



中华人民共和国国家标准

GB/T 16125—2012
代替 GB/T 16125—1995

大型溞急性毒性实验方法

Method for acute toxicity test of daphnia magna straus

(ISO 6341-1996 Water quality—Determination of the inhibition
of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)—
Acute toxicity test, NEQ)

2012-11-20 发布

2013-05-01 实施



中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 16125—1995《大型水蚤测试标准方法》，与 GB/T 16125—1995 相比主要技术变化如下：

- 将原标准名称《大型水蚤测试标准方法》修改为《大型蚤急性毒性实验方法》；
- 将原标准的主题内容与适用范围修改为范围，并删除大型蚤生长及繁殖实验方法（慢性效应）；
- 依据 GB/T 1.1—2009 调整了结构，增补了“规范性引用文件”、“术语和定义”；
- 本标准 4.2 增加了标准稀释水的定义和配制方法；
- 本标准 6.1 增加了样品采集与保存方法；
- 本标准 7.1 增加了限度实验的内容和方法；
- 本标准增加了质量控制和质量保证的内容和方法；
- 将原标准附录 A 调整为附录 A “大型蚤的培养繁殖方法”和附录 B “斜生栅藻的培养技术”。

本标准使用重新起草参考 ISO 6341:1996《水质—大型蚤（甲壳纲、枝角目）活动抑制的测定》编制，与 ISO 6341:1996 的一致性程度为非等效。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所。

本标准主要起草人：刘凡、潘力军、高世荣、王俊起。

大型溞急性毒性实验方法

1 范围

本标准规定了大型溞急性毒性实验方法。

本标准适用于评价可溶性化学物质的毒性、工业废水及固体废弃物浸出液的综合毒性、废水的处理效果、地表水、地下水及水中沉积物的毒性。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 12997 水质 采样方案设计技术规定

GB 12998 水质 采样技术指导

GB 12999 水质采样 样品的保存和管理技术规定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

半数有效浓度 median effective concentration

EC_{50}

在 24 h 或 48 h 内 50% 暴露在实验液中大型溞活动受抑制(包括死亡)的浓度。

3.2

活动抑制 immobilization

轻轻摇动实验容器,若 15 s 之内大型溞不能游动,认为其运动能力受到抑制,即使其触角仍能活动,也应算做活动受抑制的个体。

4 实验原理

本标准用大型溞为实验生物,将大型溞置于一系列浓度的实验溶液中,计数 24 h 和 48 h 大型溞活动能力受到抑制(包括死亡)的数量,计算 24 h 和 48 h 半数有效浓度(24 h EC_{50} 和 48 h EC_{50}),判断实验溶液的毒性程度。实验分为两个阶段:预实验和正式实验。

5 试剂和材料

5.1 一般要求

本标准所用试剂均为符合国家标准的分析纯化学试剂,实验用水要求参照 GB/T 6682。

5.2 实验生物

大型溞(*Daphnia magna* Straus)(甲壳纲,枝角亚目)62Dm 纯品系生物株为实验溞种。实验用溞取同龄同母体后代,培养1代~3代、出生6 h~24 h的幼蚤。实验用大型溞培养繁殖方法参见附录A。

5.3 标准稀释水

5.3.1 配制的标准稀释水 pH 为 7.8 ± 0.2 ;硬度为 $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$ (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;不应含有任何对大型溞有毒的物质。

5.3.2 标准稀释水用电导率小于 $10 \mu\text{S/cm}$ 的纯净水按下述方法配制:

氯化钙溶液:将 11.76 g 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于水中稀释至 1 L;

硫酸镁溶液:将 4.93 g 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)溶于水中稀释至 1 L;

碳酸氢钠溶液:将 2.59 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶于水中稀释至 1 L;

氯化钾溶液:将 0.25 g 氯化钾(KCl)溶于水中稀释至 1 L;

各取以上四种溶液 25 mL 混合,稀释至 1 L。调节 pH,使其稳定在 7.8 ± 0.2 。标准稀释水应容许大型溞在其中生存至少 48 h。

5.4 稀释水

可采用未被有毒物质污染的天然水(地面水或地下水)及自来水(自然曝气的),其 pH 为 7.0~8.5,溶解氧 4 mg/L 以上,水的硬度为 $250 \text{ mg/L} \pm 22 \text{ mg/L}$ (以 CaCO_3 表示)。

6 仪器和设备

6.1 可采用小烧杯等玻璃制品,或者依据化合物的性质选择合适的实验容器,实验容器上加盖表面皿。为防止玻璃容器对实验物质的吸附,实验前可用低浓度实验溶液浸泡容器(空白对照组除外)1 d。

6.2 量筒、容量瓶、移液管、滴管、玻璃缸、尼龙筛网。

溶解氧测定仪、水质硬度计、pH 计、温度计、电导仪、体视显微镜。

7 样品

7.1 样品的采集与保存

7.1.1 按照 GB 12997、GB 12998、GB 12999 的规定。采集废水样品时,应将采样瓶充满水样,不留空气。采集水质不稳定的工业废水,应在 24 h 之内,每隔 6 h 采样一次,分别测定每个样品,求得其最大毒性。

7.1.2 样品采集后应立即进行实验。如果样品采集后 6 h 之内不能进行实验,宜将水样冷藏保存($0^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$);超过 6 h,宜将水样冷冻保存(-18°C),保存时间不超过 2 个月。

7.2 样品的制备

7.2.1 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。

7.2.2 易溶于水的实验物质可直接加到稀释水中,也可以溶解在蒸馏水中配成贮备液加入到稀释水中配成实验液。贮备液应低温保存。难溶于水的物质,可使用超声波装置及其他低毒助溶剂增溶的方法,将其溶解和分散。如果使用助溶剂,助溶剂在实验液中的浓度不应超过 0.5 mg/L 。

7.2.3 工业废水原水样为实验原液,作为 100%,用稀释水按百分数(百分率)配制成各实验浓度。

7.2.4 固体废弃物或水中沉积物。首先磨碎,按固液 1:10 比例加入蒸馏水,摇匀后浸泡 24 h,滤纸过滤,滤过液为被测工业固体废物或水中沉积物的浸出原液(100%),再用稀释水按百分数配制成各浓度。

8 实验程序

8.1 限度实验

以受试物在实验液中的最大溶解度作为限度实验浓度(若该物质的最大溶解度大于 100 mg/L,则以 100 mg/L 作为实验浓度),实验结束时,如果大型蚤的活动抑制率低于 10%,则不需进行下一步实验,否则应按照实验程序进行完整实验。

8.2 预实验

8.2.1 正式实验之前,为确定实验浓度范围,应进行预实验,除非有可参考的毒性数据。先将大型蚤暴露于范围较广的浓度系列(如 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L 或 1 mg/L、0.1 mg/L、0.01 mg/L)中 24 h,每个浓度至少放 5 个幼蚤,通过预实验找出被测物使大型蚤全部存活(或无活动抑制)的浓度以及全部死亡(或不动)的浓度,然后在此范围内设计出正式实验中各组的浓度。

8.2.2 应了解毒物的稳定性,在稀释水中是否会出现沉淀、pH 等理化性质的改变,以便确定正式实验是否需要采取流水或更换实验液及改变稀释水 pH 等措施。

8.3 正式实验

8.3.1 实验浓度设计。根据预实验的结果确定正式实验的浓度范围,按几何级数的浓度系列(等比级数间距)设计 5 个~7 个浓度。实验浓度要设计合理(等比级系数不超过 2.2,如 1、2、4、8、16 等比级系数为 2),最高浓度处理组大型蚤全部死亡(或不动),最低浓度处理组大型蚤全部存活(或无活动抑制),系列浓度中以能出现一个大型蚤活动抑制率在 40%~60%的浓度最为理想。

8.3.2 每个实验浓度置大型蚤 5 个,平均每个大型蚤的实验液不少于 2 mL。每个实验浓度设 3 个平行。以不添加受试样品的实验组为空白对照组,内装与处理组相等体积的稀释水。如使用助溶剂,则应设置溶剂空白对照组。实验前要用化学方法测定实验液的初始浓度。实验开始及结束时测定实验液的 pH、水温 and 溶解氧(DO)。对不稳定性实验液采用定时更换的措施,实验期间大型蚤不喂食。

8.3.3 实验开始后应于 24 h 及 48 h 定时进行观察,记录每个容器中仍能活动的大型蚤数,测定 0%~100%大型蚤活动抑制或死亡的浓度范围,并记录它们任何不正常的行为。

9 质量控制和质量保证

9.1 检查大型蚤的敏感性实验操作步骤的一致性,定期测定重铬酸钾的 24 h EC_{50} ,20 °C 时重铬酸钾的 24 h EC_{50} 应在 0.5 mg/L~2.0 mg/L 之间。

9.2 对照组(包括空白对照组和溶剂对照组)大型蚤的受抑制率不能超过 10%。

9.3 应经检测证明受试物浓度保持于实验全过程(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。

9.4 实验开始和结束时,对照和处理组的实验用液 pH 变化范围不超过 1.5;实验前的培养温度应与实验温度一致,实验可在 18 °C~22 °C 下进行,但同次实验温度的变化不超过 ±1 °C。实验应在没有对大型蚤有害的气体、粉尘的大气条件下进行。实验结束时,所有对照组和实验组溶解氧浓度应大于或等于 2 mg/L。实验在自然光照(避免阳光直射)或光照周期(光暗比)为 16 : 8,光照强度 <1 000 lx。

9.5 实验期间,应保持实验室条件正常,若出现停电、停水等情况而影响实验的,应及时停止实验,待实验室条件恢复正常后重新进行实验。

10 数据与报告

10.1 数据

10.1.1 结果的计算

计算 24 h 和 48 h 对照组和各处理组实验蚤活动受抑制数及百分率。以 24 h 和 48 h 抑制百分率与受试物浓度做剂量-效应曲线,选择合适的统计方法(如概率单位法或寇氏修正法)计算 24 h EC_{50} 和 48 h EC_{50} 及其 95% 的置信区间。

10.1.2 结果的表示

以 24 h EC_{50} 或 48 h EC_{50} 表示受试物质在相应时间内对大型蚤运动能力抑制的程度。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)的最低浓度和大型蚤活动不受抑制(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 mg/L 表示,计算结果保留 3 位有效数字。

检测废水样品、固体废弃物或水中沉积物浸出液时,以百分数或 mL/L 表示,计算结果保留 3 位有效数字。

10.2 实验报告

实验报告要求包括以下几个方面:

- 实验用蚤的种名、来源、数目、蚤龄、饵料、重铬酸钾的 24 h EC_{50} ;
- 对照组是否发生死亡;
- 实验条件下大型蚤的任何不正常行为、中毒症状;
- 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;
- 实验环境条件,实验用稀释水的性质,如水温、pH、溶解氧、电导率等情况;
- 实验结果、数据处理、结论;
- 方法依据及参考文献。

附 录 A
(资料性附录)
大型溞的培养繁殖方法

A.1 实验溞的选育

实验用大型溞(*Daphnia magna* Straus)可以从其他实验室已有的纯培养系中挑取引种,也可以从野外采集。野外采集的溞要经分离、纯化,在显微镜下鉴定确认为大型溞后,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溞,单克隆化,使之成为纯品系。

A.2 饵料

雌性的大型溞可以在 20 ℃生存 4 个月之久。本方法推荐用实验室培养的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)为大型溞的饵料。斜生栅藻的培养方法见附录 B。

A.3 容器

单个培养母溞可用 50 mL 小烧杯,繁殖培养用 2 000 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。

A.4 培养方法

在 1 L~2 L 的圆玻璃缸或烧杯中,加入 500 mL~1 000 mL 培育水,加入 10 个~20 个大型溞,投喂新鲜栅藻藻液,使藻浓度为 6×10^6 个/mL~ 8×10^6 个/mL 最佳,在室内自然光照条件下进行培养,避免阳光直射,培养温度 15 ℃~25 ℃,pH 值为 7.5 ± 0.5 ,溶解氧 2 mg/L 以上,每周全换培养液 1 次~2 次。

A.5 实验溞的分离

选择怀卵量高的母溞 10 个~20 个,投喂充足的饵料,在实验前 24 h 用孔径为 1 mm 的筛子将幼蚤滤去,在实验前 6 h~12 h 进行第二次过筛,得到出生 6 h~24 h 的幼蚤。

附 录 B
(资料性附录)
斜生栅藻的培养技术

B.1 培养基

斜生栅藻的培养可以采用各种适用的培养基,本标准推荐用水生4号培养基。

培养基成分(配1 000 mL)如下:

硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.200 g

过磷酸钙 $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 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

B.2 斜生栅藻的培养

用1 000 mL锥形瓶,装300 mL~400 mL培养基,或者用3 000 mL锥形瓶装1 000 mL培养液,接种藻种使成淡绿色。瓶口加盖松软棉团或透气的瓶塞以防污染。在温度 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 $3\,000\text{ lx}\sim 4\,000\text{ lx}$ 、光照时间6 h~10 h的条件下连续静止培养,避免阳光直射。可采用40 W日光灯进行人工光照,灯源离培养容器的距离约0.5 m。培养好的深绿色的藻液可作为藻种进行扩大培养,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。要经常对藻液进行镜检,检查是否受到其他杂藻类、纤毛虫和轮虫等动物的污染。藻液要经常转接,以防止老化。转接的时间视藻液生长的情况而定,一般每周1次~2次,藻液变深绿色即要转接。老化的藻液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。

B.3 斜生栅藻的扩大培养

为获得培养大型蚤的足够饵料,可在实验室内进行斜生栅藻的扩大培养。扩大培养采用 $30\text{ cm}\times 30\text{ cm}$ 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斜生栅藻液(B.2),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。扩大培养的栅藻液可直接喂大型蚤。