 pH 值应在 6.0~8.5 之间。

9.1.4 溶解氧

排除溶解氧对毒性结果的影响，测试过程中溶解氧浓度宜≥4 mg/L（溶解氧饱和度≥46.7%）。可采用高纯空气（6.2.16）适度充氧，以计泡器（7.16）计的充氧速度≤100 个泡/min，以维持测试所需的溶解氧浓度，并确保其对试样中挥发性污染物的影响降至最低。

9.1.5 生物承载量

单位水体生物承载量≤0.8 g/L（以湿重计，如鱼的平均体重为 0.08 g，则每 1 L 试样中不超过 10 尾鱼）。

9.1.6 饲喂

测试过程中不投喂饵料。

9.1.7 试样的稳定性

9.1.7.1 测定 96 h LC₅₀ 时，测试周期内试样的 COD 或 TOC 变化≤20%，可采用不换水的静态法测试。否则，应采用半静态法测试。

9.1.7.2 采用半静态法测试时，换水周期（一般以 h 计）应根据试样维持稳定（9.1.7.1）的最长时间确定。换水方法如下：

- a) 实验开始时，将新配制的试样加入第一组容器，试样体积满足生物承载量（9.1.5）要求。
- b) 换水时，先将重新配制的试样加入第二组容器（浓度、体积及编号与第一组容器相同），然后用捞网小心地将第一组容器中的受试生物转移至对应编号的第二组容器。
- c) 单次换水时全部容器的转移操作总时长不超过 10 min，移除受试生物的容器及时清洗用于后续换水周期。

9.2 LID 测试

采用稀释法，将两个等比级数（稀释倍数 $D=2、4、8、16、32$ 等，以及 $D=1.5、3、6、12、24$ 等）组合在一起。取一定量的样品加入稀释水（6.2.14 或 6.2.15），得到不同浓度的试样，至少设 5 个连续浓度，每个浓度投放 10 尾受试生物。测试条件见 9.1，测试周期为 96 h，不设平行。样品的稀释系列参照表 1。

表 1 样品的稀释系列（以 1 L 试样计）

稀释倍数 D	$V_{\text{样品}}/V_{\text{试样}}(\%)$	试样的组成 (mL)	
		样品	稀释水
空白	0	—	1 000
1	100	1 000	—
1.5	66.7	667	333
2	50.0	500	500
3	33.3	333	667
4	25.0	250	750
6	16.7	167	833
8	12.5	125	875
12	8.3	83	917
16	6.2	62	938
24	4.2	42	958
32	3.1	31	969
.....

9.3 LC₅₀ 测试

9.3.1 预试验

- 9.3.1.1 宜通过静态法预试验确定正式试验的浓度范围。以逐级稀释倍数 ($D=10$)，配制至少 3 个连续浓度的试样，每一浓度投放 5 尾受试生物，不设平行，测试条件见 9.1，测试周期为 96 h，以确定受试生物死亡率 100%（或最大死亡率）~0%所对应的试样浓度范围（体积分数）。
- 9.3.1.2 同时设置一个不加受试生物的最高试样浓度的平行处理，分别于 0 h、24 h、48 h 以及 96 h 测定 COD 或 TOC，以确定试样稳定性。如果 96 h 内 COD 或 TOC 的变化 $\leq 20\%$ ，则正式试验或限度试验采用不换水的静态法。否则，宜采用半静态法。
- 9.3.1.3 若测试结束时原水样受试生物死亡率 $\leq 40\%$ ，则开展限度试验。若测试结束时原水样受试生物死亡率 $>40\%$ ，应开展正式试验。

9.3.2 限度试验

以样品开展测试，投放 10 尾受试生物，不设平行，测试条件见 9.1，测试周期为 96 h。若测试结束时受试生物死亡率 $\leq 40\%$ ，测试终止。若测试期间观测到受试生物死亡率 $>40\%$ ，应进一步开展正

式试验。

9.3.3 正式试验

根据预试验结果确定的受试生物死亡率 100% (或最大死亡率) ~ 0% 对应的试样浓度范围, 在此范围内按一定逐级稀释倍数 (一般 ≤ 2) 稀释, 应至少选择 5 个等比系列浓度的试样进行正式试验。系列浓度中, 宜包括受试生物死亡率 $\leq 37\%$ 和 $\geq 63\%$ 的 2 个浓度组。正式试验每个浓度组投放 10 尾受试生物, 不设平行, 测试条件见 9.1, 测试周期为 96 h。

9.4 对照试验

9.4.1 空白试验 (阴性对照)

- a) 空白试验以稀释水 (6.2.14 或 6.2.15) 为试样开展。
- b) LID 法以及 LC_{50} 法均应同步开展空白试验。
- c) 空白试验不设平行, 投放的受试生物数量与试样组一致。

9.4.2 参比物试验 (阳性对照)

采用重铬酸钾 (6.2.6) 为参比物, 每批次受试生物应至少开展一次参比物试验, 以确认受试生物敏感性。试验方法参见附录 C。

9.5 观测和记录

9.5.1 试验条件测定和记录

- 9.5.1.1 测试开始 0 h 及 96 h, 用照度计 (7.14) 测定并记录测试容器 (7.15) 液面相同高度的光照强度。
- 9.5.1.2 测试开始 0 h、24 h、48 h、72 h 及 96 h, 用温度计 (7.8)、pH 计 (7.9) 和便携式溶解氧测定仪 (7.11) 测量并记录空白试验组和各浓度组的温度、pH 值和溶解氧浓度。对于半静态测试, 应在换水前后分别测定试样的水质参数。

9.5.2 受试生物观测和记录

- 9.5.2.1 测试开始 0 h、24 h、48 h、72 h 及 96 h, 观测并记录每个容器中受试生物的死亡情况和中毒症状 (如侧翻、浮在水面、异常打转或盘旋等), 出现死亡受试生物时应及时清理。
- 9.5.2.2 对于高色度废水样品难以观察时, 可增加观测背景亮度 (如将测试容器置于灯箱上), 或将试样转入开口大、液面浅的容器中进行观察。
- 9.5.2.3 测试结束时, 将存活受试生物置于冰水混合物 (冰的体积不少于 50%) 或 0.2% MS-222 (三卡因甲磺酸盐) 缓冲液中 30 min 以上进行安乐死处理。

10 结果计算与表示

10.1 LID 的确定

至少有 90% 受试生物正常存活时的最低稀释倍数, 即为最低无效应稀释倍数 LID。LID 的确定示例参见附录 E。

10.2 LC₅₀ 的估算

10.2.1 LC₅₀ 可参照附录 D 方法计算,也可采用概率单位法、直线内插法等其他方法计算,结果保留至小数点后 1 位。

10.2.2 符合以下情况时,应报告最大死亡率对应的最低浓度和无死亡的最高浓度(以稀释百分比浓度表示)。

- a) 限度试验不需要计算 LC₅₀;
- b) 正式试验数据不充分时,无法计算 LC₅₀。

11 有效性、敏感性与精密度

11.1 有效性与敏感性

11.1.1 6 家实验室分别测定空白试验,重复 6 次,死亡率均为 0%,满足 ≤10% 的要求。

11.1.2 6 家实验室分别测定参比物重铬酸钾的鱼类急性毒性,24 h LC₅₀ 测试结果在 250 mg/L~304 mg/L 之间,均在 200 mg/L~400 mg/L 范围内,符合质控要求。

11.2 精密度

11.2.1 6 家实验室分别对生活污水、地表水、地下水,进行了斑马鱼急性毒性的测定,每个样品测定 6 次。LID 均为 1,96 h LC₅₀ 均大于 100%。各浓度组斑马鱼存活率实验室内相对标准偏差分别为 0.0%、0.0%、0.0%,实验室间相对标准偏差分别为 0.0%、0.0%、0.0%。

11.2.2 6 家实验室对工业废水(农药废水)进行了斑马鱼急性毒性的测定,分别测定 6 次。LID 值为 3~4,96 h LC₅₀ 为 41.2%~61.1%。当稀释倍数(D)为 1、2、3、4、5 时,各浓度组斑马鱼存活率实验室内相对标准偏差分别为 0.0%、10.8%~15.5%、5.57%~9.57%、0.0%、0.0%,实验室间相对标准偏差分别为 0.0%、8.95%、6.36%、0%、0%。

11.2.3 6 家实验室对加标浓度分别为 200 mg/L、800 mg/L 以及 3 200 mg/L 的重铬酸钾溶液,作为模拟样品分别进行了 6 次 96 h 最低无效应稀释倍数 LID 的测定,LID 值分别为 2~3、8~10、32~48,实验室内相对标准偏差为 0%~18.8%、0%~9.79%、0%~22.1%,实验室间相对标准偏差为 4.37%、1.64% 和 6.44%。

12 质量保证和质量控制

12.1 空白试验和参比物试验结果及测试条件应符合 12.2 和 12.3 要求,结果方为有效。否则,应查明原因后重新进行测试。

12.2 测试结束时,空白试验组受试生物死亡率 ≤10%。

12.3 在相同的测试条件下,参比物重铬酸钾的 24 h LC₅₀ 应在 200 mg/L~400 mg/L 范围内,每批次受试生物应至少开展一次参比物试验。

13 测试报告

13.1 测试报告应至少包括 13.2~13.8 的内容。

13.2 样品的类型、来源、采样点位示意图、主要污染物组分(适用时)、保存方法及保存时间。

13.3 测试前样品的 pH 值、溶解氧浓度及静置条件、调 pH 等前处理方法。

- 13.4 受试生物的名称、来源、品系、龄期、体长（体重）及驯养情况；标准稀释水或其他稀释水的 pH 值和硬度。
- 13.5 测试条件，包括使用的稀释水、光照强度、pH 值、温度、溶解氧、生物承载量、换水周期等信息。
- 13.6 质量保证和质量控制要求的符合性。
- 13.7 测试结果 LID 或 96 h LC₅₀ 及其计算方法，95%置信区间（如有）等。
- 13.8 测试期间受试生物的任何异常行为，如侧翻、浮在水面、异常打转或盘旋等。

附 录 A
(资料性附录)
斑马鱼全长测量

鱼体全长指从吻尖到尾鳍的直线长度，见图A.1。用游标卡尺（7.7）测量。

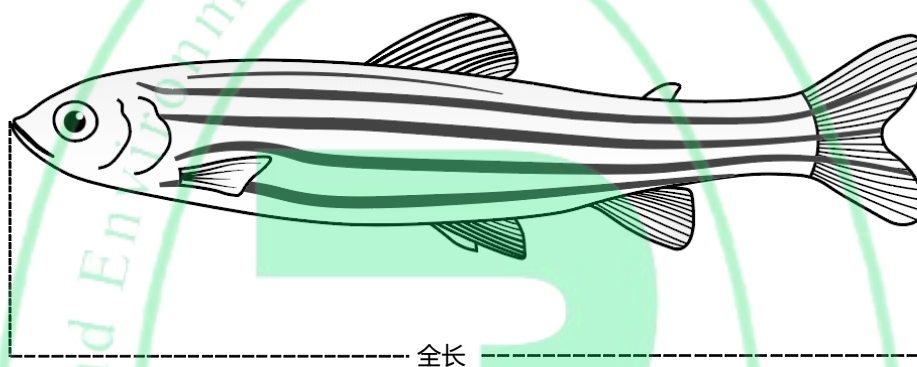


图 A.1 鱼体全长示意图

附 录 B
(规范性附录)
稀释水水质参数及浓度限值

稀释水的水质参数及浓度限值见表 B.1。

表 B.1 稀释水水质参数及浓度限值

序号	参数指标	浓度限值
1	颗粒物	5 mg/L
2	总有机碳 (TOC)	2 mg/L
3	非离子态氨 (NH ₃)	1 mg/L
4	硝酸盐 (NO ₃ ⁻)	8.85 mg/L
5	余氯	10 µg/L
6	总有机磷	50 ng/L
7	总有机氯和多氯联苯	50 ng/L
8	砷 (As)	1 µg/L
9	铬 (Cr)	1 µg/L
10	钴 (Co)	1 µg/L
11	铜 (Cu)	1 µg/L
12	铁 (Fe)	1 µg/L
13	铅 (Pb)	1 µg/L
14	镍 (Ni)	1 µg/L
15	锌 (Zn)	1 µg/L
16	镉 (Cd)	100 ng/L
17	汞 (Hg)	100 ng/L
18	银 (Ag)	100 ng/L
19	化学需氧量 (COD)	5 mg/L

附录 C

(资料性附录)

重铬酸钾对斑马鱼的急性毒性测试

C.1 目的

用于验证受试生物(斑马鱼)的敏感性和测试条件的可靠性。从每批次购买的受试生物或每批次实验室自行繁殖的受试生物随机抽取一定数量的斑马鱼,暴露于含不同浓度的重铬酸钾溶液中,以 24 h 为测试周期,观测并记录受试生物的死亡率,以确定受试生物死亡 50%时的参比物浓度,即半致死浓度,以 24 h LC₅₀ 表示。

C.2 试剂

重铬酸钾 (K₂Cr₂O₇), 分析纯及以上。

C.3 测试方法

C.3.1 试样制备

称取适量重铬酸钾(6.2.6)直接加入稀释水(6.2.14 或 6.2.15)中,机械搅拌 10 min,配制得到 0.1 g/L~1 g/L 的重铬酸钾储备液。不同浓度的试样溶液以稀释水稀释重铬酸钾储备液得到。

C.3.2 测试条件

表 C.1 主要测试条件参数

参数	参数设定值或范围
受试生物	斑马鱼, 体长 1 cm~2 cm
光照周期	光暗比为 16 h:8 h~12 h:12 h
照度	540 lx~1 000 lx
pH 值	6.0~8.5
温度	23℃±1℃
溶解氧	≥4 mg/L (溶解氧饱和度≥46.7%)
饲喂	不饲喂
试样浓度	0 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、225 mg/L、338 mg/L、506 mg/L
正式试验	采用静态法, 每个浓度组与空白试验组各 10 尾鱼, 不设平行
单位水体生物承载量	≤0.8 g/L (以湿重计)
测试周期	24 h

C.4 有效性标准

按照附录 D 推荐的 LC₅₀ 计算方法, 得到参比物重铬酸钾的 24 h LC₅₀ 值在 200 mg/L~400 mg/L 之间, 说明该批次受试生物的敏感性和测试条件的可靠性符合要求。

附录 D

(资料性附录)

寇氏 (Karber) 法计算 LC_{50} 示例

以下为寇氏 (Karber) 法计算废水鱼类急性半致死浓度 LC_{50} 的计算示例。

D.1 LC_{50} 计算

寇氏 (Karber) 法计算 LC_{50} 应满足下列条件:

- a) 每个浓度组的受试生物数量应相同;
- b) 各浓度组试样浓度按等比级数分组;
- c) 最高浓度组的死亡率宜为100%或与之接近, 最低浓度组的死亡率应为0%或与之接近。

各浓度组受试生物死亡率按照公式 (D.1) 计算:

$$R_{mi} = \frac{n_{mi}}{n} \quad (D.1)$$

式中: R_{mi} ——第 i 浓度组的受试生物死亡率;

n_{mi} ——第 i 浓度组受试生物死亡数量;

n ——每个浓度组受试生物的数量。

$\log LC_{50}$ 按照公式 (D.2) 计算:

$$\log LC_{50} = \log \varphi_m - \log q \times \left(\sum_{i=0}^j R_{mi} - 0.5 \right) \quad (D.2)$$

式中: LC_{50} ——半数致死浓度 (以体积分数表示), %;

φ_m ——100%致死率的最低浓度 (以体积分数表示), %;

q ——逐级稀释倍数 (等比数列的公比);

j ——从 0 致死率最高浓度到 100%致死率最低浓度, 试样浓度组数量;

R_{mi} ——第 i 浓度组死亡率;

0.5——50%的死亡率。

LC_{50} 按照公式 (D.3) 计算:

$$LC_{50} = 10^{\log LC_{50}} \quad (D.3)$$

式中: LC_{50} ——半数致死浓度 (以体积分数表示), %;

10——指数函数的底数。

$\log LC_{50}$ 标准误差按照公式 (D.4) 计算:

$$SE_{\log LC_{50}} = \frac{\log q}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^j (n_{mi} \times (n - n_{mi})) / (n - 1)} \quad (D.4)$$

式中: $SE_{\log LC_{50}}$ —— $\log LC_{50}$ 的标准误差;

q ——逐级稀释倍数 (等比数列的公比);

n_{mi} ——第 i 浓度组受试生物死亡数量;

n ——每个浓度组受试生物的数量。

95%置信区间 (95% CI) 按照公式 (D.5) 计算:

$$95\%CI = 10^{(\log LC_{50} \pm 1.96 \times SE_{\log LC_{50}})} \quad (D.5)$$

式中：95%CI ——95%置信区间；

10 ——指数函数的底数；

LC_{50} ——半数致死浓度，%；

1.96 ——标准正态分布（双侧分布）97.5%分位点的近似值，也称作标准正态偏差或 Z 分数；

$SE_{\log LC_{50}}$ —— $\log LC_{50}$ 估计的标准误差。

D.2 LC_{50} 计算示例

某工业废水对斑马鱼 96 h 急性毒性测试数据如表 D.1 所示，求 96 h LC_{50} 及 95%CI。

表 D.1 某工业废水对斑马鱼 96 h 急性毒性测试结果

序号	浓度 (%)	各组受试生物死亡数 n_{mi}	各组受试生物存活数 $n - n_{mi}$	$n_{mi} \times (n - n_{mi})$	各组的死亡率 R_{mi}
1	0 (CK)	0	10	0	0
2	6.25	1	9	9	0.10
3	12.5	2	8	16	0.20
4	25.0	4	6	24	0.40
5	50.0	7	3	21	0.70
6	100	10	0	0	1.00
Σ		24		70	2.4

以表 D.1 中的数据为例，导致受试生物 100%致死的最低浓度（体积分数）为 100%，则 $\log \varphi_m = \log 100 = 2$ 。

样品的逐级稀释倍数 q 为 2，则 $\log q = \log 2 = 0.301$ 。

累计致死率 ΣR_{mi} 为 2.4。

$\Sigma [n_{mi} \times (n - n_{mi})]$ 为 70。

$\log LC_{50}$ 值计算如下：

$$\log LC_{50} = \log \varphi_m - \log q \times \left(\sum_{i=0}^j R_{mi} - 0.5 \right) = 2 - 0.301 \times (2.4 - 0.5) = 1.428$$

LC_{50} 计算如下：

$$LC_{50} = 10^{\log LC_{50}} = 10^{1.428} = 26.8 \quad (\%)$$

LC_{50} 的标准误差计算如下：

$$SE_{\log LC_{50}} = \frac{\log q}{n} \times \sqrt{\sum_{i=1}^j (n_{mi} \times (n - n_{mi})) / (n - 1)} = \frac{0.301}{10} \times \sqrt{70 / 9} = 0.0839$$

LC_{50} 标准误差的 1.96 倍为：

$$1.96 \times SE_{\log LC_{50}} = 1.96 \times 0.0839 = 0.164$$

则 95%置信区间为：

$$95\%CI = 10^{(\log LC_{50} \pm 1.96 \times SE_{\log LC_{50}})}$$

$$95\%CI \text{ 下限} = 10^{(1.428 - 0.164)} = 10^{1.264} = 18.4 \quad (\%)$$

$$95\%CI \text{ 上限} = 10^{(1.428 + 0.164)} = 10^{1.592} = 39.1 \quad (\%)$$

则 LC_{50} 的 95%CI 为 18.4%~39.1%。



附 录 E
(资料性附录)
废水对斑马鱼急性毒性的 LID 测定示例

当用逐级稀释的方法检测废水时，最低无效应稀释倍数（LID）为受试生物存活率≥90%时样品的最低稀释倍数（D）。

以表 E.1 的测试结果为例，稀释倍数为 16 时，受试生物存活率为 100%，稀释倍数为 8 时，受试生物存活率为 80%，即 LID = 16。

表 E.1 LID 测试结果

稀释倍数 (D)	受试生物数量 (存活数量, 尾)	存活率 (%)
1	10 (0)	0
2	10 (2)	20
4	10 (5)	50
8	10 (8)	80
16	10 (10)	100