

《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》

编制说明

(征求意见稿)

国家环境保护总局南京环境科学研究所

2008年03月

目 次

1. 任务来源及工作过程	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 工作过程.....	1
2. 修订本标准的必要性及法律依据	2
2.1 必要性及目的意义.....	2
2.2 修订本标准的法律依据.....	3
3. 标准修订的原则与技术路线	3
3.1 标准修订的原则.....	3
3.2 技术路线.....	5
4. 标准适用范围	5
4.1 试验方法选择.....	5
4.2 试验用鱼选择.....	6
5. 标准的主要内容说明.....	6
5.1 方法原理.....	6
5.2 试剂和材料.....	6
5.3 仪器设备.....	7
5.4 干扰及消除.....	8
5.5 样品.....	8
5.6 试验步骤.....	9
5.7 结果计算.....	10
6. 参考文献.....	10

1. 任务来源及工作过程

1.1 任务来源

本标准由2006年国家质检总局（国质检财函[2007]971号）和2007年国家质检总局（国质检财函[2007]9909号）和国家环保总局2006年（环办函（2006）371号）下达编制任务，由国家环境保护总局南京环境科学研究所负责起草，项目编号为992号。本标准是在已颁布的GB/T 13267-91《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》文本基础上修订的。

1.2 工作过程

国家环境保护总局南京环境科学研究所为本标准的修订单位，根据标准修订要求成立了标准编制组，主要成员如下：

表 1 编制组主要成员名单

姓名	职称	专业	备注
周军英	研究员	环境生物	项目负责人，制定方案
韩志华	助研	环境毒理	主要人员，组织实施、执笔人
单正军	研究员	环境毒理	主要人员，审定
石利利	研究员	环境化学	主要人员，审定
卜元卿	助研	环境毒理	主要人员，具体实施
其他	略		参加人

1.2.1 标准开题论证

标准修订任务下达后，国家环境保护总局南京环境科学研究所即投入了前期的调研工作，并于2007年2月12~13日在南京召开了《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》标准修订开题论证会。会议邀请了浙江大学、南京大学、沈阳化工研究院等与标准制订有关的各方面专家5人，专家组认真听取了承担单位的汇报，详细审阅了承担单位提交的开题报告材料，经过充分讨论，提出了专家组意见。专家组肯定了标准编制原则、技术路线并提出了专家组修改意见，标准修订组根据专家意见对方案进行了修改和补充。

1.2.2 标准修订

(1) 方法调研

开题论证之后，广泛展开了鱼类急性毒性测定方法调研。通过对国内各相关实验室实地调研及国外相关试验方法文献调研，了解了国内外鱼类急性毒性测定方法的具体情况，并对调研情况进行了汇总，比较分析了国内外方法的优缺点。尤其针对实验生物的选择上，根据我国具体鱼种资源情况进行了详细的分析，提出了适合我国国情的试验鱼种。

(2) 方法确认

在进行方法调研的基础上，进一步明确了本标准的具体试验方法，以现行ISO7346标准为基本方法依据，参考OECD，USEPA测定方法，结合我国实际，并针对原有标准的不足，在新修订的标准中提出了限度试验的要求，对超过限度试验浓度的物质不再进行下一步的试验。新增了质量控制标准，对试验方法的质量要求做出具体规定，提高了试验的准确度和可靠性。对静水式法、换水式法、流水式法的具体适用范围做出了明确规定，提高了方法的实用性。新增了青鳉鱼及孔雀鱼为试验生物，并对试验生物提出了具体的要求，附录部分新增了青鳉鱼及孔雀鱼的驯养繁殖条件，为试验生物的选择及驯养提供了基本的参考资料。

(3) 形成征求意见稿

在综合考虑了国外相关标准的发展现状并广泛参阅国内外现有标准和有关资料后，结合我国相关试验方法发展情况，根据调研结果，充分考虑各方法的优缺点，在原有标准基础上对试验方法进行了修订，并于2007年6月形成了标准征求意见稿初稿。

2. 修订本标准的必要性及法律依据

2.1 必要性及目的意义

水环境中存在着大量的水生生物群落，各类水生生物之间及水生生物与其赖以生存的环境之间存在着互相依存又互相制约的密切关系。当水体受到污染而使水环境条件改变时，各种不同的水生生物由于对环境的要求和适应能力不同而产

生不同的反应，因此可利用水生生物来了解和判断水体污染的类型、程度。用水生生物来监测研究水体污染状况的方法较多，如生物群落法、残毒测定法、急性毒性试验、细菌学检验等。其中以鱼类急性毒性试验应用较广泛。鱼类对水环境的变化反应十分灵敏，当水体中的污染物达到一定浓度或强度时就会引起一系列的中毒反应。根据试验水所含毒物浓度的高低和暴露时间的长短，毒性试验可分为急性试验和慢性试验。急性试验是一种受试鱼种在短时间内显示中毒反应或死亡的毒性试验。其目的是在短时间内获得毒物或废水对鱼类的致死浓度范围，为进一步进行试验研究提供必要的资料。慢性试验是指在实验室中进行的低毒物浓度、长时间的毒性试验，以观察毒物与生物反应之间的关系，验证急性毒性试验结果，估算安全浓度或最大容许浓度。慢性试验更接近于自然环境的真实情况。

水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法的修订为我国水质安全提供了科学的检测方法依据。规范了不同实验室，不同监测部门之间的鱼类急性毒性测定方法，提高了实验数据互认程度。对保护生态环境，尤其是水生生态环境，减少污染物危害具有十分重要的意义。

2.2 修订本标准的法律依据

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》、《国务院关于落实科学发展观 加强环境保护的决定》等法律法规，保护环境，防治污染，促进水质监测技术及污染治理技术的进步，根据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（国家环境保护总局公告 2006 年第 41 号）等文件的有关规定，制定本标准。

3. 标准修订的原则与技术路线

3.1 标准修订的原则

水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法标准的修订遵循以下原则：

(1) 试验生物的选择符合中国国情

受试鱼种的选择是水生生物急性毒性测定方法中首先要考虑的问题。我国地域辽阔，鱼种资源丰富，但真正可以标准化的用于毒性试验的鱼种并不多。国内专门研究试验鱼种的单位较少，试验鱼种标准化程度较低，为了与国际接轨，同

时结合我国实际国情，考虑到各试验承担单位的具体接受能力，及试验生物的易得性、驯养难易程度等，特确定斑马鱼这一国际标准鱼种为试验用鱼，同时将青鳉鱼、孔雀鱼也列为试验鱼种供选择。这三种试验用鱼在我国绝大部分地区都易获得，且实验室较易驯养，为开展相关试验提供了可靠的物质基础。

(2) 受试物基础数据资料的完整性

旧标准对受试物的基础数据资料未作出明确具体的要求，在受试物物理化学性质不明确的情况下如何选择具体的试验方法就存在一定的盲目性，缺乏理论依据，新修订的标准新增了包括结构式、纯度、水溶解度、蒸气压、水解半衰期、光解半衰期等资料要求。根据提供的资料可以了解受试物的基本理化性质，从而判断该受试物该采用静水式法、换水式法还是流水式法进行试验。

(3) 试验方法设置的合理性

根据受试物的性质确定了三种急性毒性试验方法，静水式法适用于测定化学性质比较稳定的物质。换水式法适用于试验浓度在更换试验药液的时间内保持相对稳定的物质(即在理论浓度值的 20%之内波动)。流水式法可用于大多数物质，包括水中不稳定的物质。

(4) 增加限度试验

旧标准未对限度试验作出要求，新修订的标准增加了限度试验，即在进行预试验和正式试验前先进行限度试验，以受试物的最大水溶解度为限度试验浓度（当该物质的最大水溶解度大于 100mg/L 时，以 100mg/L 为试验浓度进行试验），试验结束时如果受试鱼没有死亡，就不再进行下一步试验。从而优化了对部门毒性较低物质的测定过程，节约了社会成本，为企业赢得了时间和效益。

(5) 参考国内外同类标准

在标准的制订过程中，对国内外相关标准进行分析研究。充分吸收国外先进标准的合理成分，结合我国实际国情，在我国原有标准的基础上补充完善相关试验方法，使新修订的标准既充分考虑国际接轨程度，又在我国具有实用性。

(6) 与时俱进原则

标准的制修订本身就是一个自我完善与时俱进的过程,任何标准在特定的历史阶段都有其具体的意义和作用,随着实验技术的不断发展,新的技术必定会取代落后的实验技术,因此标准的修订也要与时俱进。

3.2 技术路线

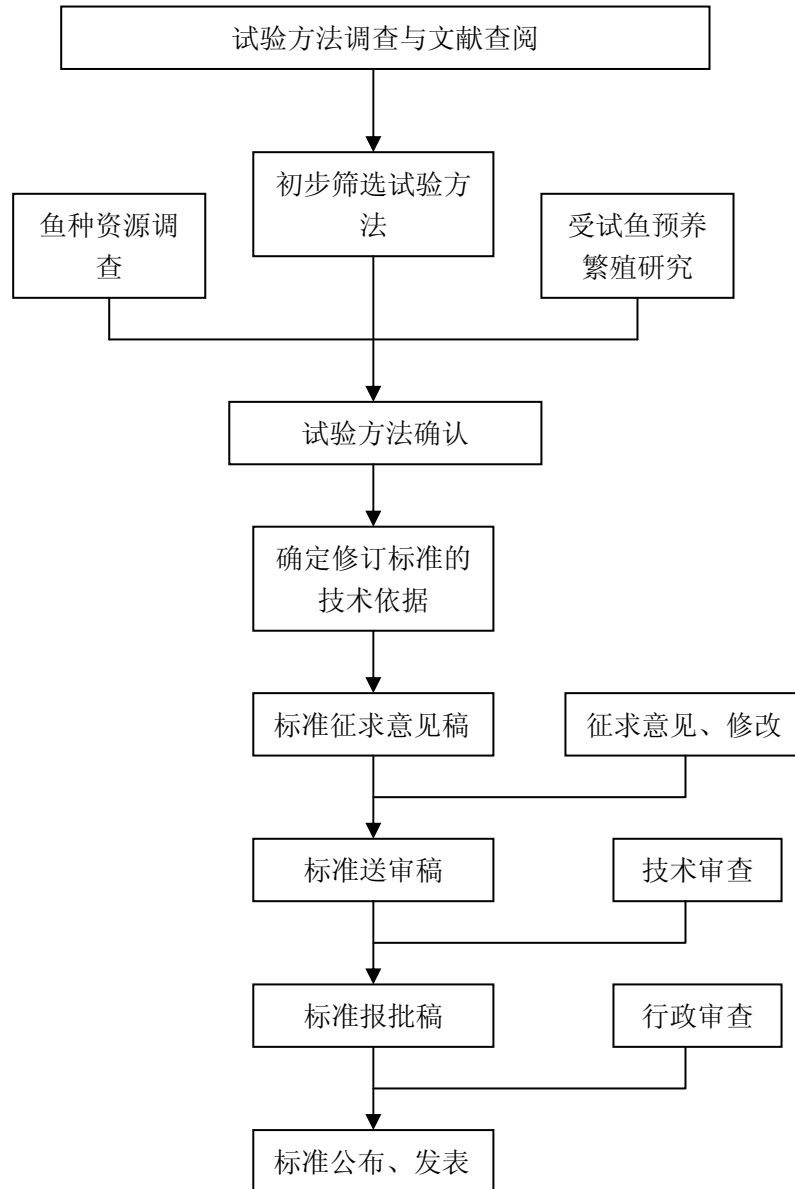


图 1 标准修订的技术路线

4. 标准适用范围

4.1 试验方法选择

本标准适用于具有一定水溶性的单一物质的毒性测定,不适用于混合物的毒

性测定。根据受试物的性质不同提供了三种急性毒性测定方法供选择，静水式法适用于化学性质稳定的物质；换水式法适用于试验浓度在更换试验药液的时间内保持相对稳定的物质；流水式法适用于绝大多数物质，包括水中不稳定物质。工业废水的毒性测定亦可选用本标准规定的方法。

4.2 试验用鱼选择

本标准推荐采用斑马鱼作为试验鱼种，斑马鱼为国际标准试验用鱼，遗传性状稳定，在我国全年可得，易于饲养繁殖，在全国大部门区域均能正常生长繁殖，因此是理想的试验鱼种。在不改变本标准试验条件的情况下，青鳉鱼（*Oryzias latipes*）（真骨鱼总目 青鳉科）；孔雀鱼（*Poecilia reticulata*）（真骨鱼总目 花鳉科）亦可作为试验用鱼。

青鳉鱼是一种小型淡水鱼，成年鱼体长在2~4cm之间，食性杂，耐盐度和温度的范围较广，易于饲养管理，也是国际标准组织（ISO）推荐的毒性试验标准用鱼之一。在我国主要分布于华北、华东和华南等地，经验证明在粗放的饲养条件下，能常年繁衍不衰，是理想的试验用鱼。

孔雀鱼原产委内瑞拉及西印度群岛等地，是一种小型观赏用鱼，属花鳉科，卵胎生，易于饲养管理，适应性强，性情温和，对水质要求较低，一般pH 7~8的水质均可，适宜水温为22~24℃，最低可耐受16℃低温。对水硬度的要求也不高，在我国各地均可正常饲养繁殖，是一种较理想的试验用鱼。

5. 标准的主要内容说明

5.1 方法原理

本标准条款4对方法原理进行了说明，运用静水式法、换水式法、流水式法测定受试物对鱼类急性毒性，均是在一定的试验条件下求出试验用鱼在规定时间内（24h、48h、72h、96h等）50%群体死亡的浓度，即致死中浓度 LC_{50} 。

5.2 试剂和材料

条款5.1对试验用鱼斑马鱼进行了规定说明，斑马鱼的体长、体重、来源、驯养条件等都做了具体的要求。斑马鱼体长 30 ± 5 mm，体重 0.3 ± 0.1 g此要求保证了斑马鱼为青壮年鱼，且体型大小一致。试验用鱼需来自同一种群，来自同

一种群的鱼有同一遗传物质基础，从而对毒物的敏感程度一致。试验前至少在连续曝气的稀释水中驯养 7 天，驯养时的水质条件和照明条件与试验时的条件一致，规定了驯养条件与试验条件一致，使试验用鱼对试验条件提前适应，如果驯养条件与试验条件不一致，则进行试验时因为条件改变会干扰试验用鱼的正常生理活动从而影响试验结果的准确性。驯养期间死亡率不得超过 10%，如果超过 10% 则说明该批鱼存在健康问题或者对环境条件不适应，该批鱼不适合进行毒性试验。

条款 5.2 对标准稀释水的配制方法及配制后的水质标准进行了说明。因为各地自来水水质状况不一致，pH、硬度等水质标准有差异，因此标准稀释水采用蒸馏水或去离子水进行制备，所需制剂包括 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaHCO_3 、 KCl ，均为分析纯，从而确保配制的稀释水具有统一的标准。配制好的标准稀释水中各组分的浓度分别为：294.0mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；123.3 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；63.0 mg/L NaHCO_3 ；5.5 mg/L KCl 。pH 为 7.8 士 0.2，硬度为 250 士 25mg/L（以 CaCO_3 计）。

条款 5.3 规定了受试物储备液的制备方法，受试物储备液可用标准稀释水、去离子水或蒸馏水进行制备。为了避免受试物因降解导致浓度变化，一般受试物储备液均要求当天使用当天配制，对于化学性质较稳定的物质，可配制供两天以上使用的溶液。水溶解度低的受试物可进行超声助溶，或加入一定量对鱼低毒的有机溶剂进行助溶，有机溶剂的加入量以试液中 $<0.1\text{mg/L}$ 为宜。

5.3 仪器设备

试验所用仪器设备均应采用化学惰性材料制成，避免受试物与仪器设备发生化学反应干扰试验正常进行。所用材料应对受试物不产生吸附作用，最大程度的避免受试物浓度降低。

条款 6.1 规定了试验容器的选择依据，容器大小应达到鱼的负荷 1.5 克鱼/升水，保证试验用鱼有充足的溶解氧。当试验物质具有挥发性时，试验容器顶部应加盖密闭装置，避免受试物挥发出来对试验人员造成不必要的危害。当试验物质为非挥发性物质时试验装置顶部应敞开，保证试验溶液与空气有充足的接触面，达到氧气交换的目的。

条款 6.3 对控温设备的要求进行了说明,控温设备推荐采用大型恒温水浴装置,大型恒温水浴控温精确,温度波动较小。而采取空调控温则控温不够精确,且试验溶液升温降温过程缓慢,不易控制。

条款 6.4 对流水式试验装置的溶液更新设备做出了说明,本标准中只对溶液更新设备的最终更新效果进行了规定,即更新过程中应确保试验溶液浓度稳定在理论浓度的 80%以上,溶解氧浓度稳定在空气饱和值(ASV) 60%以上。未对更新设备本身进行具体要求,各实验室可根据自身情况采用适合本实验室的具体设备。

5.4 干扰及消除

条款 7.1 规定了试验用水为标准稀释水,并就溶液配制及储存,试验操作常规条件做了规定,试验溶液的配备与储存、试验鱼的管理及全部操作和试验都应在空气污染物未达到有害浓度的大气中进行。空气污染物浓度达到有害浓度会对试验产生不利影响,空气中的有害物质会溶入试验溶液中,造成试验结果偏差。

条款 7.2 规定了试液的溶解氧需达到空气饱和值(ASV)的 60%以上,保证试验期间试验用鱼有充足的氧气供应。规定了光照条件为 12~16h,试液温度恒定在 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,所规定的光照和水温条件均为斑马鱼的最佳生长环境条件。

5.5 样品

条款 8.1 对试验溶液的制备方法做了说明,对受试物的范围及要求做了具体规定,受试物可以是固体、液体、气体,但应有一定的水溶性,并且组分稳定。试验溶液由标准稀释水和受试物储备液制备而成。根据浓度设置要求,在标准稀释水中加入适量的受试物储备液,配制成所需浓度的试验溶液。如果受试物储备液是由去离子水或蒸馏水配制而成,则每 10L 稀释水中受试物储备液的加入量不宜超过 100ml,因为去离子水或蒸馏水配制的受试物储备液如果加入量过多会改变标准稀释水的 pH、硬度等水质条件,从而导致试验条件改变。

条款 8.2 规定了废水样品的采集与保存方法。废水样品采集完成后应及时进行试验,对于 6h 之内不能进行试验的废水样品应进行冷藏处理($0\sim 4^{\circ}\text{C}$),对于采集后 2 个月之内不能进行试验的废水样品,则必须将水样冷冻保存,以确保废

水样品的代表性。

5.6 试验步骤

条款 9.1、9.2、9.3 分别对静水式法、换水式法、流水式法的试验步骤进行了详细的说明。三种试验方法分为限度试验；预备试验；正式试验三大步骤。

9.1.1、9.2.1、9.3.1 为本标准新增内容，分别就静水式法、换水式法、流水式法中的限度试验进行了说明，以受试物的最大水溶解度为限度试验浓度；当该物质的最大水溶解度大于 100mg/L 时，以 100mg/L 为试验浓度进行试验。限度试验可初步判断受试物对鱼类的毒性大小，如果限度试验期间试验用鱼没有死亡，则说明该受试物对鱼类基本没有急性危害影响，可免做下一步试验，直接出具试验结果，试验结果以 96h-LC₅₀ 大于该物质的最大水溶解度或大于 100mg/L 表示。

9.1.2、9.2.2、9.3.2 对各试验方法的预备试验步骤作了具体说明，预备试验中受试物浓度配制的公比设置为 10，设置较大的公比可初步确定受试物对试验鱼的大致毒性范围，从而进一步确定最高全存活浓度和最低全致死浓度。试液总体积建议不超过 5L，试验用鱼 5 尾，预备试验阶段在不影响试验结果的前提下应尽量使用较少的试液及较少的鱼，使用较少的试液可减少对环境的污染危害，使用较少的试验鱼是出于动物福利和动物保护目的。

9.1.3、9.2.3、9.3.3 对各试验方法的正式试验步骤作了具体说明，正式试验所需浓度系列应在预备试验确定的最高全存活浓度和最低全致死浓度之间进行设置，正式试验至少需设置 5 个浓度，且其浓度范围在 3 个依次的几何系列浓度中最好能够测得 20% 到 80% 的死亡率，如浓度系列为 1.0mg/L；2.0mg/L；3.0mg/L；5.0mg/L；10.0mg/L，对应的死亡率分别为 0；20%；50%；80%；100%；此浓度系列在 2.0mg/L；3.0mg/L；5.0mg/L 这 3 个依次的几何系列浓度中其死亡率分别为 20%；50%；80%，因此可以更精确的估算 LC₅₀ 值。

试验用鱼规定为 10 尾，试液总体积为 10L，而斑马鱼平均体重 0.3 ± 0.1g。10 尾斑马鱼的体重为 3~4g，完全满足 1.5 克鱼/升水的要求。

换水式法中规定每隔 24h 更换一次药液，这对于多数化学性质相对稳定的受

试物来说完全满足在更换药液期间试验浓度在理论浓度值的 20% 内波动。

流水式法中规定更新溶液的速率至少为 25L/d，如果出口溶液的溶解氧浓度能维持大于空气饱和值（ASV）60% 以上，则更新速率可以降低至 12 L/d。规定溶液的更新速率一方面可以保证水中溶解氧的浓度大于空气饱和值（ASV）60% 以上，另一方面可以保证试验浓度接近理论浓度值，即使是水中不稳定物质进行试验，也因为试验溶液不断更新从而保证试验浓度与理论浓度值接近。

预试验与正式试验均不设平行处理，10 尾鱼在数理统计上已满足 LC₅₀ 的计算要求。试验均需设置空白对照，从而判断试验用鱼的死亡是否由受试物引起。对于添加了助溶剂的试验还需设置溶剂对照，溶剂对照中助溶剂的浓度为试验液中助溶剂的最高浓度。

5.7 结果计算

条款 10.5 规定了本标准试验条件下需满足一定的条件，试验结果才真实有效。受试物浓度不低于理论浓度的 80%，若受试物浓度低于理论值 80% 以下，会严重高估受试物的毒性程度；试液溶解氧浓度大于空气饱和值（ASV）60% 以上，溶解氧低于 60% ASV 的试液会导致试验用鱼缺氧引起不良反应；对照组受试鱼的死亡率或非正常率 ≤ 10%，或每缸 ≤ 1 尾，对照组受试鱼死亡率过高说明试验用鱼本身存在质量问题，说明试验组中的死亡率并非完全由受试物导致；参比物质重铬酸钾对受试鱼的 24h-LC₅₀ 在 200~400mg/L 之间，且同一实验室不同时期的试验结果一致；参比物质试验结果可以充分证明在同一实验室相同试验条件下，试验用鱼是否有效及试验结果是否可靠。

6. 参考文献

- [1]. GB/T2001.4—2001 《标准编写规则 第 4 部分：化学分析方法》
- [2]. HJ/T168—2004 《环境监测分析方法标准制订导则》
- [3]. GB/T15000.5—1994 《标准样品工作导则（5）化学成分标准样品技术通则》
- [4]. 《水质分析大全》 科学技术文献出版社 重庆分社 1989.3
- [5]. 《标准样品实用手册》 中国标准化协会 2003
- [6]. ISO 7346-1 “Water quality-Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan(Teleostei

Cyprinidae]-Part 1:Static method”

- [7]. ISO 7346-2 “ Water quatility-Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan(*Teleostei Cyprinidae*)]-Part 2:Semi-static method”
- [8]. ISO 7346-3 “ Water quatility-Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan(*Teleostei Cyprinidae*)]-Part 2: Flow-through method”
- [9] AXELROD, H.P. Breeding Aquarium Fishes Book 1. T.F.H. Publication. 1967.
- [10] LAAIE, H.W. The biology and use of zebra fish (*Brachydanio rerio*) in fisheries research. A literature review J. Fish Biol. 10(2)1977:121-173.
- [11] MERTENS, J. Year-round controlled mass reproduction of the zebra fish. A Aquaculture 2 1973:245-249.
- [12] NEWSOME, C.S. and PIRON, R.D. Aetiology of skeletal deformities in the zebra Danio fish (*Brachydanio rerio*, *Hamilton-Buchanan*). J. Fish Biol. 21 1982:231-237.
- [13] NIIMI, A.J. and LAHAM, Q.N. Influence of breeding time interval on egg number, mortality and hatching of the zebra fish (*Brachydanio rerio*). Can.J.Zool. 52 1974:515-517.
- [14] PIRON, R.D. Spontaneous skeletal deformities in the zebra fish (*Brachydanio rerio*) bred for fish toxicity tests. J. Fish Biol. 13 1978:79-84.
- [15] Monte Westerfield Institue of Neuroscience Universit of Oregon. The Zeberafish Book-A Guild for the Laboratory Use of zeberafish (*Brachydanio rerio*) [M]. Oregon: The University of Oregon Press, 1995.
- [16] Huang, Y.et al., 1986 Bioaccumulation of ¹⁴C-hexa-chlorobenzene in eggs and fry of Japanese Medaka (*Oryzias lalipes*). *Bull Environ. Conlum.* 36, 437-443.
- [17] Kirchen, R.V. & W. R. West 1976 The Japanese Medaka-Its care and development. Carolina Biological Supply Company, U.S.A.
- [18] Yamamoto. Toki-O 1975 Medaka (Killifish)-Biology and Strains. Keigaku Publishing Company, Tokyo.Japan.

- [19] 陈思行.孔雀鱼的养殖及病虫害防治[J]. 水产科技情报, 2002, 29(1): 40-42.
- [20] 陈万光. 孔雀鱼的人工饲养与繁殖技术[J]. 内陆水产, 2001, 9: 43.
- [21] 童响波. 孔雀鱼的繁殖[J]. 内陆水产, 2003, 9: 37.