

水质 物质对蚤类（大型蚤）
急性毒性测定方法
编制说明

（征求意见稿）

环境保护部南京环境科学研究所

二〇〇八年三月

一、任务来源

2006 年国家质检总局（国质检财函[2006]909 号）和 2007 年国家质检总局（国质检财函[2007]971 号）下达了《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》国家环保标准制修订计划，项目统一编号为 991，任务承担单位为环境保护部南京环境科学研究所。

二、编制目的和意义

GB/T 13266-91《水质 物质对蚤类急性毒性测定方法》的修订，将推进我国环境执法和监督管理工作的进一步规范化、科学化和法制化，全面健全环境保护法规，完善环境保护技术法规和标准体系，科学确定环境基准，努力使环境保护标准与新形式下的环保目标相衔接。

国际标准化组织（ISO）已向各国推荐了蚤类急性毒性的标准测定方法。我国也颁布了 GB/T 13266-91《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》，内容基本等同于 ISO 6341:1982。GB/T 13266-91 规定了测定方法的适用范围、原理、试验材料、试验液的制备、试验容器和仪器、预试验、正式试验、数据处理及有效性，以及试验报告等内容。但由于对试验材料准备、测试环境条件，以及限度试验等方面的规定模糊或未规定，试验结果的精确性和重现性需要进一步提高。《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》的修订将提高实验数据互认程度，为我国水质安全提供了科学的检测方法依据，在保护生态环境，尤其是水生生态环境，减少污染物危害中具有十分重要的意义。

三、编制标准的基本原则、依据及技术路线

3.1 基本原则

本标准的编制原则是既参考国外最新的方法技术，又考虑国内现有监测机构的监测能力和实际情况，确保方法标准的科学性、先进性、可行性和可操作性。

3.2 编制依据

本标准编制的主要依据包括有：

中华人民共和国环境保护法

中华人民共和国水法

中华人民共和国水污染防治法

GB/T 6682-92 分析实验室用水规格和试验方法

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

3.3 技术路线

自修订工作下达后，国家环保总局南京环境科学研究所成立了标准修订小组。修订小组广泛收集、分析国内外相关资料，征求有关专家意见后，经过反复修改和完善，设计了标准修订的技术路线（图1）。

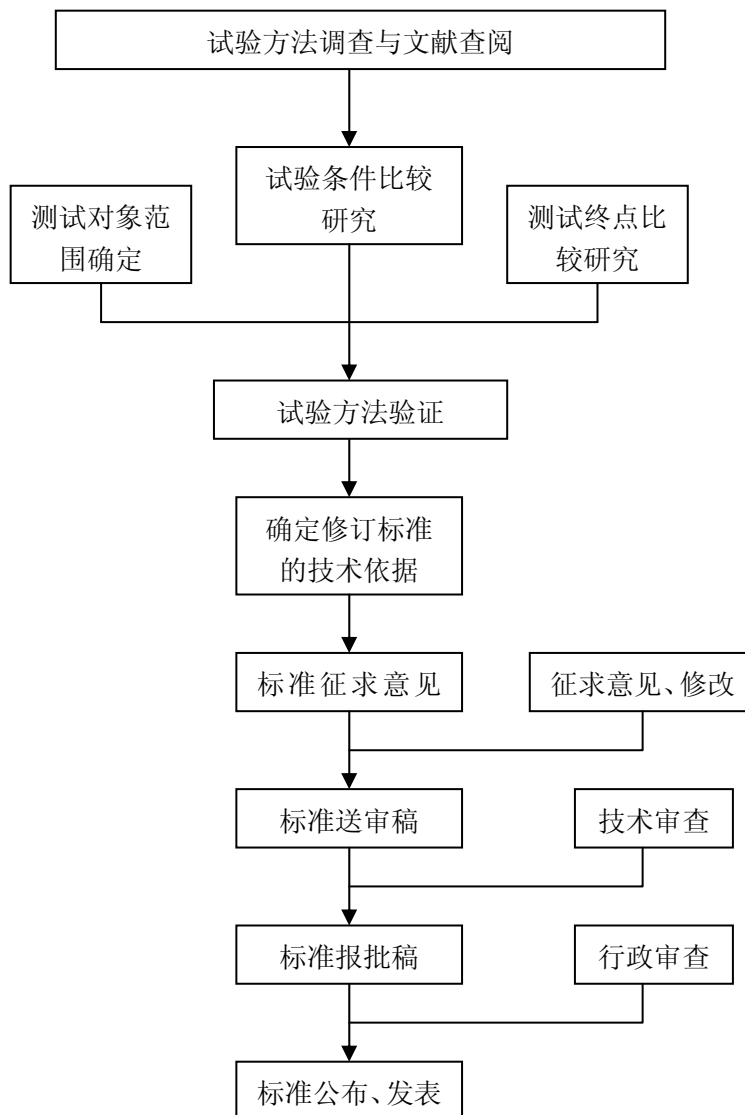


图 1 标准修订的技术路线

四、国内外蚤类毒性研究进展

在自然水域中生存着大量的浮游动物，蚤类是浮游生物的重要类群。它们与水环境有着错综复杂的相互关系，对水中毒性物质十分敏感，在水质变化中起着重要作用，研究认为根据浮游生物毒性试验结果可确定水质污染程度。

蚤类是枝角类浮游生物，属甲壳纲腮足亚纲双甲目，处于水体初级生产者（藻类）和最终消费者（鱼类）之间的环节，对毒性反应比鱼类更为敏感。蚤类取材容易，试验方法简便，繁殖周期短，实验室易培养，产仔量多，是一类很好的试验生物，且实验项目使用的参数在个体间相对恒定，可以为实验结果统计学处理提供方便，因此常被选定为毒性测试生物。大型蚤 *Daphnia magna* Straus 是水质毒性试验研究中的常用蚤种。

蚤类急性毒性试验又称为短期试验，基本原理是利用蚤类在不同浓度受试物中短期（常用24h或48h）暴露后产生的中毒反应。以50%受试蚤的活动能力受到抑制（包括死亡）给出半抑制浓度值， EC_{50} 值表示受试物的毒性强度。节菱孢毒性培养物能引起试验蚤类死亡，浓度为18 mg/L的试验液中暴露24h死亡率为6.7%，48h的死亡率为30%， LC_{50} 值分别为38.07 mg/L、24.37mg/L，暴露浓度与死亡率之间的存在极显著的相关关系。

蚤类慢性毒性测定是受试物毒性强度研究的另一种方法，基本原理是将蚤类在低浓度受试物中长时间暴露后测定毒物对蚤类的生长、发育、繁殖的影响。蚤类急性或慢性试验的测定结果，可确定受试物的安全浓度，评价受试物对水生生物的影响，为制定相应环境安全标准及管理提供依据。

水环境样品，如江、河、湖、海等调查时，由于污染源比较复杂，很难用单一的理化指标表示样品污染程度，而蚤类毒性试验可在一定程度上综合地反映水体的污染情况和污染物毒性。由于环境样品成份复杂，各种毒物间还存在拮抗、加成作用，往往使其毒性与单一存在毒物的毒性有所不同，运用蚤类直接测得的环境样品的综合毒性，试验结果可判断样品的实际毒性强度，为水质环境毒性监测提供综合指标。因此，蚤类急性毒性已成为国际公认的生物测试方法。

蚤类毒性试验资料应用广泛，适用于测定化学物质、工业废水、生活废水以及地表水、地下水等样品生物毒性，评价受试物对水生生物和水生生态系统的影响，以及废水和河流的环境监测。例如，蚤类急性毒性试验已成为我国农药、化

学品环境安全评价，船舶散装运输液体化学品的危害性评价和污染分类，以及废水监测的重要方法，也是我国制定渔业水质标准、工业废水排放标准，以及饮用水水源标准的重要依据。

如“苯胺”在地面水最高容许浓度研究中采用了大型水蚤做的苯胺毒性研究资料，观察了苯胺对大型水蚤生存、生长繁殖、心率变化等指标。并结合脊椎动物试验结果及感观性状要求，推荐地面水最高容许浓度为0.1 mg/L。镉对大型蚤、鱼类及栅列藻的毒性试验资料已成为镉的渔业标准修订依据。

蚤类毒性试验通过半抑制浓度值，可反映受试物样品的毒性程度，EC₅₀越小则毒性越大。急性毒性资料能预测对蚤类的急性损害及短期暴露的最大容许浓度，并可估计化学物质或废水在接纳水体中的无可见效应浓度，NOEL较低，则意味着化学物质或废水的毒性较大。

五、相关问题说明

5.1 适用范围

本标准适用于在试验条件下可溶的化学物质，或可形成稳定分散系的物质；工业废水和生活污水样品必要时可进行过滤、离心等前处理。

5.2 规范性引用文件

我国已有分析实验室用水规格和试验方法、水质采样方案设计技术、采样技术，以及采样样品的保存和管理技术等方面的标准依据。本标准将这些相关标准作为试验实施过程的规范性引用文件。

5.3 术语和定义

根据国际蚤类急性毒性标准，以及实际工作经验，本标准删除了 GB/T 13266-91 中 24h LC₅₀ 和 48h LC₅₀。

5.4 方法原理

本条阐述了大型蚤急性毒性试验方法原理，将蚤死亡定义为蚤运动能力受到抑制的极端表现形式。本条规定了大型蚤 *Daphnia magna* Straus 为试验用蚤。

5.5 试剂和材料

本条规定了以 GB/T 6682-92 分析实验室用水规格和试验方法作为试验用水的标准规范。

5.6 仪器和设备

本条增补了水质硬度计，便于准确控制试验过程水质硬度变化。

5.7 干扰及消除

本标准 7.1 条参考 2004 年 OECD 发布的 OECD Guideline for Testing of Chemicals *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test 202，补充了对试验溶液 pH 变化范围应在 1.5 的具体规定；试验温度规定可在 18~22°C 之间进行，但每一次试验温度变化范围不得超出±1°C。

本标准 7.2 条规定了试验过程中光暗循环的具体时间范围。

本标准 7.3 条将 GB/T 13266-91 环境条件下的 6.4 条款，更改为“待产母蚤培养水质环境条件应与试验条件保持一致。”大型蚤试验用蚤为出生 6~24h 幼蚤，不需驯养，原标准该条款易产生歧异。

5.8 样品

本标准 8.1 条补充了我国现行的关于水质样品采样方案设计技术、采样技术、样品保存和管理技术方面的相应标准，使得采样样品采集和保存更为科学化、规范化和统一化。

5.9 分析步骤

本标准增加了限度试验作为 9.1 条。限度试验是在预试验和正式试验前进行，以受试物在试验条件下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 100 mg/L 时，以 100 mg/L 为试验浓度进行试验），试验结束时如果大型蚤抑制率小于 10%，则无需进行下一步试验。

本标准 9.3.1 条中针对试验浓度的设计进行了补充，参照 OECD C202，规定浓度等级范围不等大于 2.2，使浓度间距合理。

本标准 9.3.2 条中对试验烧杯溶剂和试验溶液体积、试验蚤数目和平行数目进行了修订，参照南京环科所蚤类毒性试验工作和 OECD C202，将试验烧杯体积由 100 mL 减小为 50mL，试验用液按照平均每蚤的试验液不低于 2 mL 来计算；试验蚤数为每平行 5 只，不少于 4 个平行。在保证试验结果的精确性和可信性的同时，节约试验人力物力，减少试验废液产生。

5.10 结果计算

本标准 10.1 条增补了 EC₅₀ 概率单位图解法的具体过程，明确了该方法的标准计算过程。本标准删除了 GB/T 13266-91 附录 C 中的相关内容。

本标准 10.3.1 条增补了大型蚤重镉酸钾的 24h-EC₅₀ 发生异常的可能原因和应采取的措施。

本标准 10.3.5 条增补了试验期间，试验室条件发生异常情况时，大型蚤急性毒性试验结果无效，并提出了相应处理措施。

5.11 试验报告

本标准试验报告内容在 GB/T 13266-91 试验报告基础上，增补了对大型蚤重镉酸钾的 24h-EC₅₀，以及受试物名称等的要求。

六、与国外标准的比对

国际标准化组织 ISO 6341:1996 “Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test” 是各国家和组织制定了蚤类急性毒性试验方法标准的蓝本。

1992 年欧盟 REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical) 颁布的 Acute toxicity for *Daphnia*. Direction 92/69/EEC; 1996 年美国环保总结颁布的 EPA OPPTS 850.1010, Ecological effects test guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids; 以及 2004 年 OECD 颁布的 Test Guidelines for Testing of Chemicals 202. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test 等，以上标准在蚤种、试验步骤、控制条件、结果分析等步骤，以及总体技术路线方面基本一致。