

HJ

中华人民共和国环境保护行业标准

HJ/T□□□□□—2□□□

微生物菌剂使用环境安全评价导则

The Guild of Safety-Assessment of Microbial Community

Used in the Environment

(征求意见稿)

20□□—□□—□□发布

20□□—□□—□□实施

国家环境保护总局 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
3.1 微生物菌剂.....	1
3.2 基因改造.....	2
3.3 实验室研究.....	2
3.4 构筑物.....	2
3.5 开放环境应用.....	2
4 总则.....	2
4.1 评价目的.....	2
4.2 评价原则.....	2
4.3 微生物菌剂使用环境安全评价主要内容.....	3
4.4 微生物菌剂使用环境安全评价程序.....	3
5 评价内容.....	5
5.1 微生物菌剂评价.....	5
5.2 生态安全评价.....	6
5.3 使用环境信息评价.....	7
5.4 其他信息.....	9
6 报告编制.....	12
6.1 报告主要内容.....	12
6.2 评价结论的编写.....	12
6.2.1 编写要求.....	13
6.2.2 编写内容.....	13
7 检测内容及要求.....	13
7.1 检测实验室.....	13
7.2 检测方法.....	13
7.3 必备资料.....	13
7.4 检测报告.....	13
附录 A.....	15
附录 B.....	21
附录 C.....	24
附录 D.....	28

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》，保障人体健康，保护生态环境，促进环保用和可能造成环境危害微生物菌剂的安全应用，规范微生物菌剂使用环境安全评价工作，制定本标准。

本标准是根据国家及地方有关环境保护的法规和标准，以及微生物菌剂环境应用和环境生态学特点制定的，是作为微生物菌剂环境安全评价机构进行微生物菌剂使用环境安全评价时使用的技术规范。

本标准规定了微生物菌剂使用环境安全评价工作的内容和范围、评价所引用和依据的相关标准和方法、以及评价所涉及检测方法等。

本标准首次发布。

本标准为指导性标准。

本标准由国家环境保护总局科技标准司提出。

本标准起草单位：上海市环境监测中心。

本标准国家环境保护总局20□□年□□月□□日批准。

本标准自20□□年□□月□□日起实施。

本标准由国家环境保护总局解释。

微生物菌剂使用环境安全评价导则

1 适用范围

本标准适用于以生态环境保护和污染防治为目的而使用的微生物菌剂。不适用基因改造的微生物菌剂以及实验室研究使用的微生物菌剂。

本标准作为微生物菌剂使用环境安全性测试、评价报告书编制与审核的技术依据。

2 规范性引用文件

下列文件中所含的条款通过本规范的引用即构成本规范的条文，与本标准等效。下列文件出版修订版时，使用本标准的各方应使用下列标准及文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 7919 化妆品安全性评价程序和方法

GB/T 7918 化妆品微生物标准检验方法

GB/T 4789 食品卫生微生物学检验

GB/T 15193 食品安全性毒理学评价程序和方法

GB/T 13267 水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法

GB/T 15441 水质急性毒性的测定发光细菌法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 微生物菌剂

微生物菌剂由一种或多种通过自然选育从自然界经分离纯化所获得微生物菌种（株）所组成，应用于生态环境保护和污染防治为目的的微生物菌剂。

3.2 基因改造

基因改造是指经现代生物技术（如：细胞融合、DNA 重组等）改造，改变了原有生物遗传结构与功能的微生物菌种。

3.3 实验室研究

实验室研究指在控制系统内的实验室规模的微生物研究。

3.4 构筑物

构筑物指在以生态环境保护和污染防治为目的使用微生物菌剂时，限制微生物菌剂或其影响作用于人类健康和环境安全的物理屏障或物理、化学、生物学综合屏障。

3.5 开放环境应用

开放环境应用指实验室研究、构筑物内应用以外的应用。

4 总则

4.1 评价目的

微生物菌剂使用环境安全评价的目的是分析和预测以生态环境保护和污染防治为目的的微生物菌剂、及其使用过程中所存在的、可能对环境及人畜健康具有的潜在危险、有害因素，并提出合理可行的防范、应急与减缓措施。

4.2 评价原则

4.2.1 微生物菌剂使用环境安全评价必须遵循对应性原则，即内容和要求必须与微生物菌剂使用环境安全管理中相关的内容相对应，如管理目的、适用范围、评价以及检测机构的资质要求、以及对菌剂提供以及使用单位的安全要求等。

4.2.2 应该包括了菌剂产品的特性以及对生态环境和健康安全可能的风险识别、

目前国内外应用情况、使用环境的要求及其评价、运用过程中的监测、控制、废物处理和紧急反应计划,尽可能使微生物菌剂的使用环境安全评价覆盖使用过程的各个环节,力求评价工作的全面性。

4.2.3 微生物菌剂使用环境安全评价必须遵循前瞻性原则。要根据微生物的特性、应用类型、现有的检测水平和控制水平,就微生物菌剂及其使用过程中可能产生的对生态环境以及人畜健康潜在影响作出相应的风险评估,并对此过程中的不确定性进行描述和分析,以利在有新的数据时进行补充评价。

4.2.4 微生物菌剂使用环境安全评价必须遵循可操作性原则,要求微生物菌剂使用环境安全评价工作所涉及的检测技术、方法和标准,均为现行有效的检测技术、方法和标准,如国标方法(GB)、国际公认的标准方法(ISO、OECD、AWWA、EPA)等。

4.3 微生物菌剂使用环境安全评价主要内容

微生物菌剂使用环境安全评价应把以下几个方面作为使用环境安全评价工作重点。

4.3.1 微生物菌剂所含各菌种的致病性。

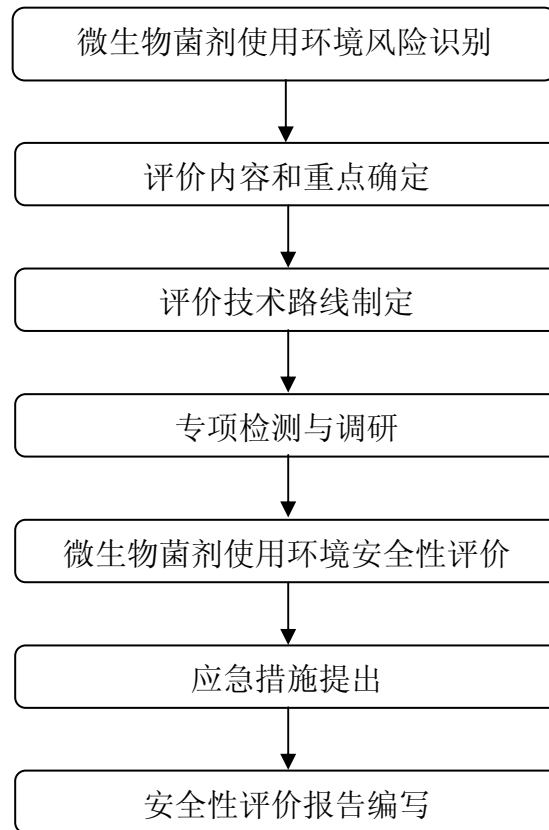
4.3.2 微生物菌种对抗生素的抵抗力以及应用这些抗生素对人畜健康进行预防和治疗的可能性。

4.3.3 微生物菌剂、及其使用过程中各类代谢产物、衍生物对生态环境及人畜健康可能产生的毒性(包括潜在毒性)影响。

4.3.4 微生物菌剂使用各环节中可能出现的影响生态环境及人畜健康的问题,及其相应合理可行的防范、应急与减缓措施。

4.4 微生物菌剂使用环境安全评价程序

微生物菌剂使用环境安全评价的程序主要包括:菌剂及使用环境的风险识别、确定评价内容和重点、选择及制定评价技术路线、专项检测和调研、使用环境安全性评价、提出相关应急措施、安全性评价报告编写等。见下图所示。



4.4.1 微生物菌剂使用环境风险识别

分析和预测微生物菌剂及其使用过程中各类代谢产物、衍生物对人畜健康及生态环境可能产生的致病性和毒性影响。

4.4.2 评价内容和重点确定

根据风险识别结果，确定微生物菌剂环境安全性评价的内容和重点。

4.4.3 评价技术路线制定

根据安全性评价的内容和重点，选择和确定微生物菌剂使用环境安全性评价的策略、依据和技术路线。

4.4.4 专项检测和调研

委托评价单位以外的、具有相关资质的单位和（或）实验室进行致病性和生态毒性影响检测，并对微生物菌剂在申报领域使用过程中的各类信息进行调查、分析和研究。

4.4.5 微生物菌剂使用环境安全性评价

在上述工作的基础上和申报使用领域内，进行微生物菌剂使用环境安全性评价。

4.4.6 应急工作预案提出

根据微生物菌剂的特性以及使用各环节中可能出现的影响生态环境及人畜健康的问题，提出相应合理可行的防范、应急与减缓措施。

4.4.7 评价报告编写

在整理、分析和研究各类数据和信息的基础上，编写微生物菌剂使用环境安全性评价报告。

5 评价内容

5.1 微生物菌剂评价

掌握微生物菌剂各菌种（株）的组成、来源、地理分布及自然习性等，确认各菌种（株）的鉴定和检测技术，对各菌种（株）病理学、生态学和生理学性状进行相关检测和评价，同时对微生物菌剂的毒性和代谢产物进行检测和评价。

5.1.1 菌剂名称。明确所评价微生物菌剂的商品名称，确定评价的主体和对象。

5.1.2 菌剂组成。明确构成微生物菌剂的各种菌种组成。

5.1.3 菌种来源及分类。描述构成微生物菌剂的各种菌种的来源及其分类特征。

5.1.4 鉴定和检测技术的描述。为了便于今后的监督管理，需要详细阐述菌剂各菌种的鉴定、检测技术以及手段。

5.1.5 鉴定和检测技术的敏感性、可信度（在定量方面）和特异性。根据微生物分类特点，提高监督管理时鉴定和检测准确性，需要加强对各菌种（株）敏感性和特异性的技术描述。与此同时，应选择性地对鉴定和检测技术进行必要的确认和评价。

5.1.6 生物的地理分布及自然习性的描述。详细描述构成微生物菌剂的各种菌种的地理分布及自然习性。

5.1.7 通过传代试验和分子生物学技术试验，证实微生物菌种的基因稳定性、及其可能的影响因素。即构成微生物菌剂的各种菌种遗传稳定性的检测及其评价结果。

5.1.8 病理学、生态学和生理学性状：

5.1.8.1 微生物危害分类。如微生物菌剂中含有病原微生物，则根据国务院卫生主管部门制定和公布的法定传染病名录，确定该病原微生物危害分类等级。如名

录中未见列入，则通过组织相关专家进行界定。

5.1.8.2 在生态系统中，不同环境条件下被检微生物的繁殖信息；

5.1.8.3 关于在生态系统中的生存信息，包括季节性及形成可存活结构；

5.1.8.4 致病性、产毒性、致敏性、病原体携带者（载体），可能的载体，宿主范围（包括非靶生物），潜伏病毒（前病毒）激活的可能，定居在其他生物体内的能力。通过动物的急性毒性试验、菌剂代谢产物的致突变试验、菌剂代谢产物有无有毒有害微量有机物和毒素的检测、以及相关资料文献的检索查询等方法 and 手段，来明确微生物菌剂对生态环境及人畜健康可能产生的影响。

5.1.8.5 抗药性。通过对微生物菌剂进行抗生素的抗药性试验，了解各组成菌种对抗生素的抵抗力，以及应用这些抗生素对人畜健康和生态环境安全进行预防和治疗的可能。对微生物菌剂进行抗药性试验应选用国内常用的抗生素作充分的检测。

5.1.9 微生物菌剂产品有无常见病原微生物检测。为了避免微生物菌剂产品在生产过程中受到病原微生物污染，并通过使用过程中的细菌增殖富集而产生对环境和人类健康的影响，需进行微生物菌剂产品中有无常见病原微生物如：志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等多种常见病原微生物的检测。

5.2 生态安全评价

针对微生物菌剂在以生态环境保护和污染防治为目的应用后产生的各类终产物可能对生态环境产生毒性和生物学影响，对各类产物需进行生态毒性的检测和评价。

5.2.1 生态毒性评价

根据微生物菌剂的使用环境以及终产物的最终排放趋向，可有所侧重地选择以下几个方面的内容对终产物进行检测，对终产物可能对生态环境局部或全面的影响作出评价。

- (1) 微生物毒性试验；
- (2) 藻类毒性试验；
- (3) 微型动物毒性试验；

- (4) 鱼类毒性试验；
- (5) 哺乳动物毒性试验；
- (6) 致突变试验。

如终产物排放在某些特定或敏感区域（如水源保护区等），则需增加该区域生态系统内的特定生物类群的群落水平毒性或效应研究。

监测方法见表 1。

表 1 微生物菌剂使用环境安全生态毒性测试方法

序号	项目	监测方法	方法来源
1	微生物毒性试验	发光菌急性毒性测定	GB/T15441
2	藻类毒性试验	藻类生长抑制测试	见附录 A
3	微型动物毒性试验	溞类急性毒性试验	见附录 B
4	鱼类毒性试验	鱼类急性毒性试验	GB/T13267
			见附录 C
5	哺乳动物毒性试验	小鼠经口急性毒性试验	GB/T 7919
			GB/T 15193.3
6	致突变试验	动物骨髓细胞微核试验	GB/T 7919
		Ames 试验	见附录 D

5.2.2 微生物评价

考虑到微生物菌剂本身含有病原微生物，以及对应用对象中卫生学微生物指标产生影响，须对终产物进行病原微生物以及卫生学微生物指示菌的检测。

5.2.2.1 对终产物中的卫生学微生物指示菌进行检测及评价。

5.2.2.2 如投放的微生物菌剂中含有病原微生物，则须对终产物检测该病原微生物在单位容积中的数量浓度及致病性强弱等。

5.2.2.3 针对终产物进入环境后，就是否诱变产生新的有害生物以及是否会增强原有生物的危害性做出预测和评价。

5.3 使用环境信息评价

微生物菌剂在以生态环境保护和污染防治为目的的使用过程中，使用环境的状态以及使用过程的管理等就微生物菌剂可能对人畜健康和生态环境安全产生

的影响起着相当的作用。因此，须对微生物菌剂在构筑物内使用以及在开放环境使用等的各类信息作出相关的评价。

5.3.1 构筑物内使用信息

5.3.1.1 构筑物的一般描述（材质、形状、结构、体积等）。

5.3.1.2 构筑物的安放地点及其周围环境的描述，特别是周围可能存在的敏感区域的描述。

5.3.1.3 微生物菌剂使用和处置的相关操作程序。

5.3.1.4 明确所有微生物菌剂的进料点和可能的释放点。

5.3.1.5 构筑物的安全隔离措施和效果。

5.3.1.6 微生物菌剂容器搬运、保存、处置程序。

5.3.1.7 操作人员的工作活动状况和安全防护措施。

5.3.1.8 操作（工作）人员的培训计划以及实施记录等。

5.3.1.9 废弃物（包括终产物）的处置计划、实施记录等。

5.3.1.10 微生物菌剂使用过程中泄露的应急措施，事故应急计划。

5.3.2 开放环境使用信息

5.3.2.1 使用的目的和方式

5.3.2.1.1 开放环境使用的描述，包括目的、过程以及可预见产物等。

5.3.2.1.2 日期及使用的计划时间，包括频率、持续时间等。

5.3.2.1.3 使用方法及程序的描述。

5.3.2.1.4 使用投放的数量、浓度等参数。

5.3.2.1.5 使用地开放环境中对其他非使用目的的各类活动的干扰。

5.3.2.1.6 使用及其各个环节中工作人员的防护措施。

5.3.2.1.7 使用后使用地点的处理、处置计划方案。

5.3.2.1.8 在使用结束后拟采取的消除或灭活的方法。

5.3.2.1.9 以前类似使用的信息及结果，尤其是在不同尺度和不同生态系统中的使用信息。

5.3.2.2 现场环境和背景

- 5.3.2.2.1 使用地的地理位置（必要时，加 GPS 定位）及标记描述。
- 5.3.2.2.2 使用现场与人类和其他重要生物群在物理学和生物学上的接近度。
- 5.3.2.2.3 使用现场与周边重要生境、保护区域以及环境敏感区空间的距离，生态类型的接近度。
- 5.3.2.2.4 使用地附近的人口密度及其分布等。
- 5.3.2.2.5 使用地周围以使用自然资源为基础的居民的经济活动。
- 5.3.2.2.6 使用现场以及可能受到影响的地区的气候特点。
- 5.3.2.2.7 使用地地理学、地质学及土壤学方面的特点。
- 5.3.2.2.8 使用地周边植物区系和动物区系，包括作物、家畜和迁徙物种。
- 5.3.2.2.9 对可能受影响的目标生态系统及非目标生态系统的描述。
- 5.3.2.2.10 将接受微生物菌剂的自然生境与建议释放地点进行的比较。
- 5.3.2.2.11 微生物菌剂的使用及其释放可能会对环境影响的区域发展计划。
- 5.3.2.3 开放环境使用时与环境的相互作用
 - 5.3.2.3.1 所使用微生物菌剂所含菌种存活、传播或作用的环境条件描述。
 - 5.3.2.3.2 微生物菌剂所含菌种进入环境后发生遗传变异的能力。
 - 5.3.2.3.3 微生物菌剂所含菌种进入环境后其有害性是否会产生影响（宿主范围、致病性、传染性、毒性、过敏性等影响）。
 - 5.3.2.3.4 微生物菌剂所含菌种在环境中的生活史。
 - 5.3.2.3.5 微生物菌剂对使用地土著生物群落结构的可能破坏或改变情况。
 - 5.3.2.3.6 微生物菌剂所含菌种及其代谢产物进入环境后是否会产生新的有害生物。
 - 5.3.2.3.7 微生物菌剂所含菌种及其代谢产物进入环境后是否会增强原有有害生物的危害性。
 - 5.3.2.3.8 在生物地球化学循环或生物循环过程中可能出现的复杂情况。

5.4 其他信息

为了全面了解微生物菌剂，体现评价工作的完整性，以及后续管理的需要，在展开上述评价工作的同时，应对微生物菌剂在以生态环境保护和污染防治为目的使用时的一些其他信息作出评价，如控制、废物处理和紧急反应计划，产品信

息等。

5.4.1 监测、控制、废物处理和紧急反应计划

5.4.1.1 监测技术

5.4.1.1.1 微生物菌剂所含各种菌种详细的分类鉴定技术资料阐述，以及跟踪和监测其影响的检测手段方法。

5.4.1.1.2 对所阐述的微生物菌种分类鉴定技术以及跟踪监测方法，进行监测技术的特异性、敏感性和可靠性分析。

5.4.1.1.3 针对微生物菌剂及其使用特点，提出检测的持续性、频度等建议。

5.4.1.2 释放的控制

5.4.1.2.1 为避免和/或减少微生物在释放地点或指定使用地点以外的区域内扩散，建议或需要所采用的方法和程序等。

5.4.1.2.2 保护释放地点不受未授权个人侵入的方法和程序。

5.4.1.3 废弃物处理

5.4.1.3.1 明确微生物菌剂使用过程中以及使用后所产生废物的类型，如废水、废气以及固体废弃物等。

5.4.1.3.2 根据处理能力，推算出废弃物的预期数量。

5.4.1.3.3 各类型废弃物可能存在的环境以及健康风险。

5.4.1.3.4 各类废弃物处理方法的描述，以及处理计划等。

5.4.1.4 应急预案

5.4.1.4.1 在发生意外时，控制微生物及其影响扩散的预案、方法手段以及程序等各类信息。

5.4.1.4.2 受污染地区的清理和处置方法及计划，例如：消除等。

5.4.1.4.3 在扩散过程中或扩散后暴露的植物、动物、土壤等生态环境因子的处理及净化技术描述。

5.4.1.4.4 确定和隔离受扩散影响的区域的方法。

5.4.1.4.5 在发生不良影响时保护人类健康和环境的计划等。

5.4.2 产品其他信息

- 5.4.2.1 微生物菌剂产品的名称。
- 5.4.2.2 制造商或经销商的姓名、地址等联系方式。
- 5.4.2.3 微生物菌剂产品的规格，以及使用的确切条件描述等。
- 5.4.2.4 微生物菌剂产品预期使用的领域和对象。
- 5.4.2.5 一旦发生微生物意外释放或错误使用拟采取的应急措施等。
- 5.4.2.6 微生物菌剂产品保存及处理的方法。
- 5.4.2.7 微生物菌剂产品估计产量。
- 5.4.2.8 为防止在储藏过程中或后期包装内生物的意外释放，建议使用的微生物菌剂产品包装和运输方式等。
- 5.4.2.9 使用的标签。

5.4.3 产品在其他国家和地区的使用状况

5.4.3.1 国外情况

- 5.4.3.1.1 微生物菌剂产品在国外所获得的使用许可证以及其他正式使用许可证明材料。
- 5.4.3.1.2 在国外微生物菌剂产品使用的数量、规模，以及相关生物安全信息。
- 5.4.3.1.3 微生物菌剂产品在国外使用中的应用单位，含明确的通讯地址。

5.4.3.2 国内情况

- 5.4.3.2.1 微生物菌剂产品在国内其他地区或部门所获得的使用许可证以及其他正式使用许可证明材料。
- 5.4.3.2.2 在国内其他地区微生物菌剂产品使用的数量、规模，以及相关生物安全信息。
- 5.4.3.2.3 微生物菌剂产品在国内其他地区使用中的应用单位，含明确的通讯地址。

6 报告编制

为统一和规范微生物菌剂使用环境安全性评价报告的编制，微生物菌剂使用环境安全性评价报告须体现微生物菌剂评价，微生物菌剂及其使用过程中环境风险识别，评价的内容和重点，评价的策略、依据和技术路线，环境生态安全性评价，应急措施，以及评价结论和需要补充说明的问题等。

6.1 报告主要内容

6.1.1. 微生物菌剂的评价主要包括：微生物菌剂产品的各菌种（株）来源及其构成、生物学性状、技术及其使用特点、应用类型和使用范围，以及对人畜健康的影响等。

6.1.2 微生物菌剂及其使用过程中环境风险识别。根据微生物菌剂的菌种特点、应用类型和使用范围，来界定微生物菌剂及其使用过程中可能出现的环境与人类健康的风险。

6.1.3 微生物菌剂使用环境安全性评价的内容和重点。根据风险识别结果、以及相关的管理要求，确定使用环境安全性评价的内容和重点。

6.1.4 微生物菌剂使用环境安全性评价的策略、依据和技术路线。主要包括满足各环节安全性评价要求的前提下，确定与此相关的检验、检测方法和技术。

6.1.5 使用环境生态安全性评价。根据获得的各环节的信息，以及检验、检测结果，依据相关的规范标准，对微生物菌剂在应用领域内的使用环境生态安全性作出评价。

6.1.6 应急措施。针对微生物菌剂的特性以及使用各环节中可能出现的影响生态环境安全和人畜健康的问题，提出相应合理、可行的防范、应急与减缓措施。

6.2 评价结论的编写

微生物菌剂使用环境安全性评价结论是对申报微生物菌剂的全部评价工作的总结。编写时应在概括和总结全部评价工作的基础上，扼要阐明申报微生物菌剂的生物属性、健康危害特性和生态环境危害特性，使用范围以及相关建议及防护措施。

6.2.1 编写要求

要求文字简洁、准确，分条叙述，以便阅读。

6.2.2 编写内容

- (1) 评价的依据；
- (2) 评价的方法；
- (3) 评价的结论；
- (4) 需要补充说明的问题。

7 检测内容及要求

7.1 检测实验室

从事微生物菌剂使用环境安全性检测的机构，应通过相关项目计量认证或者国家实验室认可的专业机构；拥有部级以上同类资质认定的单位或机构，如部级重点实验室等。

7.2 检测方法

当几种等效方法同时存在时，检测机构应根据自身条件、受试物等实际情况，选择其中相应的方法进行检测。

7.3 必备资料

7.3.1 微生物菌剂使用环境安全性检测前须知晓的微生物菌剂相关特性及数据，如研发及试用过程获得的相关数据信息。

7.3.2 评价机构对检测内容和项目的要求等。

7.4 检测报告

检测报告应包括：

- 7.4.1 试验基本信息;
- 7.4.2 检测机构名称及一般信息;
- 7.4.3 试验的准确起止日期;
- 7.4.4 微生物菌剂名称;
- 7.4.5 检测方法及标准;
- 7.4.6 试验条件、剂量或浓度等;
- 7.4.7 检测结果以及评价结论;
- 7.4.8 检测机构加盖印章（封面和骑缝）。

附录 A

(规范性文件)

藻类生长抑制试验

藻类是水体中的初级生产者，也是水生食物链的基础环节。在光合作用下它们吸收水中的无机营养盐和二氧化碳，制造有机物。它们的存在无论是水体生产能力还是水体污染的自净作用均具有十分重要的意义。因此，在研究读物或废水对水环境的影响时，都把藻类测试作为一种重要内容。

藻类生长抑制试验的目的是确定受试物对单细胞藻类生长的影响，可用于受试物对藻类短期暴露效应的初评。当暴露使藻类的生长率低于未经暴露的对照组时，称为藻类生长抑制。

单细胞藻类个体小，世代时间以小时计算，采用本方法可以在较短时间内得到受试物（化学品或环境样品）对藻类许多世代及在种群水平上的影响。所得结果可反映受试物对水体中初级生产营养级影响。

将不同浓度的受试物加到处于对数生长期的藻类培养物中，在规定的条件下进行培养，每隔 24h 测定藻类种群浓度或生物量（重量）。试验时间不少于 96h。与对照相比较可确定生长抑制情况。

1. 受试化学品的必备资料

水溶解度	水溶液中的定量分析方法
蒸汽压	在水中和光中的化学稳定性
结构式	正辛醇/水的分配系数
纯度	快速生物降解实验结果

2. 仪器设备

- ① 一般的藻类试验室设备。
- ② 试验容器：如三角瓶等，根据需要可选择一定容量的试验容器，同一批试验的容器应规格一致。为保证 CO₂ 的交换，要有一定的表面积比。125ml 的三角瓶中测试液体积应为 40-60ml, 250ml 三角瓶中为 70-100ml, 500ml 三角瓶中为 100-150ml。
- ③ 照度计：球面照度计和普通照度计。
- ④ 培养设备：建议使用温度范围为 21-25℃ ± 2℃ 且连续均匀光照，光谱范围为 400-700nm，光通量为 0.72 × 10²⁰ 光子/(m² · s) 的培养箱（用球面测量计测定可产生光强为 8000lux 的光），光照周期，即光暗比为 12: 12 或 14: 10。
- ⑤ 机械振荡器 100 ± 10 次/min 或定时人工摇动若干次。
- ⑥ 培养容器应用棉塞、海绵塞、滤纸、纱布、(2-3 层)、锡箔纸封闭。挥发性化学品试验中，应采用磨口玻璃塞完全密闭。
- ⑦ 检测细胞浓度的设备，如电子颗粒计数仪、荧光计、分光光度仪、比色计、显微镜。
- ⑧ 在使用分光光度仪测定细胞浓度时，为了有效测定，必须使用至少 4cm 的吸收池作一曲线。

3. 受试生物

建议使用生长快速的绿藻品种，以便于培养和试验，如：羊角芽藻 (*Selenastrum capricornutum*)、斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*)、普通小球藻 (*Chlorella Vulgaris*)。若使用其他藻类，应标出拉丁名。

4. 受试生物

准备

(1) 培养基

可用于培养藻类的培养基很多，其成分和浓度各不相同。本方法建议淡水藻类可用表 5-3-1 中推荐的培养基。经空气平衡后，培养基的 pH 接近于 8。亦可使用其他培养基，但对必要成分限制如下：

$P \leq 0.7 \text{ mg/L}$ ； $N \leq 10 \text{ mg/L}$ ；螯合剂 $\leq 10^{-3} \text{ mmol/L}$ ；硬度 $(\text{Ca} + \text{Mg}) \leq \text{mmol/L}$ 。

表 5-3-1 藻类培养基

营养盐	贮备液浓度	测试液中最终浓度
贮备液 1：常量营养盐		
氯化铵(NH_4Cl)	1. 5 g/L	15 mg/L
氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1. 2 g/L	12 mg/L
氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1. 8 g/L	18 mg/L
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1. 5 g/L	15 mg/L
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0. 16 g/L	1. 6 mg/L
贮备液 2：Fe-EDTA		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg/L	80 $\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/L	100 $\mu\text{g/L}$
贮备液 3：微量元素		
硼酸(H_3BO_3)	185 mg/L	185 $\mu\text{g/L}$
氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	415 mg/L	415 $\mu\text{g/L}$
氯化锌(ZnCl_2)	3 mg/L	3 $\mu\text{g/L}$
氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1.5 mg/L	1.5 $\mu\text{g/L}$
氯化铜($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01 mg/L	0.01 $\mu\text{g/L}$
钼酸钠($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	7 mg/L	7 $\mu\text{g/L}$
贮备液 4：NaHCO_3		
NaHCO_3	50 g/l	50 mg/L

配制好的营养盐类贮备液经 0.2 μm 滤膜过滤或高压灭菌 (120°C, 15min) 后 4°C 避光冷藏保存。贮备液 4 只能用滤膜过滤灭菌。

(2) 培养基的配制

配制培养基时可将营养盐类按所需浓度直接加入无菌的蒸馏水或去离子水中。应按顺序逐一加入，待一种盐类完全溶解后再加另一种。为了方便和节省时间，亦可先后分别配制各类营养盐类的浓贮备液（如浓缩 1000 倍）。经过滤或灭菌后避光冷藏保存，当需要配制培养基时，将一定量的浓贮备液依次摇匀加入到蒸馏水或去离子水中即可。

当保存藻种需要使用固体培养基时，可在灭菌前加入 1.5%-2.0%（重量/体积比）的琼脂到培养基中。

(3) 贮备培养

得到纯藻种后，需要加以保存，以备试验使用。

藻种可在试管内固体培养基斜面上保存。在培养基中加入 1.5%-2.0% 的琼脂，灭菌后倒入试管，冷却成斜面，然后接种藻类，棉塞封闭，在较低的光照和温度条件下可保存较长时间。大约每隔 1 个月至 2 个月转接一次。

如果经常进行试验，贮备培养物应在液体培养基中保存。在三角瓶中加入约 100ml 培养

基，接种藻类，在试验要求的相同温度和光照条件下培养，7-10d 转接一次，以保持培养物生长良好，随时有足够的数量可用于试验。

应该经常检查贮备培养中藻类的生长情况，包括形态和生长速度，以及有无菌类和其他藻类的污染。

一般当藻类进入停滞生长时期时应转接。培养物有畸形生长或受到其他藻类活菌类的污染①②①①①②染时应废弃或采取纯化、复壮等措施。

(4) 预培养

自贮备培养物中取出一定量的藻液，接种到新鲜的无菌培养基中，接种藻细胞浓度大约为 10^4 个/ml ($\pm 25\%$)。在试验要求和相同条件下培养。应使藻类在 2-3d 内达到对数生长，然后再次转接到新鲜培养基中。如此反复转接培养 2-3 次，经检查藻类生长健壮并正处于对数生长期时即可用来制备试验种需要的藻类试验液。

每次试验中的藻类试验液必须来自同一个贮备培养物。已经在以前的毒性试验中使用过的培养物不得再次使用。

(5) 设定平行和对照

正式试验中每个试验液浓度至少要设置三个平行样，每一系列设两个对照样。也可根据需要增加浓度或减少平行的数量。

当使用助溶剂增加受试物的溶解度时，对照组中助溶剂应与测试液中助溶剂浓度最高时一致。

试验操作

(1) 预试验（确定浓度范围试验）

为确定正式试验中受试物的浓度范围，可以先进行一次预试验。

预试验的浓度可按对数间距排布，最低浓度应为受试物的检测下限，最高浓度应为饱和浓度。无需设平行样。测定项目个方法可简化，实验时间也可缩短。

如果预试验中在最高浓度测点，藻的生长抑制低于 50%，或者在最低浓度测点中藻的生长抑制高于 50%，可不必再进行正式试验。

如果有必要进行正式试验，可根据与试验的结果确定正式试验是受试物的浓度范围和浓度间距。

(2) 异溶于水的化学物质的正式试验

① 受试物试验液：用经过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后的培养基配制受试化学品的贮备液，其浓度为测试时所需最高浓度的二倍。

用此贮备液稀释配制一系列不同浓度的受试物试验液，其浓度也分别为测试时所需浓度的二倍。试验浓度可按 10, $n/10$ 或 $10^{n/2}$ 的几何级数或等对数间距设计。

试验前应测定受试液的 pH 值，必要使用 HCl 或 NaOH 液将 pH 调整为 7.5 ± 0.2 。

试验结束时测定受试物的浓度。

② 藻试验液：藻试验液是用于进行试验的藻培养物，对藻类进行预培养后，镜检其生长情况，并计数细胞浓度。然后用培养基稀释至藻细胞浓度为 2×10^4 个/ml，即成为可用于试验接种的藻试验液。

③ 测试液：测试液是正式用于测试的，含有藻试验液和受试物试验液的液体。

现在每个三角瓶（或其他培养容器）中加入 50ml 藻试验液，然后再添加 50ml 受试物试验液。

对照组瓶中不加受试物试验液而只添加 50ml 培养基。将各瓶摇动均匀后放入培养装置，试验正式开始。

④ 藻类生长状况的测定：实验开始后，每隔 24h，即在 24、48、72h 时，从每个瓶中取样进行生长测定。测定项目包括藻类细胞浓度、光密度或叶绿素。最好同时测定

前两项，如果工作量过大，也可只测定细胞浓度。当使用颗粒计数仪或分光光度计进行测定时，过滤得培养基分别作为背景和空白。试验开始和试验 72h 后，应测定 pH 值。试验期间溶液 pH 偏差大于 1 个单位是不正常的。

(3) 有限水溶性化学物质的正式试验

如果受试物的水溶性低于 1000mg/L，试验操作应作如下修改：

①受试物试验液：用适当的溶剂制备受试物的贮备液，其浓度应使测试时所需最高浓度的 10^4 倍。溶剂应对藻类生长无影响，并且在试验溶液中的含量最高不得超过 100mg/L。

要设置助溶剂对照，其浓度应与试验液中助溶剂的最高浓度一致。

②藻类试验液：用培养基将经过与培养的藻类培养物配制藻试验液，使细胞浓度为 10^4 个/ml。

③测试液：每个三角瓶中加入 100ml 藻种液，再添加 $10\mu\text{l}$ 溶剂。其他步骤同易水溶性化学品。

(4) 挥发性化学物质的正式试验

目前，还没有被普遍接受的方法来测试挥发性物质。当已知一种物质有挥发倾向时，应使用密封的磨口烧瓶测试。应设法测定溶液中受试物的量，最后应说明以挥发性化学品的测试结果是在密封系统中进行的。

(5) 废水或环境水样的正式试验

当受试物为废水或环境水样时，水样必须密封、低温存放 $0-4^{\circ}\text{C}$ 。样品瓶中应充满水养不留空气，尽量使样品毒性变化较小，而且在试验前的保存时间越短越好。测试废水样品或环境水样之前要预先振摇。可直接用水样作为毒性试验液；如果水样毒性过大，也可使用稀释水配成适当浓度的试验液，对于含有难溶性毒物的水样，同时可以使用助溶剂或乳化剂。

如果水样所含毒物在一段时间内不稳定，必须定期分析。

废水的稀释液浓度可用体积百分比表示。

(6) 藻类生长测定方法

测定藻类生长的指标和方法很多，本方法推荐采用以下测定方法：

①细胞计数：在显微镜下，用 0.1ml 计数框或血球数板对藻细胞的数量计数。用计数框时可采用视野法，即对显微镜视野中的所有细胞计数。放大倍数 40×10 。每片至少计数 10 个视野，如果藻细胞密度小，则要适当增加计数视野。藻数按视野累加。每次计数（同一批取样的样品）应采用相同方法（视野数目、放大倍数等）。

每一样品至少计数两次，如计数结果相差大于 15%，应予重新计数。如工作量过大，可先取样，用鲁哥氏液固定后保存，留待以后计数。镜检计数工作量较大，有条件时可采用电子颗粒计数仪。

②光密度：取一定量的测试液在分光光度计上测定其光密度，波长可选用 650、663nm 或其他波长，亦可用荧光光度计测定。

③叶绿素：样品经离心或过滤后，用丙酮、乙醇或其他溶剂萃取，进行分光测定，亦可用荧光光度计测定。

5. 质量保证和质量控制

①本方法适用于多种淡水绿藻。

②本方法适用于水溶性且在试验条件下能保留在水中的物质。如果需要适用助溶剂（有机溶剂）来获得所要求的浓度，该助溶剂在水中的浓度不得超过 100mg/L，适用乳化剂或分散剂时，其浓度应不影响光透性。

③当受试物是有限水溶性物质时，不适于对 EC_{50} 进行定量测定。本方法不适用于直接干扰藻类生长测定的物质。

④试验开始的3d内, 对照组藻细胞浓度至少应增加16倍。

⑤因挥发损失的受试物不得超过20%, 如果已(或可能)超过, 则应在密闭瓶内, 在较低的标准产量下进行试验。

⑥除非受到受试物的理化性质或生物特性的限制, 浓度设置应做到, 在某一浓度下试验组与对照组相比, 生长率没有显著下降, 而且另一浓度时, 96h的生长抑制应高于50%。

⑦在试验室最好使用推荐的藻种类, 以利于提高试验结果的可比性和可重复性。若选其他种类应在试验报告中写明方和说明理由。

6. 数据和报告

(1) 数据处理

将测试液和对照组中细胞浓度与受试物浓度、测试时间一起制表。绘制每个受试物浓度和对照组的细胞浓度平均值与时间关系得生长曲线。可用下面所推荐的方法确定浓度效应关系。

①浓度的换算: 把显微镜视野计数结果换算为细胞浓度N:

$$N = \frac{C_s}{F_s * n} * P_n * 10$$

式中: N——每瓶试样中藻的浓度(个/ml);

C_s ——计数框面积(20mm*20mm);

F_s —— πr^2 (视野面积);

r——测量的视野半径值(mm);

n——视野数;

P_n ——n个视野藻细胞数累加值。

②生长曲线下面所包围面积的比较: 生长曲线以下的面积可以按下式计算:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} * t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} * (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} * (t_n - t_{n-1})$$

式中: A——生长曲线以下的面积;

N_0 —— t_0 时刻每毫升藻液中的细胞数;

N_1 —— t_1 时刻每毫升藻液中所测得的细胞数;

N_n —— t_n 时刻每毫升藻液中所测得的细胞数;

t_1 ——试验开始后第一次计数的时间;

t_n ——试验开始后第n次计数的时间。

每一受试物浓度细胞生长抑制的百分率 I_A 是对照组生长曲线下所包围的面积(A_c)与每个受试物浓度生长曲线下面所包围的面积 A_t 之差计算得到。见下式:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} * 100$$

在半对数坐标纸上或半对数概率之上, 绘制 I_A 与相应浓度之间的关系曲线。若在概率纸上绘制的点可以拟合为一条直线, 或可假设为一个正态分布时, 应给出经计算所得的回归线。

可过 $I_A=50\%$ 的点画一条过回归线且与横轴平行的直线, 该线与回归线的焦点所对的浓度值为 EC_{50} 值。为了准确表示此值与本计算方法的关系, 建议使用符号 E_bC_{50} 表示。在本方法中, 指定用 E_bC_{50} (0h-72h) 表示在24h、48h、72h测定的 E_bC_{50} 值。其他EC值如 E_bC_{10} 也可以从绘制的相应浓度曲线得到。

③生长率比较: 对数生长期藻类平均特定生长率(μ)用下式计算:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

平均特定生长率也可以用 $\ln N$ 对时间的回归线的斜率导出。

用每一受试物浓度与对照组相比所得到的生长率下降百分数对对数浓度左图，可直接从图上读出 EC_{50} 。为了表明此项 EC_{50} 是由该方法求出的，建议采用符号 E_rC_{50} 表示。必须标明相应测定时间，如相对于 24h 和 48h 的试验值用符号 $E_rC_{50}(24h-48h)$ 表示。

注意：生长率是一对数项，生长率微小变化可能会导致生物量的较大变化。 E_bC 和 E_rC 值在数值上是不可比的。

(2) 结果评价

糟了生长抑制毒性评价的分级标准见表 5-3-2。

表 5-3-2 藻类生长抑制毒性分级标准

96h EC_{50} (mg/L)	< 1	1-10	10-100	> 100
毒性分级	极高毒	高毒	中毒	低毒

(3) 编写报告

报告应包括试验名称、目的、试验原理、试验的准确起止日期，以及：

- 1) 受试物：名称、来源、成分表达式、批号、纯度等级、理化特性数据。
- 2) 受试生物：名称、来源、室内培养号和株号、培养基、培养方法。
- 3) 试验条件：
 - ① 试验开始和结束日期，试验持续时间。
 - ② 温度。
 - ③ 培养基组成。
 - ④ 试验开始和结束时溶液的 pH 值，若观察到 pH 值偏差大于 1 个单位应给出解释。
 - ⑤ 用于溶解受试物的溶剂和方法及测试液中溶剂浓度。
 - ⑥ 光强和光质。
 - ⑦ 测试浓度（实测值或规定值）。
- 4) 试验结果
 - ① 每一个测试点上每瓶中的细胞浓度和测试细胞浓度的方法。
 - ② 细胞浓度的平均值。
 - ③ 每一浓度的时间—生长曲线图。
 - ④ 浓度效应曲线图。
 - ⑤ EC_{50} 值和计算方法。
 - ⑥ 无可观察效应浓度 (NOEC)。
 - ⑦ 其他的观察效应（如细胞色泽变化、形态大小变化、粘连或聚结情况、死亡情况、抑藻或杀藻效应等）。
- 5) 结果讨论。

附录 B

(规范性文件)

溞类活动抑制实验

溞类是枝角类 (Cladocera) 的通称, 在分类上属节肢动物们 (Arthropoda), 甲壳动物纲 (Crustacea), 鳃足亚纲 (Branchiopoda), 双甲目 (Diplostraca), 枝角亚目 (Cladocera)。溞类广泛分布在淡水中, 海水中种类较少。据调查, 我国共有淡水溞类 136 种。溞类是水体中初级生产者 (藻类) 和消费者 (如鱼类) 之间的中间环节, 能滤食水中碎屑和菌类, 对水体自净起着重要作用, 同时又是鱼类的天然诱料。

溞类繁殖快, 生活周期短, 培养简便, 对许多毒物敏感, 因此世界各国广泛使用溞类进行水生生态毒理学研究。

1. 受试化学品必备资料

水溶解度	水溶液中的定量分析法
蒸汽压	在水中和光中的化学稳定性
结构式	正辛醇/水的分配系数
纯度	快速生物降解试验结果

2. 仪器设备

- ①溶解氧测定仪。
- ②水硬度计。
- ③体视显微镜。
- ④pH 计。

⑤试验容器或装置。试验容器最好是全玻璃制品。或由其他化学惰性材料制成。容积适当, 规格一致, 便于清洗。

3. 数据和报告

目前世界上用于毒性试验的溞类种类很多。常用的种类是:

大型溞	<i>Daphnia magna</i> Straus
蚤状溞	<i>Daphnia pulex</i> Leydig
隆线溞	<i>Daphnia Carinata</i> King

由于大型溞是溞科中个体最大的种类, 体长可达 6mm, 生殖量多, 是毒性试验使用最广的一种。国际标准 ISO 6341 和我国国家标准 GB/T 16125—1995 都把大型溞为准试验动物。

使用大型溞或其他适宜的溞类, 试验开始时, 溞龄应不超过 24h。试验室繁殖、表观健康, 有明确来历 (繁殖方式、预培养) 的溞种才可用于试验。

4. 试验程序

(1) 准备

①实验用水: 适于培养溞类的任何水, 不论是天然水或标准稀释水 (见附录), 都可用于测试实验。建议在试验前使用的培养水应与试验用水相似, 以利于溞类的适应。

标准稀释水应容许溞类在其中生存至少 48h, 并尽可能检查稀释水中不含有任何已知对溞类有毒的物质, 例如: 氯、重金属、农药、多氯联苯等。

②受试物溶液配制: 取一定体积受试物的贮备液, 加入稀释水, 定容, 制备成经验要求弄得

的试验液。

对于受试化学品贮备液的制备，可将已知量的受试物溶于一定体积的稀释水中，贮备液应于当天配制，对于高稳定性物质，最多允许配置供 2d 使用的贮备液。

配置贮备液时，难溶于水的物质可用适当的方法将其溶解或分散，包括采用超声波装置和使用对蚤低毒的有机溶剂、乳化剂和分散剂等物质，并应加设助溶剂对照试验。助溶剂对照组的溶剂浓度应为试验溶液中最高浓度。

对于工业废水，以原水样为试验液（100%），用稀释水按百分数（百分率）配制各浓度。采集废水样品时，应将水样瓶充满水样不留空气，样品采集后应立即进行试验，尽可能缩短水样保存时间，如果样品采集后 6h 之内不能进行试验，则必须将水样在 0-4℃ 保存。

对于工业固体废物，首先磨碎，按 1: 10 比例加入去离子水，摇匀后浸泡 24h，滤纸过滤。其溶解部分为被测工业固体废物的浸出原液（100%），在用稀释水按百分数配制成各浓度。

(2) 试验操作

① 预试验：在正式试验之前，先进行较大范围浓度系列（如 1、10、100mg/L）的初步试验，为正式试验设置受试物体的浓度提供依据。预试验中每个浓度放五只幼蚤，持续时间 24h（或 48h）。用静态方式进行，不设平行组。

② 正式试验：根据预试验的结果，在包括使蚤全部产生活抑制的最低浓度和未产生活抑制的最高浓度之间以几何级数设置浓度系列。一般至少设五个浓度组，如 2、4、8、16、32mg/L。最高试验浓度不应超过 1g/L。必须设置空白对照。若使用助溶剂，尚应增设助溶剂对照组，其助溶剂用量同最高浓度组。

每个浓度组和对照组至少要用 20 只蚤，最好分成 4 组，每组五只。试验期间不要喂食。最大负荷为 1 只蚤/2ml 试验液。试验温度应在（18-20℃）±1℃。光暗周期无特殊要求建议毒性试验在自然光照或相当于自然光照下进行，每天照明 10h 左右。

稀释水在加入到受试物中之前曝气。试验开始和结束时，应测定对照组和试验液中溶解氧的浓度。

在试验开始和结束时，应测定对照组和试验液中的 pH 值。不可调节试验液中的 pH 值。如有条件，应测定受试物的实际浓度。

试验期间，经常观察蚤类的活动与生存情况，应及时取出死蚤。记录 24h 和 48h 蚤类累计活动抑制数。最好出现 0%、<50%、>50% 和 100% 的蚤类抑制的试验结果。

5. 质量保证与质量控制

① 实验结束时，试验溶液中的溶解氧浓度应高于空气饱和值的 60%。

② 试验结束时，对照组中活动受抑制蚤数应少于 10%。

③ 受试物实测浓度不能低于设置浓度的 80%。

④ 定期测定参比物的 24hEC₅₀，以检查供试蚤的敏感性。满足参比物重铬酸钾（分析纯）的 24hEC₅₀ 值 ≤ 2.0mg/L，蚤敏感度符合要求。

6. 数据处理与报告

(1) 数据处理

用表格形式列出 24h 和 48h 对照组和各处理组试验蚤个数、活动抑制蚤数个数及百分率。以受试物处理浓度为横坐标，死亡率为纵坐标。在计算机或对数-概率纸上作图，通过图解内插法或计算法求出 24h 和 48h EC₅₀ 估计值，并计算 95% 的置信限。

(2) 结果评价

蚤类的毒性可按以下标准分级（表 5-3-3）

表 5-3-3 溞类急性活动抑制毒性分级标准

48h EC ₅₀ (mg/L)	≤1	1-10	10-100	≥100
毒性分级	极高毒	高毒	中毒	低毒

(3)编写报告

报告应包括：试验名称、目的、试验原理、试验的准确起止日期，以及：

1) 受试物：对于化学品，其化学名称、其他名称（商品名等）、化学式、成分、来源(制造厂商等)、批号、纯度等级以及理化性质等；对于废水、废渣等环境样品，其来源、采样地点、采样时间等。

2) 试验用溞：溞类名称、来源、预培养、繁殖方式（包括食物来源、种类和数量、喂食频次）、溞龄、健康状况等。

3) 实验条件：

①使用的助溶剂、添加剂及其浓度。若观察到试验溶液不能保持均一和稳定，对结果的解释应慎重，并注明这些结果不能重复。

②稀释水：来源、理化特性、包括硬度、pH 值、Ca/Mg、Na/K、碱度等。

③试验温度。

④光、暗周期。

⑤最好用表格列出试验期间 pH 值和溶解氧的全部测定值。

⑥若使用参比物，记录其测试结果和数据。

⑦试验容器：容积、质地、密闭方式、溶液体积、每个容器中受试物的数量，每个浓度测试容器的数量，试验容器的处理，受试物在稀释水中的引入。

⑧试验液的更换情况，更换顺序及方案、流动情况，受试物的输送系统及流速。

⑨受试物的实测浓度和测定日期。

4) 试验结果：

①溞类无活动抑制（EC₀）的最高浓度。

②100%溞产生活活动抑制（EC₁₀₀）的最低浓度。

③24h、48h 时的每个浓度的累计死亡率。

④24h、48h 时的 EC₅₀，及其 95%的置信限。

⑤浓度-抑制率曲线图。

⑥对照组抑制率。

⑦试验期间，可能会影响试验结果的隐患。

⑧对照组和浓度组溞类的其他异常反应。

⑨如果进行参比物试验，报告试验结果。

5) 结果讨论。

7 标准稀释水的配制

新配制的标准稀释水 pH 值为 7.80±.2，硬度为 250mg/L±35mg/L（以 CaCO₃ 计），Ca/Mg 的比例接近 4: 1，溶解氧浓度在空气饱和值的 80%以上，不含有任何对大型溞有毒的物质。人工稀释水用电导率≤ 10 μ S/cm(1mS/m)的蒸馏水或去离子水（以下简称水）按下述方法配制：

①氯化钙溶液：将 11.76gCaCl₂·2H₂O 溶解于水中，并稀释至 1L。

②硫酸镁溶液：将 4.93gMgSO₄·7H₂O 溶解于水中，并稀释至 1L。

③碳酸氢钙溶液：将 2.59gNaHCO₃ 溶解于水中，并稀释至 1L。

④氯化钾溶液：将 0.23gKCl 溶解于去离子水中，并稀释至 1L。

取以上四种溶液各 25ml 加以混合并用水稀释至 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。

附录 C

(规范性文件)

鱼类急性毒性试验

鱼类是水生食物链的重要环节，也是水体中重要的经济动物。鱼类毒性试验在研究水污染及水环境质量中占有重要地位。通过鱼类急性试验可以评价受试物对水生生物可能产生的影响，以短期暴露效应表明受试物的毒害性。因此在人为控制的条件下，所进行的各种鱼类毒性试验，不仅可用于化学品毒性测定，水体污染程度检测、废水及其处理效果检查，而且也可用于制定水质标准、评价水环境质量和控制废水排放提供科学依据。

1. 受试物及必备资料

对于化学受试物，要求以下必备资料：

水溶解度	在水中和光中的稳定性
蒸汽压	pK _a 值
结构式	正辛醇-水的分配系数
纯度	快速生物降解试验结果
水溶液中的定量分析方法	

对于环境样品，采集样品时应将采样瓶充满水样不留顶上空间，样品采集后立即进行试验。如果样品采集后 6h 之内不能进行试验，则必须将水样在 0-4℃ 下保存，废水稀释浓度可用体积百分比表示。

2. 仪器设备

①溶解氧测定仪。

②水硬度计。

③温度控制仪。

④pH 计。

⑤分析天平。

⑥试验容器或装置：化学惰性材料制成的水族箱或水槽，规格一致，体积适宜。如使用流水试验装置，应具有控温、充气、流速控制等功能。

⑦抄网：尼龙或其他化学惰性材料制成。对照组和试验组容器分用。

3. 受试生物种或材料

可选用一个或多个鱼种，根据需要自行选择。但建议结合相应得标准来确定鱼种：如全年可得、易于饲养、试验方便、相关的经济、生物或生态因素等。试验用鱼应健康，无明显畸形。还应考虑来源可靠稳定。建议受试物为化学品时采用表 5-3-4 中的推荐鱼种；受试物为环境样品时，除可采用上述推荐鱼种外，亦可采用当地具有代表性的鱼种。如白鲢（*Hypophthalmichthys molitrix*），鳊鱼（*Aristichthys nobilis*），草鱼（*Ctenopharyngodon idellus*），鲤鱼（*Cyprinus carpio*）等。

表 5-3-4 推荐的试验用鱼及条件

鱼种	试验温度（℃）	试验鱼的全长（cm）
斑马鱼（ <i>Brachydanio rerio</i> ）	21-25	2.0±1.0
稀有鮡鲫（ <i>Gobiocypris rarus</i> ）	21-25	2.0±1.0
剑尾鱼（ <i>Xiphophorus helleri</i> ）	21-25	2.0±1.0

用其他淡水鱼、海洋及半咸水鱼做试验时，试验条件，特别是关于稀释水用量、水质及温度应做相应的改变，并提出相应的试验条件。

4. 试验程序

准备

(1) 供试鱼的驯养

①供试鱼用于试验之前，必须在试验室至少暂养 12d。临试验前，应在符合下列条件的环境中至少驯养 7d:

水：与试验用稀释水水质相同；

光：每天 12-16h 光照；

温度：与试验鱼种相适宜；

溶解氧浓度：高于空气饱和值的 80%；

喂养：每周三次或每天投食，至试验开始前 24h 为止。

②驯养开始 48h 后，记录死亡率，并按下列标准处理：

7d 内死亡率小于 5%，可用于试验；死亡率在 5%-10% 之间，继续驯养 7d 死亡率超过 10%，该组鱼全部不能使用。

(2) 试验用水

使用高质量的自然水或标准稀释水，也可以使用饮用水（必要时应除氯）。水的总硬度为 10-250mg/L(以 CaCO_3 计)，pH 为 6.0-8.5。

(3) 标准稀释水的配制

配制标准稀释水，所用试剂必须是分析纯，用全玻璃蒸馏水或去离子水配制。

①氯化钙溶液：将 11.76g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解于水中，稀释至 1L。

②硫酸镁溶液：将 4.93g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解于水中，稀释至 1L。

③碳酸氢钠溶液：将 2.59g NaHCO_3 溶解于水中，稀释至 1L。

④氯化钾溶液：将 0.23g KCl 溶解于水中，稀释至 1L。

蒸馏水或去离子水的电导率应 $\leq 10 \text{Ms/cm}$ 。

将这四种溶液各 25ml 加以混合并用水稀释至 1L。溶液中钙离子和镁离子的总和是 2.5mmol/L。Ca: Mg 的比例为 4: 1，Na: K 比为 10: 1。

稀释用水需经曝气直到氧饱和为止，储存备用。使用时不必再曝气。

(4) 试验溶液

①将受试物贮备液稀释成一定浓度的受试物溶液。低水溶性物质的贮备液可以通过超声分散或其他适合的物理方法配制，必要时可以使用对鱼毒性低的有机溶剂、乳化剂和分散剂来助溶。使用这些物质时应加设溶剂对照组，其助溶剂含量应为试验组使用助溶剂的最高浓度，且不得超过 100mg/L 或 0.1ml/L。

②不需调节试验溶液的 pH。如果加入受试物后水箱内水的 pH 有明显变化，建议加入前，调节受试物贮备液的 pH，使其接近水箱内水的 pH。调节贮备液的 pH 时不能使受试物浓度明显改变，或发生化学反应或沉淀。最好使用 HCl 和 NaOH 来调节。

(5) 暴露条件

时间：96h。

承载量：静态和半静态试验系统最大承载量为 1.0g 鱼/L，流水式试验系统承载量可高一些。

光照：每天 12-16h。

温度：与试验鱼种相适宜（见表 5-3-4），温控范围 $\pm 2^\circ\text{C}$ ，对于较严格的试验温控 $\pm 1^\circ\text{C}$ 范围。

溶解氧：不低于空气饱和值的 60%，曝气时不能使受试物明显受损。

不喂食，并避免会改变鱼行为的干扰。

试验操作

在试验之前，应根据受试物的化学稳定性确定采用的试验方法，即静态、半静态和流水式试验，从而选定需用的容器和装置。

(1) 预试验

用以确定正式试验所需浓度范围，可选择较大范围的浓度系列，如 1000、100、10、1、0.1mg/L。每个浓度组放入五条鱼，可用静态方式进行，不设平行组，实验持续 48-96h。每日至少两次记录各容器内的死鱼数，并及时取出死鱼。

如果一次预试验结果无法确定正式试验所需的浓度范围，应另选一浓度范围再次进行预试验。

(2) 正式试验

根据预试验得出的结果，在包括使鱼全部死亡的最低浓度和 96h 鱼类全部存活最高浓度之间至少应设置五个浓度组，并以几何级数排布。浓度间隔系数应 ≤ 2.2 。

每个试验浓度组应至少设三个平行，每一系列设一个空白对照。如使用了助溶剂，应增设溶剂对照，其浓度与试剂中的最高溶剂浓度相同。每一浓度组和对照组至少使用七尾鱼，条件允许的情况下，建议使用 10 尾鱼。

试验溶液调节至相应温度后，从驯养鱼群中随机取出鱼并随机迅速放入各试验容器中。转移期间处理不当的鱼均应弃除。同一试验，所有试验用鱼应在 30min 内分组完毕。

在 24h、48h、72h 和 96h 后检查受试鱼的死亡状况，如果没有任何肉眼可见的运动，如腮的煽动、碰触尾柄后无反应等，即可判断该鱼已死亡，观察并记录死鱼数目后，将死鱼从容器中取出。应在试验开始后 3h 或 6h 观察各处理组鱼的情况，并记录实验鱼的异常行为（如鱼体侧翻、失去平衡、游泳能力和呼吸功能减弱，色素沉积等）。

试验开始和结束时要测定 pH 值、溶解氧和温度。试验期间，每天至少测定一次。

至少在试验开始和结束时，测定试验容器中试验液的受试物浓度。

应记录所观察到的亚致死效应。

(3) 极限试验

在进行鱼类毒性测定时，可以进行浓度为 100mg/L 的极限试验。如极限试验结果表明 $LC_{50} > 100\text{mg/L}$ 。可直接给出试验结果及评价： $LC_{50} > 100\text{mg/L}$ ，属于低毒。极限试验至少使用七尾鱼，与对照自使用的鱼数目相等。

二项式理论表明：表明 10 尾鱼，无一死亡。那么 $LC_{50} > 100\text{mg/L}$ 的概率为 99.9%；使用 7-9 尾鱼，无一死亡，那么 $LC_{50} > 100\text{mg/L}$ 的概率至少为 99%。

如果试验与发生死亡，则应按本方法前述试验操作（1）、（2）的试验程序进行试验。

5. 质量保证与质量控制

①试验结束时，对照组与死亡率不得超过 10%。

②试验期间，试验溶液的溶解氧含量应 $> 60\%$ 的空气饱和值。

③试验期间，受试物实测浓度不能低于设置浓度的 80%。如果试验期间受试物实测浓度与设置浓度相差超过 20%，则以实测受试物浓度来表示试验结果。

④试验期间，尽可能维持恒定条件。如果有必要，应使用半静态或流水式试验方式。

6. 数据与报告

(1) 数据处理

①已暴露浓度为横坐标，死亡率为纵坐标，在计算机或对数-概率坐标纸上，绘制暴露浓度对死亡率的曲线。用直线内插法或常用统计程序计算出 24h、48h、72h、96h 的 LC_{50} 值，并计算 95%的置信限。

②如果试验数据不适于计算 LC_{50} ，可用不引起死亡的最好浓度和引起 100%死亡的最低死亡浓度估算 LC_{50} 的近似值，即这两个浓度的几何平均值。

(2) 结果评价

鱼类急性毒性可按以下标准分级（表 5-3-5）

表 5-3-5 鱼类急性毒性分级标准

96h LC_{50} (mg/L)	<1	1-10	10-100	>100
毒性分级	极高毒	高毒	中毒	低毒

(3) 编写报告

试验报告应包括：实验名称、目的、试验原理、试验的准确起止日期，以及：

1) 受试物质：对于化学品，其化学名称、其他名称（商品名等）、化学式、成分、制造厂商、批号、纯度等级和理化性质等；对于废水或环境样品，应给出其来源、采样时间、地点、保存条件等。

2) 试验用鱼：实验用鱼名称、学名、品系、大小、来源、驯（养）化情况、试验开始时的鱼龄、规格等。

3) 试验条件：

①使用的试验方式，如静态、半静态或流水式，以及曝气、承载量等。

②试验溶液配制方法，如果使用助溶剂，应注明使用浓度及对受试物的毒性影响。

③稀释用水，来源、类型、水质（pH、硬度、碱度和温度等）。

④试验容器，质地、规格、体积及清洗情况。

⑤试验溶液，体积、浓度、每个浓度组平行数，试验液跟更换情况、更换方法、流动情况，以及受试物的加入系统、流速、清洗周期及方法。受试物的规定浓度，实测浓度及测定日期。最好能用表格列出试验期间试验温度、pH 值、溶解氧的全部实测值。

⑥每一试验浓度的用鱼数目。

⑦光照，如光的性质、强度、周期。

4) 试验报告：

①无死亡发生（ EC_0 ）的最高浓度。

②导致 100%死亡（ EC_{100} ）的最低浓度。

③24h、48h、72h、96h 时的每个浓度的累计死亡率。

④24h、48h、72h、96h 的 LC_{50} ，及其 95%的置信限。

⑤浓度—死亡率曲线图。

⑥确定 LC_{50} 值的统计学方法。

⑦对照组的死亡率。

⑧试验期间，可能会影响试验结果的隐患。

⑨鱼的异常反应。

5) 结果讨论。

附录 D

(规范性文件)

细菌回复突变试验（鼠伤寒沙门氏菌法，简称：Ames 试验）

1.目的

鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验是以微生物为指示生物的遗传毒理学体外试验，遗传学终点是基因突变，用于检测受试物能否引起鼠伤寒沙门氏菌基因碱基置换或移码突变。本方法规定了地表水和给谁的样品采集、预处理的方法和鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验的基本技术要求。

2.原理

鼠伤寒沙门氏菌的标准试验菌株为组氨酸缺陷型突变型，在无组氨酸的培养基上不能生长，在有组氨酸的培养基上可以正常生长。诱变剂（mutagen），又称为致突变剂或致突变物，可是沙门氏菌组氨酸缺陷型回复突变为野生型，在无组氨酸培养基上也能生长。故可根据在无组氨酸的培养基上生成的菌落数量，判断受试物是否为诱变剂。对于间接由编辑，可用经多氯联苯（PCB）诱导的大鼠肝匀浆制备的 S-9 混合液作为代谢活化系统。

3.样品的采集

(1) 仪器设备条件

采样瓶为棕色、大口玻璃瓶，瓶盖具聚四氟乙烯衬垫，或在样品无腐蚀性条件下使用具铝箔外衬的橡皮塞。

(2) 样品采集

用采样瓶手工采集适量样品，地表水和废水样品要完全充满容器，密封，并于 2h 内送至实验室，尽快进行处理。

4.地表水和废水样品预处理

(1) 仪器设备条件

- ①分液漏斗。
- ②贮水器，具下口的玻璃容器。
- ③树脂柱玻璃管，高不低于 10cm，柱管直径与柱长比为 1：4~1：10 之间。
- ④输液泵。
- ⑤旋转蒸发器或 KD 浓缩器。
- ⑥高纯氮气。

(2) 试剂

- ①纯水：符合 GB6682—1192 实验室用水规格。可用去离子水经全玻璃蒸馏器蒸馏制得。
- ②10mol/L 氢氧化钠溶液。
- ③（1：1）硫酸溶液。
- ④1mol/L 氢氧化钠溶液。
- ⑤1mol/L 盐酸溶液。
- ⑥二氯甲烷、甲醇、丙醇、正己烷，不低于分析纯级，应在玻璃容器中重蒸馏后方可使用。

⑦二甲基亚砷 (DMSO)。

⑧XAD-2 树脂或等效的大孔树脂：树脂应经纯水及甲醇漂洗后，在索氏提取器中分别用甲醇、二氯甲烷、正己烷、丙醇提取 8h，去除有机物。净化后的树脂浸于甲醇中，置 4℃ 冰箱备用。

(3) 样品制备

1) 有机物的分离提取：

①有机物分离提取前的样品预处理，将采样瓶于 4℃ 静置 24h，使非水液相、水相、沉积固相分离。水相按下述原则处理：地表水中悬浮物的量低于 5% 时刻直接进行有机物的大孔树脂提取；悬浮物的量高于 5% 地表水及废水进行有机物的液-液提取。

②有机物的液-液提取：取二份 1500ml 的水样分放到二个 2000ml 分液漏斗中。用 10mol/L 氢氧化钠将 pH 值调至 11。向每个分液漏斗中加入 150ml 二氯甲烷，振荡 2min，注意放气。静置至少 10min，使有机相与水相分层，分出有机相。再各用 100ml 二氯甲烷提取二次。将三次提取液合并于 1000ml 烧杯中。如有机相与水相建的乳化层多于溶剂层的 1/3，可离心以达到两相的分层。用 (1:1) 硫酸溶液将水箱的 pH 值调至 2 以下。用二氯甲烷 150ml、100ml、100ml 分三次进行溶剂提取。将这三次提取的有机相也并入 1000ml 烧瓶中。

③有机物的大孔树脂分离提取：将净化后的树脂连同丙酮一起装入树脂柱，树脂上、下端分别垫、盖玻璃棉。排去柱中丙酮，用纯水洗柱三次（注意每次不能把试剂排空）。使水样流经树脂柱，流速为 1~2 倍柱体积/min，水样量不超 2000 倍柱体积，用真空泵抽去柱中水，然后用 4~8 倍柱体积 85:15 的正己烷、丙酮和 8 个柱体积二氯甲烷分别三次浸柱以洗脱有机物。浸泡时间为每次 10min。然后缓缓滴流，将洗脱液收集至烧瓶中。

④提取液浓缩：使用旋转蒸发器或 KD 浓缩器，将获取的提取液或洗脱液浓缩。浓缩液 50% 供重量分析或化学分析，余 50% 继续浓缩至 1ml。

⑤溶剂置换：于 40℃ 水浴，用氮气将浓缩的提取液吹干。加入适量 DMSO 溶解提取物，并稀释备用。

⑥样品量计算结果的表示：样品预处理所得水相体积或经树脂柱水样的体积以 L 表示。有机提取物的重量以 mg 表示。结果应换算至原水的水样量。

5. 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验

(1) 仪器设备

洁净工作台，恒温培养箱，恒温水浴，蒸汽压力锅，匀浆器等实验室常用设备。低温高速离心机，低温水箱 (-80℃) 或液氮罐。

(2) 培养基制备

除说明外，培养基成分或试剂应是化学纯或分析纯。避免重复高温处理，注意保存温度和期限。

1) 营养肉汤培养基：用作增菌培养。

牛肉膏	2.5g
胰胨 (或混合蛋白胨)	5.0g
氯化钠	2.5g
磷酸氢二钾 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	1.3g
蒸馏水至	500ml

加热溶解，调 pH 值为 7.4，分装后 0.103MPa 灭菌 20min，4℃ 保存，保存期不超过 6 个月。

2) 营养肉汤琼脂培养基：用作基因型 (rfa 突变, R 因子, pAQ1 质粒, $\Delta uvrB$) 鉴定。

琼脂粉	1.5g
-----	------

营养肉汤培养基 100ml

加热融化后调 pH 值为 7.4, 0.103MPa 灭菌 20min。

3) 底层培养基, 用于致突变试验。

①V—B 液贮备液, 50×

磷酸氢钠铵 (NaNH₄HPO₄) 17.5g

柠檬酸 (C₆H₈O₇ · H₂O) 10.0g

磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 50.0g

硫酸镁 (MgSO₄ · 7H₂O) 1.0g

加蒸馏水至 100ml, 0.103MPa 灭菌 20min。

待其他试剂完全溶解后, 再将硫酸镁缓慢放入其中继续溶解, 否则易析出沉淀。

②40%葡萄糖溶液:

葡萄糖 40.0g

加蒸馏水至 100ml, 0.055MPa 灭菌 20min。

③1.5%琼脂培养基:

琼脂粉 15g

蒸馏水 930ml

融化后 0.103MPa 灭菌 20min。趁热 (80℃), 以无菌操作加入:

V—B 盐贮备液 50× 20ml

40%葡萄糖溶液 50ml

充分混匀, 待凉至 50℃左右时倒入培养皿, 每皿 (Φ90mm) 25ml, 37℃培养过夜, 以除去水分及检查有无污染。

4) 顶层培养基。

①顶层琼脂:

琼脂粉 0.6g

氯化钠 0.5g

加蒸馏水至 100ml。0.103MPa 灭菌 20min。

②0.5mmol/L 组氨酸—生物素溶液:

D—生物素 (分子量 244) 30.5mg

L—盐酸组氨酸 (MW191.17) 23.9mg

加蒸馏水至 250ml, 0.103MPa 灭菌 20min。

顶层培养基制备: 加热融化顶层琼脂, 每 100ml 顶层琼脂中加 0.5mmol/L 组氨酸—生物素溶液 10ml。混匀, 分装于灭菌试管, 每管 2ml, 在 45℃水浴中保温。

5) 鉴定菌株基因型用试剂:

①0.8%氨苄青霉素溶液 (无菌配制): 称取氨苄青霉素 40mg, 用 0.02mol/L 氢氧化钠溶液 5ml 溶解, 保存于 4℃冰箱。

②0.8%四环素溶液 (无菌配制): 称取 40mg 四环素, 用 0.02mol/L 盐酸 5ml 溶解, 保存也 4℃冰箱。

③0.1%结晶紫溶液: 称取结晶紫 10mg, 溶于 10ml 灭菌蒸馏水。

④组氨酸—D—生物素板:

1.5%琼脂培养基 914ml

V—B 盐贮备液 20ml

40%葡萄糖溶液 50ml

L—盐酸组氨酸 (0.4043g/100ml) 10ml

D—生物素溶液 (0.02mol/L) 6ml

分别灭菌后，全部合并（1000ml），充分混匀，待凉至 50℃左右时倒平皿。

6) 氨苄青霉素平板（保存 TA97, TA98, TA100 菌株的主平板）；氨苄青霉素—四环素平板（保存 TA102 菌株的主平板）。

1.5%琼脂培养基	914ml
V—B 盐贮备液	20ml
40%葡萄糖溶液	50ml
L—盐酸组氨酸（0.4043g/100ml）	10ml
D—生物素溶液（0.02mol/L）	6ml
0.8%氨苄青霉素溶液	3.15ml
0.8%四环素溶液	0.25ml(氨苄青霉素—四环素平板)

分别灭菌或无菌制备，注入 1000ml 瓶中，充分混匀，待凉至 50℃左右时倒平皿。

（3）代谢活化系统的制备

1) 大鼠肝 S-9 的诱导和制备：选健康雄性成年 SD 或 Wister 大鼠，体重 150g 左右，周龄 5~6 周。将多氯联苯（Aroclor1254 或国产五氯联苯）溶于玉米油中，浓度为 200mg/ml，按 500mg/kg 体重一次腹腔注射，5d 后断头处死动物，取出肝脏称重后，用在 4℃预冷的 0.15mol/L 氯化钾溶液冲洗肝脏数次。每克肝（湿重）加预冷的 0.15mol/L 氯化钾溶液 3ml，用消毒后的医用剪刀剪碎肝脏，用匀浆器（低于 4000r/min，1~2min）在冰浴中制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部 4℃冷环境。

将肝匀浆在低温 0~4℃高速离心机，12000r/min 离心 10min。吸出上清液为 S-9 组分，分装。保存于液氮或 -80℃低温。S9 应经无菌检查，蛋白含量测定（Lowry 法）及见解诱变剂鉴定其生物活性合格。

2) S-9 混合液的配制：

①0.4mol/L 氯化镁—1.65mol/L 氯化钾：称取 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 8.1g，KCl 12.3g 加蒸馏水稀释至 100ml。0.103MPa 20min 灭菌或过滤除菌。

②0.2mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.4），每 500ml 由以下组分组成：

磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 14.2g/500ml）	440ml
磷酸二氢钠（ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 13.8g/500ml）	60ml

调 pH 值至 7.4，0.103MPa 20min 灭菌或过滤除菌。

③10%S9 混合液的配制：每 10ml 由以下成分组成，临用时配制。

灭菌蒸馏水	3.8ml
磷酸盐缓冲液（0.2mol/L,pH7.4）	5.0ml
1.65mol/L 氯化钾-0.4mol/L 氯化镁溶液	0.2ml
葡萄糖-6-磷酸钠(MW305.9,0.05mol/L)	40 μ mol
辅酶(MW765.4,0.05mol/L)	50 μ mol
肝 S9 液	1.0ml

混匀，置冰浴待用。在 4℃以下，其活性可保存 4-5h。当日使用，剩余的 S-9 混合液废气。

（4）受试生物

1) 实验菌株：采用四株鼠伤寒沙门氏突变型菌株 TA97、TA98、TA100、TA102。TA97、TA98 可监测移码型诱变剂；TA100 可检测碱基置换型诱变剂；TA102 检测移码型和碱基置换型诱变剂。

2) 增菌培养：取灭菌的 25ml 三角烧瓶，加入营养肉汤 10ml，从试验菌株母板上刮取少量细菌，接种至肉汤中。37℃振荡培养 10h，存货细菌密度可达 $(1-2) \times 10^9/ml$ 。

（5）菌株鉴定和保存

四种标准试验菌株必须进行基因型鉴定、自发回变数鉴定，以及对鉴别性诱变剂的反应鉴定，合格后才能用于致突变试验。

1) 菌株基因型鉴定：

①组氨酸营养缺陷鉴定（组氨酸需求试验）：加热融化底层培养基量瓶各 100ml。一瓶 100ml 加 L-盐酸组氨酸溶液（0.5g/100ml）1 和 D-生物素溶液（0.5mmol/L）0.6ml；一瓶 100ml 加 D-生物素溶液（0.5mmol/L）0.6ml。充分混匀，待凉至 50℃左右时各倒平皿四块，即分别为组氨酸-生物素平板和生物素平板。去组氨酸-生物素平板和生物素平板各一块，将试验菌株在此两组培养基上划线接种，经 37℃培养 24-48h，观察生长情况。此四种菌株应在组氨酸-生物素平板上生长，而在无组氨酸的生物平板上不能生长。

②深粗糙型（rfa）鉴定（结晶紫抑菌试验）：深粗糙型突变的细菌，缺失脂多糖屏障，因此分子量较大的物质能进入菌体。

鉴定方法：用移液器吸 0.1%结晶紫溶液 20，在肉汤平板表面涂成一条带，待结晶紫溶液干后，在与结晶紫带方向垂直化纤接种四种试验菌株。经 37 培养 24-48，观察生长情况。此四种菌株在结晶紫溶液渗透区出现抑菌，证明试验菌株有 rfa 突变。

③uvrB 缺失的鉴定（紫外线敏感试验）：uvrB 缺失即切除修复系统缺失。

鉴定方法：取受试菌液在营养肉汤琼脂平板上划线。用黑纸覆盖培养皿的一半，然后再 15W 的紫外线灭菌灯下，距离 33cm 照射 8s。37℃培养 24h。对紫外线敏感的三个菌株（TA97、TA98、TA100）仅在没有照射过的一半生长，而菌株 TA102 在没有照射过的一半和照射过的一般均能生长。

④R 因子和 pAQ1 质粒的鉴定：四个试验标准菌株均带有 R 因子，具有抗氨苄青霉素的特性。TA102 菌株含有 pAQ1 质粒具有抗四环素的特性。

用结晶紫抑菌试验的方法，在二个肉汤平板上分别滴加氨苄青霉素溶液 20 μl（浓度为 1mg/ml，溶于 0.02mol/LNAOH）和四环素溶液 20 μl（浓度为 0.08mg/ml，溶于 0.02mol/L HCl），并在肉汤平板表面涂成一条带，待溶液干后，垂直划线接种四种试验菌株。经 37℃培养 24-48h，观察生长情况。四个菌株生长应不受氨苄青霉素抑制，证明它们都带有 R 因子。TA102 菌株生长应不受四环素抑制，证明带有 pAQ1 质粒。

2) 自发回变数测定：取已融化并在 45℃水浴中保温的顶层培养基一管（2ml），加入测试菌液 0.1ml，迅速混匀，倒在底层培养基上，转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上，平放固化。翻转平板于 37℃培养 48h，观察结果。计数回变菌落数。每株的自发回变率应落在表 5-4-1 所列正常范围内。

3) 对鉴别性诱变剂的反应：试验菌株对不同诱变剂的反应不同，应该在有合没有代谢活化的条件下鉴定个试验菌株对诱变剂的反应。可按下述的点试验或平皿掺入试验的方法进行。各试验菌株对鉴别型诱变剂的反应见表 5-4-1 和表 5-4-2。

表 5-4-1 试验标准菌株生物学特性鉴定标准

菌株	基因型					自发回变菌落数
	组氨酸缺陷	脂多糖屏障 缺失	抗氨苄青霉素	抗四环素	uvrB 修复 缺陷	
TA97a	+	+	+	-	+	90-180
TA98	+	+	+	-	+	30-50
TA100	+	+	+	-	+	120-200
TA102	+	+	+	+	-	240-320
注：	+表示需要 组氨酸	+表示有抑制 带	+表示具 有 R 因子	+表示具有 pQA1 质粒	+表示无修 复能力	

表 5-4-2 鉴别性致突变物在点试中试验结果

诱变剂	剂量	S-9	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛毒素	5.0 μg	—	—	+	—	++
叠氮钠	1.0 μg	—	+	—	++++	—
ICR-191	1.0 μg	—	+	+	++	+++
丝裂霉素 C	2.5 μg	—	++++	inh	inh	++
2, 4, 7-三硝基苄酮	0.1 μg	—	inh	++++	++	+
4-硝基-o-苯澄二胺	20.0 μg	—	++	+++	+	+++
4-硝基喹啉-N-氧化物	10.0 μg	—	+	++	++	++++
甲基磺酸甲酯	2.0 μl	—	+	—	+	+++
敌克松	50.0 μg	—	++++	+++	++++	+
2-氨基苄	20.0 μg	+	++	++++	+++	
甲基硝基亚硝基胍	2.0 μg	—	+	—	+++	+++

注：每皿或变菌落数（扣除自发回变）的符号：—<20；+20-100；++100-200；+++200-500；++++>500。柔毛毒素和叠氮钠溶解在水中，其他所有化合物溶解在 DMSO 中。ICR-191 为 2-甲氧基-6-氯代-9-(3-(2-氯乙基)氨基丙胺) 吡啶·2 盐酸。Inh 表示因毒性引起的生长抑制。

表 5-4-3 鉴别性致突变物在平板掺入法中试验结果

诱变剂	剂量	S-9	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛毒素	5.0 μg	—	124	3123	47	592
叠氮钠	1.0 μg	—	76	3	3000	186
ICR-191	1.0 μg	—	1640	63	185	0
链黑霉素	0.25 μg	—	Inh	Inh	Inh	2230
丝裂霉素 C	2.5 μg	—	Inh	Inh	Inh	2772
2, 4, 7-三硝基苄酮	0.1 μg	—	8377	8244	400	16
4-硝基-o-苯澄二胺	20.0 μg	—	2160	1599	798	0
4-硝基喹啉-N-氧化物	10.0 μg	—	528	292	4220	287
甲基磺酸甲酯	2.0 μl	—	174	23	2730	6586

敌克松	50.0 μ g	—	2688	1198	183	895
2-氨基苄	20.0 μ g	+	1742	6194	3026	261
甲基硝基亚硝基胍	2.0 μ g	+	337	143	936	255

注：表中回变菌落数取自于剂量反应曲线的线性部分，并已扣去了对照值。

4) 菌株保存:

①鉴定合格的菌种应加入 DMSO 作为冷冻保护剂，保存在-80℃或液氮 (-196℃)，或者冰冻干燥制成干粉，4℃保存。

②主平板保存：作主平板保存时，将菌落划线接种于主平板上，孵育 24h 后保存于 4℃冰箱中。TA97、TA98、TA100 菌株保存在氨苄青霉素主平板上，可使用二个月。TA102 菌株的氨苄青霉素-四环素主平板上，可保存二周。应按时从保存的主平板上移菌，制备新的主平板。

(6) 实验程序

1) 实验设计：受试物最低剂量为每皿 0.1 μ g，最高剂量为 5mg，或出现沉淀的剂量。或对细菌产生最小毒性剂量。一般选用 4-5 个剂量，进行剂量-反应关系研究，每个剂量应由三个平行板。容积可选用用、二甲亚砜（每皿不超过 0.4ml）或其他溶剂。每次试验应有同时进行的阳性对照和阴性（溶剂）对照。

2) 方法和步骤：试验方法有平板掺入法和点试法。一般先用点试法作预试验，以了解受试物对沙门氏菌的毒性个可能的致突变性，平板掺入法是标准试验方法。

①平板掺入法：在底层培养皿上写上记号。取已融化在 45℃ 水浴中保温的顶层培养基一管（2ml），依次加入受试物溶液 0.1ml，测试菌菌液 0.05-0.2ml（需活化时加 10%S-9 混合液 0.5ml），迅速混匀，倒在底层培养基上，转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上。平放固化后，将平板翻转，置 37℃ 培养 48h 观察结果。

②点试法：在底层培养皿上写上记号。取已融化并在 45℃ 水浴中保温的顶层培养基一管（2ml），加入测试菌菌液 0.05-0.2ml（需活化时加 10%S-9 混合液 0.5ml），迅速混匀，倒在底层培养基上，倾斜平皿使顶层培养基均匀分布在底层上，平放固化。取无菌滤纸圆片（直径 6mm），小心放在已固化的顶层培养基的适当位置上，用移液器取适量受试物（如 10 μ l），点在纸片上，或将少量固体受试物洁净夹道智商或琼脂表面，将平板翻转，置 37℃ 培养 48h 观察结果。

6. 质量保证

应对水养预处理和鼠伤寒沙门氏菌致突变试验进行质量控制。

①设置阴性对照，即用纯水代替水样，完成后样品制备全过程。用所得浓缩物作为阴性溶剂对照。

②设置阳性对照，用适当剂量的阳性对照物经历样品制备全过程。

③致突变试验标准菌株应鉴定合格，试验应设置平行样。

7. 数据与报告

(1) 数据处理

结果以均数±标准差表达。利用适当的统计学方法处理数据了。

(2) 结果评价

①点试法：凡在点样纸片周围长出一圈密集的 his+回变菌落者，该受试物即为诱变剂，如只在平板上出现少数散在的自发回变菌落。则为阴性，如在滤纸片周围见到抑菌圈，说明受试物具有细菌毒性。

②掺入法计数培养基上的回变菌落数。如在背景生长良好条件下，受试物每皿回变菌落数等于或大于阴性对照数的 2 倍，并有剂量-反应关系：或至少某一测试点有重复的并有统

计学意义的阳性反应，即可认为该受试物对鼠伤寒沙门氏菌有致突变性。当受试物浓度达到抑菌浓度或 5ml/皿仍为阳性者，可认为是阴性。

③报告的试验结果应是两次以上独立试验的重复结果。如果受试物对四种菌株（加和不加 S-9）的平皿掺入试验均得到阴性结果，可认为此受试物对鼠伤寒沙门氏菌无致突变性。如受试物对一种或多种菌株（加或不加 S-9）的平皿掺入试验得到阳性结果，即认为此受试物是鼠伤寒沙门氏菌的致突变物。

（3）试验的解释和评价

①细菌回复突变试验利用原核细胞，在某些方面不同于哺乳动物细胞，如摄取、代谢、染色体结构和 DNA 修复过程。本试验的体外代谢活化系统不可能完全模拟哺乳动物体内代谢条件。因此本试验对受试物在哺乳动物致突变性和致癌强度不提供直接的资料。

②虽然本试验为阳性结果的化合物很多是哺乳动物致癌物，但其相关并不是绝对的，取决于化学物类别。有些在本试验未能见出阳性结果的致癌物，是因为经非遗传毒性机制或细菌缺乏的机制引起致癌作用的。

③本试验通常用于遗传毒性的初步筛选，并且，特别是用于诱发点突变的筛选。已有的数据库证明在本试验为阳性结果的很多化学物在其他试验也显示致突变活性，也有一些诱变剂在本试验不能检测，这可能是由于检测重点的特殊性、代谢活化的差别等。另一方面，增强本试验的敏感性可能导致高估了受试物的致突变活性。

（4）试验报告

试验报告必须包括下列资料。

①受试物：水样采集地点，采样日期和时间，气象条件，水样外观，水样预处理方法和过程，受试物浓度。

②溶剂/赋形剂：溶剂/赋形剂选择依据：受试物在溶剂/赋形剂中的溶解性和稳定性（如已知）。

③菌株：所用菌株；每个培养物细胞数；菌株特性。

④试验条件：每平板受试物的量（mg/平板或 μ l/平板），剂量选择的依据，每个剂量的平板数；所用培养基；代谢活化系统的种类和组成，包括合格的标准；处理方法。

⑤结果：毒性；沉淀；各平板计数；每平板回变落均数和标准差；剂量-反应关系（如可能）；统计学分析（如有）；同时进行的阴性（溶剂/赋形剂）和阳性对照资料，包括范围、均数和标准差；历史性阴性（溶剂/赋形剂）和阳性对照资料，包括范围、均数和标准差。

⑥结果的讨论。

⑦结论。

8.安全措施与废弃物处理

①应有专门的实验室，应有良好的通风设备。

②由于对样品制备中涉及的毒性与致癌性不完全清楚，应将其按有潜在健康危害的物质对待，试验者必须注意个人防护，尽量减少接触污染的机会。

③受试的致癌物与诱变剂的废弃处理，原则上按放射性同位素废弃物处理方法进行。

④所用沙门氏菌试验菌株一般毒性较低，具有 R 因子的危害更小。但要防止沙门氏菌污染动物饲养室。