



中华人民共和国国家标准

GB/T xxxx-xxxx

代替 GB/T 13266-1991

水质 物质对蚤类（大型蚤） 急性毒性测定方法

Water quality-Determination of the acute toxicity
of substances to Daphnia (*Daphnia magna* straus)

（征求意见稿）

200×-××-××发布

200×-××-××实施

国家质量监督检验检疫总局
环 境 保 护 部

发布

目 次

| | |
|--|----|
| 前言 | I |
| 1 适用范围..... | 1 |
| 2 规范性引用文件..... | 1 |
| 3 术语和定义..... | 1 |
| 4 方法原理..... | 2 |
| 5 试剂和材料..... | 2 |
| 6 仪器和设备..... | 3 |
| 7 干扰及消除..... | 3 |
| 8 样品 | 3 |
| 9 试验步骤..... | 4 |
| 10 结果计算..... | 5 |
| 11. 试验报告..... | 7 |
| 附录 A（规范性附录）大型蚤的培养繁殖方法 | 8 |
| 附录 B（规范性附录）斜生栅藻的培养技术 | 10 |
| 附录 C（资料性附录）废水或某一种物质（储备液浓度为 1000 mg/L）对大型蚤（ <i>Daphnia magna</i> ）运动受抑制测定实例 | 12 |

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，规范水生生物急性毒性测定方法，制定本标准。

本标准规定了水中物质对大型蚤的急性毒性测定方法。

本标准的技术内容采用 ISO 6341-1996 中相关内容。

自本标准实施之日起，《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》GB/T 13266-91 废止。

本标准为指导性标准。

本标准由环境保护部科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：环境保护部南京环境科学研究所。

本标准自 2000 年 00 月 00 日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法

1 适用范围

本标准规定了水水物质抑制 50%大型蚤活动能力（包括死亡）的急性毒性测定方法。

本标准适用于以下范围：

- a. 在试验条件下可溶的化学物质（包括工业原料和产品、食品添加剂、农药、医药等）。
- b. 工业废水。
- c. 生活污水。
- d. 地表水、地下水。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB 12997-91 水质 采样方案设计技术规定

GB 12998-91 水质 采样技术指导

GB 12999-91 水质采样 样品的保存和管理技术规定

GB/T 6682-92 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 24h-EC₅₀、48h-EC₅₀

指在 24h 或 48h 内 50%的受试蚤运动受抑制时受测物的浓度。

3.2 运动抑制 immobilization

轻轻摇动试验容器，若 15s 之内大型蚤不能运动，认为其运动能力受到抑制，即使其触角仍能活动，也应算做不活动的个体。

4 方法原理

在规定的条件下，将大型蚤幼蚤置于一系列浓度的受试物溶液中，24h 和（或）48h 后，由不同浓度溶液中大型蚤幼蚤活动能力受到抑制（包括死亡）的数量，求出该时间内受试物使 50% 的大型蚤幼蚤活动能力受到抑制（包括死亡）的浓度，即半抑制浓度，记作 EC_{50} 。试验分为两个阶段：A 预试验；B 正式试验。本方法宜采用大型蚤（*Daphnia magna* Straus）为试验蚤种。

5 试剂和材料

本标准所用试剂除非另有说明，分析时均适用符合国家标准的分析纯化学试剂，试验用水参照 GB/T 6682-92 分析实验室用水规格和试验方法。

5.1 试验生物为大型蚤[（*Daphnia magna* Straus）（甲壳纲，枝角亚目）]。

保持良好的培养条件，使大型蚤的繁殖控制在孤雌生殖状态下（见附录 A）。

选用试验室条件下培养 3 代以上的、出生 6~24h 的幼蚤为试验蚤。试验蚤应是同一母体后代。

5.2 标准稀释水

5.2.1 新配制的标准稀释水 pH 为 7.8 ± 0.2 ；硬度为 250 ± 25 mg/L（以 $CaCO_3$ 计），Ca/Mg 比例接近 4:1；溶解氧浓度在空气饱和值的 80% 以上；不含有任何对大型蚤有毒的物质。

标准稀释水用电导率小于 $10 \mu S/cm$ （1 mS/m）的蒸馏水或去离子水（以下简称水）按下述方法配制。

a. 氯化钙溶液

将 11.76 g 氯化钙（ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ）溶于水中稀释至 1L。

b. 硫酸镁溶液

将 4.93 g 硫酸镁（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）溶于水中稀释至 1L。

c. 碳酸氢钠溶液

将 2.59 g 碳酸氢钠（ $NaHCO_3$ ）溶于水中稀释至 1L。

d. 氯化钾溶液

将 0.25 g 氯化钾（KCl）溶于水中稀释至 1L。

各取以上四种溶液 25 mL 混合，稀释至 1L。必要时可用氢氧化钠溶液或盐

酸溶液调节 pH 值，使其稳定在 7.8 ± 0.2 。标准稀释水应容许大型蚤在其中生存至少 48h，并尽可能检查稀释水中不含有任何已知的对大型蚤有毒的物质。例如：氯、重金属、农药、氨或多氯联苯。

5.2.2 如果所进行的试验需要使用其他稀释水或改变稀释水的 pH 值，应在试验报告中注明所用稀释水的性质。pH 不得低于 6.5 或不得高于 8.5，同次试验 pH 波动不得大于 0.5。要求稀释水的硬度在 150~300 mg/L（以 CaCO_3 计）范围内，Ca/Mg 比例接近 4:1。

6 仪器和设备

6.1 试验容器可采用 50 mL 小烧杯或结晶皿等玻璃制品，加盖表面皿。为防止玻璃容器对试验物质的吸附，试验前可用低浓度试验溶液浸泡一天。试验结束立即倒空容器，刷洗、消除任何微量的试验液。

6.2 量筒、容量瓶、移液管、滴管、玻璃缸、尼龙筛网等器皿。

6.3 溶解氧测定仪、水质硬度计、pH 计、温度计、电导仪。

7 干扰及消除

7.1 试验开始和结束时，对照和处理组的试验用液 pH 值变化范围不超过 1.5；溶解氧浓度应在试验要求浓度范围之内；试验前的培养温度要求与试验温度应一致，试验温度可在 $18 \sim 22^\circ\text{C}$ 下进行，但同次试验温度变化不超过 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

7.2 实验在没有对大型蚤有害的气体、粉尘的大气条件下进行。

7.3 试验在自然光照（避免阳光直射）或相当于自然光照下进行每天光照 16h，黑暗 8h 培养。

7.4 待产母蚤培养水质环境条件应与试验条件保持一致。

7.5 试验操作及试验过程中大型蚤不能离开水，转移时要用玻璃滴管。

8 样品

8.1 试样的制备

8.1.1 受试物可以是可溶于水的固体、液体或气体，但要求组分一定，具有代表性、重复性。

8.1.2 易溶于水的试验物质可直接加到标准稀释水（5.2）中，也可以溶解在蒸馏水或去离子水中配成贮备液加入到标准稀释水中配成试验液，每升稀释水中的贮备液不宜超过 10 mL。贮备液应低温保存。

8.1.3 难溶于水的物质，可用适当的方法，将其溶解和分散。包括使用超声波装置及其他低毒溶剂增溶。如果使用溶剂，溶剂在试验液中的浓度不应超过 0.5 mg/L。

8.2 水质样品的采集与保存

8.2.1 参照 GB 12997-91、GB 12998-91、GB 12999-91。采集废水样品时，应将采样瓶充满水样，不留空气。生产流程用水不稳定的工业废水，应在 24h 之内，每隔 6h 瞬时采样一次，分别测定每个样品，求得其最大毒性。

8.2.2 废水样品用标准稀释水稀释配成不同浓度的试验液。

8.2.3 样品采集后应立即进行试验。如果样品采集后 6h 之内不能进行试验，则必须将水样冷藏保存（0~4°C）；如果样品采集后 2 个月之内不能进行试验，则必须将水样冷冻保存，并应尽可能缩短水样在试验前保存的时间。

9 试验步骤

9.1 限度试验

以受试物在试验液中的最大溶解度作为限度试验浓度（若该物质的最大溶解度大于 100 mg/L，则以 100 mg/L 作为试验浓度），试验结束时，如果大型蚤的抑制率低于 10%，则不需进行下一步试验，否则要按照分析步骤进行完整试验。

9.2 预试验

9.2.1 正式试验之前，为确定试验浓度范围，必须先进行预试验。预试验浓度间距可宽一些（如 0.1、1、10），每个浓度至少放 5 个幼蚤，通过预试验找出被测物使 100%大型蚤运动受抑制的浓度和最大耐受浓度的范围，然后在此范围内设计出正式试验各组的浓度。

9.2.2 预试验中应了解毒物的稳定性，在标准稀释水中是否会出现沉淀、pH 等理化性质的改变，以便确定正式试验是否需要采取流水或更换试验液及改变稀释水 pH 等措施。

9.3 正式试验

9.3.1 试验浓度设计。根据预试验的结果确定正式试验的浓度范围，按几何级数的浓度系列（等比级数间距）设计 5~7 个浓度。试验浓度要设计合理（等比级系数不超过 2.2，如 1、2、4、8、16 等比级系数为 2），最高浓度处理组抑制或死亡率为 100%，最低浓度处理组抑制或死亡率为 0，系列浓度中以能出现一个大型蚤运动抑制率在 40%~60%的浓度最为理想。

9.3.2 试验用 50 mL 烧杯(或结晶皿)，置蚤 5 个，平均每蚤的试验液不低于 2 mL。每个浓度处理不少于 4 个平行。以不添加样品的空白处理作为对照，内装相等体积的稀释水。如检测物质使用溶剂，则还需设置最大浓度的溶剂组作为空白对照。试验前要用化学方法测定试验液的初始浓度。

9.3.3 试验开始后应于 24h 及 48h 定期进行观察，记录每个容器中仍能活动的水蚤数，测定 0~100%大型蚤不活动或死亡的浓度范围，并记录它们任何不正常的行为。在计算试验蚤的不活动或死亡的百分数之后，立即测定试验液的溶解氧浓度。

10 结果计算

10.1 EC₅₀ 的估算

试验结束，计算每个浓度中不活动的试验蚤（包括死亡蚤）占试验总数的百分比，用概率单位目测法，计算 EC₅₀。也可用计算机 EC₅₀ 程序处理（寇氏修正法），获得 EC₅₀。

10.1.1 概率单位图解法

以浓度对数作为横坐标，死亡百分率对应的概率单位为纵坐标，在半对数纸上绘图。顺着各点的分布趋势用目测法画一条直线，使它拟合图中的数据点，此线应尽量靠近概率单位为 5 及附近的数据点。从直线中读出致死 50%的浓度对数，估算出 EC₅₀。概率单位图解法的计算程序如下：

- a. 将浓度换算成浓度对数值，作为横坐标；不活动蚤百分数换成概率值作为纵坐标，在算术坐标纸上绘图。（若用对数——概率纸可不必进行上述换算，直接作图），由于概率单位尺度达不到 0 和 100，作图时，若是需要这样的数值，可以使用箭头表示这些点的真正位置。
- b. 顺着各点的分布趋势，用直尺作出一条最接近各点的直线。作直线时应多照

顾靠近概率单位为“5”处的各点。

- c. 从纵轴概率单位为“5”处，引一水平线与直线相交，再从交点作垂线与横轴相交，即可读出 EC_{50} 的对数值，此值的反对数即是用目测法求得的 EC_{50} 值， EC_{50} 的计算方法相同。

10.1.2 寇氏修正法

EC_{50} 的计算公式如下：

$$\log EC_{50} = X_k - d \left(\sum P_i - 0.5 \right)$$

式中： X_k ——最大剂量的对数；

d ——相邻两组对数量之差数；

$\sum P_i$ ——各组死亡率的总和（以小数表示）。

10.2 结果的表示

以 24h- EC_{50} 或 48h- EC_{50} 表示物质在相应时间内对大型蚤运动能力抑制的影响。当浓度间距过近仍不能获得足够数据时，可采用使 100%大型蚤活动受抑制（包括死亡）的最低浓度和使 0%大型蚤活动受抑制（包括死亡）的最高浓度来表示毒性影响的结果。

检测化学物质样品时，以毫克/升表示，计算结果有效位数保留 4 位。

检测废水样品时，以百分数或毫升/升表示，计算结果有效位数保留 4 位。

10.3 试验结果的有效性

10.3.1 检查大型蚤的敏感性及其试验操作步骤的统一性，定期测定重铬酸钾的 24h- EC_{50} ，20°C 时重铬酸钾的 24h- EC_{50} 在 0.5 mg/L~1.2 mg/L 之间。如测定值在此范围之外，应检查试验步骤是否严格，并检查大型蚤的培养方式，必要时重新获取试验用蚤。

10.3.2 对照组试验未出现不活动大型蚤。

10.3.3 必须经检测证明受试物浓度保持于试验全过程（至少应为计划配制浓度的 80%）。如果浓度偏差 >20%，应以测试浓度结果为准。

10.3.4 试验结束时，所有对照组和处理组溶解氧浓度必须大于或等于 2 mg/L。

10.3.5 试验期间，应保持试验室条件正常，如出现停电、停水等情况而影响试验的，应及时停止试验，待试验室条件恢复正常后重新进行试验。

11. 试验报告

试验报告要求包括以下几个方面：

11.1 试验用蚤的种名、来源、数目、蚤龄、饵料、驯养时间、重铬酸钾的 24h-EC₅₀。

11.2 对照组是否发生死亡。

11.3 试验条件下大型蚤的任何不正常行为、中毒症状。

11.4 受试物的名称、化学性质、来源、样品的保存方法、保存时间及前处理方法。

11.5 试验环境条件，试验用稀释水的性质，如水温、pH 值、溶解氧、电导率等情况。

11.6 实验结果、数据处理、结论、讨论。

11.7 方法依据及参考文献。

附录 A

(规范性附录)

大型蚤的培养繁殖方法

A1 试验蚤的选育

试验蚤 (*Daphnia magna*) 可以从其他试验室已有的纯培养中挑取、引种、也可以从野外采集。野外采集的蚤要经分离、纯化, 在显微镜下鉴定后, 选择体大、健康的母体数个, 用 50 mL 小烧杯单个培养。选择繁殖量最大的一代为母蚤, 单克隆化, 使之成为纯品系。

A2 饵料

雌性的大型蚤可以在 20°C 生存 4 个月之久。蚤类喜食藻类、细菌、酵母及有机物碎屑等。藻类的营养价值高于其他食物, 本方法推荐用试验室培养的栅藻为大型蚤的饵料。栅藻的培养方法见附录 B。

A3 容器

单个培养母蚤可用 50 mL 小烧杯, 繁殖培养用 2000 mL 大烧杯, 储备培养用 30 cm×30 cm 圆玻璃缸, 或类似大小的水族箱。

A4 喂养

用不含无机培养基的栅藻扩大培养液喂养大型蚤。可以采用每周 3 次全部更换水蚤培养液的办法, 也可以每天追加一次浓缩悬浮藻液。培养液中栅藻的浓度不宜过高, 一般在 10^6 个/L 左右, 藻液的颜色以淡苹果绿色为宜, 否则晚间缺氧会引起大型蚤的死亡。

A5 培养条件

氯气对大型蚤生存不利, 培养用水可选用经自然曝气三天以上的自来水或人工配制的稀释水, 大型蚤生存的适宜温度为 17~25°C, 适宜的 pH 为 6.5~8.5。大型蚤的密度以每升水培养 50 个左右母蚤为宜。过分拥挤, 会造成大型蚤停止

孤雌生殖。大型蚤对氧有较强的适应能力，培养液中可保持 2 mg/L 以上的溶解氧。

A6 试验蚤的分离

大型蚤的生长是间歇性的，生长与脱壳交替进行。每脱壳一次，增加一龄，前后脱壳的时间叫龄期。性成熟前的龄期为幼龄蚤，性成熟后的为成龄蚤。大型蚤有 4~6 个幼龄期，幼龄蚤比成龄蚤对毒物更敏感。运动受抑制试验一般选用试验室条件下培养 3 代以上、出生 6~24h 的幼蚤，最好为同一母体后代。

采用下述方法可以获得出生后 6~24h 的幼蚤。试验前从试验室贮备缸中挑取 20~30 个怀卵母蚤，放在一个 2000 mL 烧杯中单独培养。18h 后取走母蚤，幼蚤仍在原繁殖缸中培养，24h 时，此繁殖缸中的幼蚤即为出生 6~24h 的幼蚤。

为保证大型蚤的良好繁殖，采用下述方法分离母蚤。用孔径 1000 μm 尼龙网制成一个杯形的网袋（略小于繁殖缸）套在繁殖缸内壁，将母蚤放入网内，定期提出装有母蚤的尼龙网。放入另一个盛有斜生栅藻培养液的培养缸中。也可采用使繁殖缸的液体通过上、下套合在一起的两个筛网的方法获取试验蚤。上层筛网的孔径为 800~1000 μm ，下层筛网的孔径为 450~500 μm 。母蚤被阻止在上层粗网上，幼蚤被阻止在下层细网上。用新鲜斜生栅藻扩大培养液，将滤得的水蚤分别冲入繁殖缸内。试验期间每天分离一次，注明幼蚤的出生日期，便得到出生不同时间的幼蚤。定期淘汰老母蚤。

附录 B

(规范性附录)

斜生栅藻的培养技术

斜生栅藻具有较丰富的营养价值。试验室证明，用斜生栅藻喂养大型蚤，蚤的生长快，个体大，繁殖量高。保持试验室内斜生栅藻的良好生长是养好大型蚤的关键。

B1 培养基

试验室要经常保持一定数量的斜生栅藻藻种，可采用各种适用的培养基，本方法推荐用水生 4 号培养基。

培养基成分（配 1000 mL）如下：

| | |
|---|----------|
| 硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.200 g |
| 过磷酸钙 $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot (\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})]$ 饱和液 | 1.000 mL |
| 硫酸镁 $(\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ | 0.080 g |
| 碳酸氢钠 (NaHCO_3) | 0.100 g |
| 氯化钾 (KCl) | 0.025 g |

B2 藻种的培养

斜生栅藻可在摇床上振动培养，也可在流动通气条件下连续培养，最简单的培养方法是使用 1000 mL 三角瓶，装 300~400 mL 培养液，或者用 3000 mL 三角瓶装 1000 mL 培养液，接种藻种使成淡绿色。瓶口加松软面团以防污染，温度在 15~25°C，光照在 3000~4000 Lx 连续静止培养。可采用 40W 日光灯人工光照，光源距离约 2 m，也可用自然光源，避免阳光直射，日光照 6~10h。每天摇动 5~6 次，经几天培养后藻液变为深绿色。培养好的藻液可作为扩大培养用，也可经离心浓缩，或自然沉淀浓缩制成浓缩液，低温保藏备用。藻种培养当中要经常镜检，检查是否有杂藻、纤毛虫和轮虫。藻种要经常转接，以防止老化。转接的时间视藻种生长的情况而定，一般每周 1~2 次，藻液发绿色即要转接。老

化藻在显微镜下可明显见到聚集成团的藻群、色素变黄，摇动振荡后，仍出现大量沉淀。

B3 斜生栅藻的扩大培养

为获得培养大型藻的足够饵料，可在试验室内进行斜生栅藻的扩大培养。扩大培养采用 30 cm×30 cm 的圆玻璃缸，或类似大小的水族箱。在玻璃缸中加入培养好的栅藻液（B2），用经自然曝气的自来水稀释成淡绿色。扩大培养中不加任何营养盐。可放置 10~20 条斑马鱼（其他不食用斜生栅藻的鱼也可），每天照旧投鱼饵。鱼可以起搅拌作用。其排泄物也有利于栅藻的生长。扩大培养的栅藻液可直接喂大型蚤。

附录 C

(资料性附录)

废水或某一种物质 (储备液浓度为 1000 mg/L) 对大型蚤 (*Daphnia magna*) 运动受抑制测定实例

C1 预试验结果 (每个浓度 5 个大型蚤) (24h)

表 C1

| 浓度, % | 活动的大型蚤数目 |
|-------|----------|
| 3.5 | 0 |
| 1 | 0 |
| 0.35 | 5 |
| 0.1 | 5 |

正式试验的浓度范围为 0.35~1%。

C2 正式试验

C2.1 试验结果

24h 的试验结果如表 C2。

表 C2

| 浓度 | | 24h 活动的大型 | 不活动大型蚤 | |
|------|-------|-----------|--------|------|
| 百分浓度 | 浓度对数值 | 蚤个数 | 百分比 | 概率值 |
| 0 | -1 | 30 | 0 | |
| 0.35 | -0.45 | 25 | 16 | 4.0 |
| 0.46 | -0.33 | 18 | 40 | 4.75 |
| 0.60 | -0.22 | 10 | 67 | 5.43 |
| 0.77 | -0.11 | 6 | 80 | 5.84 |
| 1.0 | 0 | 2 | 93 | 6.47 |

C2.2 计算 24h-EC₅₀

采用概率单位图解法（见图 C1），24h-EC₅₀ 是 0.55%，对排放废水，这可表示为：24h-EC₅₀=0.55%或 5.5 mg/L。对储备液浓度为 1000 mg/L 的化学物质，此结果可表示为：

$$24\text{h-EC}_{50} = 0.55 \times 1000 = 5.5 \text{ mg/L}$$

