

中华人民共和国国家环境保护标准

HJ □□□-201□

水质 物质对淡水鱼(真骨总目、鲤科)急性致死毒性
的测定 半静态法

Water quality –Determination of the acute lethal toxicity of substances to
a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei,
Cyprinidae)]-Semi-static method

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

环 境 保 护 部 发 布

目 次

前 言.....	II
1 适用范围.....	1
2 方法原理.....	1
3 试验生物和试剂.....	2
4 仪器和设备.....	3
5 试验环境.....	3
6 试验步骤.....	3
7 结果的表述.....	5
8 试验报告.....	7
附录 A（规范性附录） 喂养和繁育斑马鱼的环境参数.....	9
附录 B（资料性附录） 推荐的数据记录表.....	10

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，规范淡水鱼急性致死毒性的半静态检测方法，制定本标准。

本标准规定了水中物质对淡水鱼急性致死毒性的半静态检测方法。

本标准的技术内容等同采用国际标准化组织 ISO 7346-2:1996《水质 物质对淡水鱼(真骨总目、鲤科)急性致死毒性的测定 第 2 部分:半静态法》。

本标准为首次发布。

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：中国检验检疫科学研究院、广东出入境检验检疫局。

本标准环境保护部 20□□年□□月□□日批准。

本标准自 20□□年□□月□□日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 物质对淡水鱼(真骨总目、鲤科)急性致死毒性的测定 半静态法

1 适用范围

本标准规定了在确定的试验条件下测定稳定、溶于水的非挥发性单一化学物质，引起符合规定要求的水中淡水鱼[*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (真骨总目, 鲤科)](俗名: 斑马鱼)急性致死毒性大致范围的半静态试验方法。

本方法可用来根据试验条件为每种受试物指出针对于淡水鱼斑马鱼的多种类的急性致死毒性。

在使用某些其他品种的淡水鱼作为试验物种时,也可适用此方法。除斑马鱼(*Brachydanio rerio*)之外,还可以使用以下品种的淡水鱼,而无需对本标准中的此部分进行修改:

- 鳃太阳鱼(硬骨鱼,太阳鱼科);
- 青鳉鱼(硬骨鱼,花鳉科);
- 黑头呆鱼(硬骨鱼,鲤科);
- 孔雀鱼(硬骨鱼,花鳉科);

通过对试验条件,特别是在稀释水数量和质量及温度方面进行适当的改变,此方法可适用于与其他淡水鱼、海水鱼和咸水鱼一起使用。

2 方法原理

根据规定条件,在一定化学物质浓度下,当斑马鱼在环境水中暴露于一种物质 24 h、48 h、72 h 和 96 h 之后,受试动物发生死亡概率为 50%。这些半数致死浓度被表示为: 24 h - LC₅₀、48 h - LC₅₀、72 h - LC₅₀ 和 96 h - LC₅₀。

试验分两个阶段来完成:

(1) 初步试验:近似地得出急性半数致死浓度,并用来确定受试化学物质最终试验的浓度范围;

(2) 最终试验:只报告此试验结果。

在整个试验过程中受试物浓度保持相对恒定(即小于 20%的范围内),则所测量的或标

称浓度用于 LC_{50} 的估算。如果受试物浓度在整个试验阶段中保持在可接受的水平上，或已知（或怀疑）受试物浓度在试验期间的任何阶段明显下降，则不管是否有化学分析数据，都不能用这种测试方法来定义 LC_{50} 。在这些情况下，试验不是必然地作废，但只可表明此物质的 $LC_{50} \leq x$ mg/L，x 的值要通过所使用的标称浓度来估算。

3 试验生物和试剂

3.1 试验生物

试验鱼种应选用斑马鱼（真骨总目，鲤科）[*Brachydanio rerio* Hamilton — Buchanan(TeleosteiCyprinidae)]。试验鱼体长 $30 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$ ，体重 $0.3 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ ，选自同一驯养池中规格大小一致的幼鱼。试验前该鱼群应在与试验相同的环境条件下，在连续曝气的水中至少驯养 7 d。试验前 24 h 停止喂饲，每天清除粪便及食物残渣。驯养期间死亡率不得超过 10%，如果超过 10%，则该批鱼不得用作试验。

试验用鱼应无明显的疾病或可视的缺陷。它们应在试验过程中或在试验前的 14 d 内未受到疾病方面的治疗。试验之后，应合理处置仍活着的鱼。

喂养和繁育斑马鱼的环境条件参见附录 A。

3.2 标准稀释水

新配制的标准稀释水 pH 值为 7.8 ± 0.2 ，硬度大约为 250 mg/L（以 CaCO_3 计），并且下列盐用蒸馏水或去离子水溶解，浓度如下：

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294.0 mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3 mg/L
NaHCO_3	63.0 mg/L
KCl	5.5 mg/L

将制备好的稀释水曝气至溶解氧浓度达到空气饱和值(ASV)，pH 恒定在 7.8 ± 0.2 ，如果需要可用氢氧化钠溶液或盐酸调节 pH。按这种方式制备的稀释水试验前不需强制曝气。

3.3 受试物的储备液

将已知量的受试物溶解到规定量的稀释水、去离子水或玻璃蒸馏水中来配制受试物储备液。应配合受试物稳定性的频率来配制储备液。溶解低溶解度的物质时，可通过适当的方式，如使用超声波或加入对鱼低毒性的有机溶剂溶解。若使用任何有机溶剂，其在试验溶液中的浓度应不超过 0.1 mL/L 或 0.1 g/L，以两者之中数值较大的为准；并应同时进行两组对照试验，一组含有的溶剂为全部试验溶液中的最高浓度，另一组则不含溶剂或受试物。

3.4 试验溶液

向稀释水中添加适量的受试物储备液，以获得所要求的浓度，通过这种方式来配制试验溶液。在用蒸馏水或去离子水配制储备液时，建议每 10 L 稀释水所添加的储备液不宜超过 100 mL。

4 仪器和设备

存放鱼或可与鱼接触的液体容器，应使用惰性且不会对受试物产生明显吸附作用的材料。

4.1 试验容器

应有足够大的容积（大于 10 L），使试验介质与空气间有足够大的界面（每 10 L 介质要有大约 800 cm² 的面积），并备有牢固的密封盖。在试验期间试验容器中鱼的容积负载率都不得超过 1 g/L。

使用前应彻底清洁试验容器，例如使用非离子型洗涤剂（然后用酸和溶剂进行清洗有可能牢固地吸附在容器上的物质）。

4.2 温度控制设备

用适宜的方法将储备容器中试验溶液和水的温度调整到 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

4.3 抄网

材质为尼龙或其他化学惰性的材料，用于对照物容器，另一种材质用于所有试验容器（4.1）。

5 试验环境

应在大气环境下且不含有害空气污染物的房屋内，进行溶液的配制和储存、鱼的喂养及所有操作和试验。

注意避免可改变鱼行为的不必要搅动。利用每天 12 h 至 16 h 的光周期，在正常实验室照明条件下完成所有试验。

6 试验步骤

6.1 鱼的条件

可酌情选择纯化合物如重铬酸钾为对照物。可根据需要进行多次对照物的毒性试验，以得到对照物试验数据重现性的资料。每当蓄养种群发生变化都应按本方法规定的条件重复进

行试验。这些试验结果应与同一实验室早先测得的结果一致。

试验用鱼应未在以前的任何试验程序中使用过。

将储存容器中的温度保持在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (4.2)。

6.2 限度试验

受试物在试验条件下的水溶性极限与 100 mg/L 相比,取较低溶解度,利用本试验程序来完成限度试验,从而证明 96 h-LC₅₀ 高于此浓度。若在限度试验中没有鱼死亡,不需要进一步的试验。

利用 10 条鱼来完成限度试验,对照组中具有同样的数量。

6.3 预备试验

向 6 个试验容器(4.1)中的每个添加至少 2.5 L 或最好 5 L 标准稀释水(3.2),如果需要,进行曝气使溶解氧浓度恢复到空气饱和值的 90%。

向 5 个容器中添加适量的受试物(3.3)的储备液,以获得几何范围足够的浓度,例如:1 000 mg/L、100 mg/L、10 mg/L、1 mg/L 和 0.1 mg/L,通过这种方式来配制试液。第 6 个容器用作对照。应将溶液温度调整到 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (4.2),并保持在这一水平上,不应在试验期间强制性曝气。

在每个容器内放入 3 条鱼。

24 或 48 h 之后,在新的试验容器中配制新的试液,并立即将活鱼转入其中。在整个预备试验期间每 24 或 48 h 要进行配制。

每天至少两次记录死鱼的数量和每个容器中的溶解氧浓度,并将死鱼拿掉。

若无足够的数据来确定最后试验所要求的浓度范围,则利用另外一种范围的浓度来重复此初步试验。

6.4 最终试验

6.4.1 从预备试验中使所有鱼死亡的最低浓度和 96 h 中最高非致死浓度之间(包括这 2 个极端浓度)选择至少 5 种浓度,构成近似的几何级数,例如,8 mg/L、4 mg/L、2 mg/L、1 mg/L 和 0.5 mg/L。对于所使用几何级数的浓度来说,至少在 2 个连续浓度中可测得 0% 到 100% 之间的死亡率,对于利用概率单位法来估算 LC₅₀ 来说是必要的。

在某些情况下试验可能要求使用较窄的浓度范围,提供必要的数据;在其他情况下可能要求在较宽的浓度范围试验。

6.4.2 至少取 6 个容器(流水式试验用 6 个 2 L 的烧瓶与辅助设备连好),均加入标准稀释水。其中一个为空白试验即对照试验,按照适宜的浓度范围,在其余容器中加入不同量的储备液。

如果用有机溶剂溶解受试物，则需配制第二个“对照”溶液，使标准稀释水中有机溶剂的浓度与试验液中有有机溶剂的最高浓度相当。将试验溶液温度恒定在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，按下述方法向每个容器中放入 10 尾或更多的试验鱼。

用尼龙或其他惰性软材料编织的小孔抄网，从驯养鱼群中随机迅速选取鱼放入试验容器中；在转移过程中因操作不慎掉下的鱼或其他操作不善的鱼，弃去不用。所有的鱼需在 30 min 内转移完毕。

6.4.3 24 h 或 48 h 之后，在新的试验容器中配制新的试液，并立即将活鱼转入其中。试验期间每 24 h 或 48 h 应重复更换试液和转移鱼的操作。为了避免受试物通过抄网（4.3）在试验容器之间大量地转移，转移鱼应从最低浓度开始依次向高浓度过渡。

不应强制性地曝气，在试验期间至少每天将每个容器中死鱼的数量记录下来。尽快地将每条死鱼从容器中拿掉。如为了能够计算每个浓度的半数存活期，应更频繁地进行观察，并注意鱼的任何反常行为。

若在试验过程中证明受试物是稳定的（即预计或已证明损失量低于最初所测浓度的 20 %），则在试验开始和试验结束时测定试验溶液及储备液中受试物的浓度。若在试验过程中证明受试物是不稳定的，则在整个试验持续期间每次更换期的开始和结束时测量试验容器中受试物的浓度。应在试验开始时及在试验溶液更换之前和之后立即对每个容器中的溶解氧浓度、pH 值和温度进行测量。

斑马鱼急性毒性观察记录表格参见附录 B。

7 结果的表述

7.1 有效性

如满足下列要求，则认为结果有效：

- a) 试液中溶解氧浓度在试验期间不低于 60 % ASV；
- b) 未发现（或察觉）受试物的浓度在整个试验期间有明显的降低（但要参见第 2 条）；
- c) 对照鱼的死亡率不超过 10 % 或 1 条/容器；
- d) 表现出反常行为的对照鱼比例不超过 10 % 或 1 条/容器；
- e) 鱼群所用对照物 [例如 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$] 的 24 h - LC_{50} 合理地与以前在同一实验室中所获得的结果一致。

7.2 直线内插法估算 LC_{50}

用简单的图示法估算 LC_{50} 时，可绘制死亡百分率对受试物浓度的曲线。采用线性刻度

的坐标轴时是一条 S 形的关系曲线，从引起 50% 死亡率的内插浓度值得到 LC_{50} 值(见图 1)。

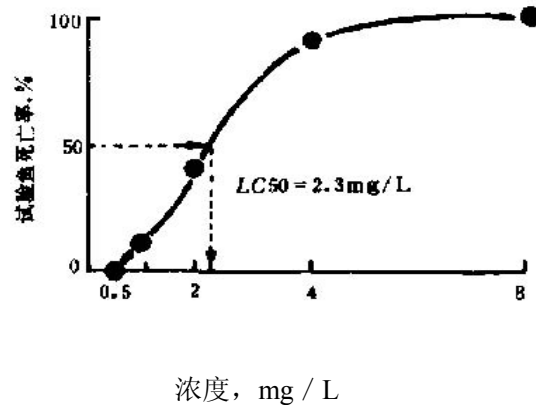


图 1 直线内插法估算 LC_{50}

7.3 概率单位图解法估算 LC_{50}

更合理的方法是，在对数和概率数值表轴的计算纸上用数据做图。以这种方式画出的数据应得出一个线性关系，可按上述方式将 LC_{50} 内插到这一关系中（参见图 2）。

如要求斜率估计值及这一数据和 LC_{50} 的 95 % 置信限，并建议这些统计数字表达结果是经常有价值的，可通过图形方式对数据进行分析。

如有计算工具，可应用概率单位分析。

如有不充分的数据用来估计 24 h 和 48 h，及 72 h 和 96h（若可得到）的 LC_{50} ，将发生 100 % 死亡率时的最低浓度和导致 24 h、48 h、72 h 和 96 h 0 % 死亡率的最高浓度记录下来。这些浓度将表明 LC_{50} 可能处于的限度。

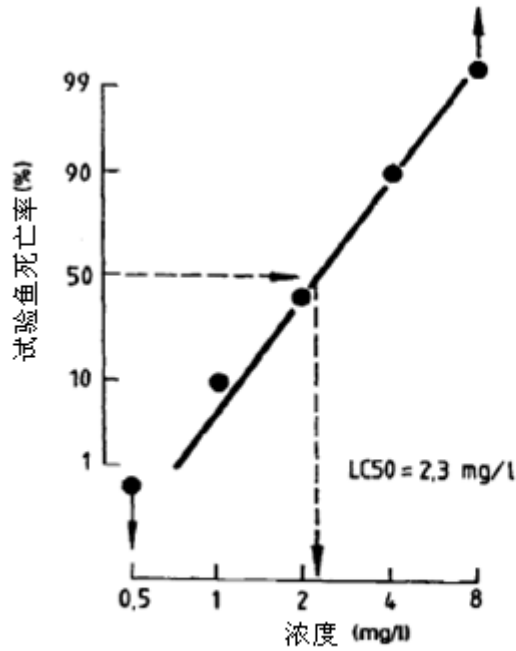


图2 LC₅₀的内插图（对数和概率数值表）

8 试验报告

试验报告应包括以下内容：

--试验条件，控温及曝气情况；

--受试物的化学特性及有关的任何有用信息（例如，水溶性，挥发性，正辛醇/水分配系数，降解率）；

--稀释水、储备液和试液的配制方法；

--在本试验部分中未另外说明，关于试验的所有化学、生物和物理数据，其中包括试验用鱼的环境适应条件的详细内容，及每升水中的载鱼克数；

--评定试验的有效性时所考虑的数据：

- 1) 溶解氧的浓度；
- 2) 对照鱼的死亡率；
- 3) 对照鱼表现出反常行为的比例；
- 4) 参比物质的 LC₅₀ 值；

--列表表明所测试的标称浓度（若可能的话，包括化学分析值）及试验开始后每 24 h、48 h、72 h 和 96 h 中总死亡百分率；

--受试物的 LC₅₀ 值及置信限，若可能的话，包括 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的值；应说明

计算方法及化学分析方法；

--浓度响应曲线的斜率（及其 95 %置信限，若可能的话）；

--浓度响应关系的图解说明；

--鱼在试验条件下的任何异常反应及受试物产生的任何可视性外部效应；

--与本方法这一部分中规定程序的任何差异及其理由。

附录 A

(规范性附录)

喂养和繁育斑马鱼的环境参数

(*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan)

A.1 概述

斑马鱼起源于印度的科罗曼德尔(Coromandel)海岸,生活在急流中。它是一种普通的观赏鱼,所以在有关热带鱼养殖的标准参考书中可找到有关它的管理和养殖程序的信息。

这种鱼的长度很少超过 45 mm,鱼体呈圆柱形,银白色的鱼体上带有 7~9 条深蓝色水平纹。这些条纹延伸至尾部和鳍部。背部呈橄榄绿色,雄性的体形比雌性的小,并带有金色光泽。雌性的银色更加明显,产卵前腹部特别膨胀。

A.2 环境参数

这种鱼可忍受较宽的温度变化、pH 值及水的硬度。有研究认为 15.5 °C~43.3 °C 的温度范围和 6.6~7.2 的 pH 值范围。可在总硬度高达 300 mg/L (CaCO₃) 且 pH 值范围 7.7~ 8.2 自来水中繁育,喂养和管理这种鱼。将温度保持在 26°C ± 1°C,在诱发产卵时提高到 27°C ± 1°C。

A.3 材料与方法

在容量为大约 70 L 的玻璃缸中可容易地使这种鱼产卵。之后,将鱼苗转移到一个容积为 200 升的玻璃缸中。

因为成鱼贪吃鱼卵,所以需要保护刚排出鱼卵和幼鱼的方法。行之有效的方法是将成鱼控制在水中的网箱里,从而在雌鱼产卵时,鱼卵通过网眼落到成鱼触及不到的缸底。

网箱由带 3 mm 网眼的塑料网制作,外形尺寸大约为 250 mm x 250 mm x 80 mm。将它们夹至缸口边缘处,使网箱的整个上缘高出水面,使网眼部分深入水中的距离为 60 mm。不要用底砂过滤系统来进行水净化,因为这可能损坏鱼卵。应每天对玻璃缸照明 8 h。

A.4 调节适应

这一阶段持续大约 2 周。将雄鱼和雌鱼分开饲养,并喂活食物(白虫(线蚓)、水蚤和卤虫)。在驯养期间容量为 70 L 的缸子中投放鱼的密度保持在 30 条以下。到第 2 周末,雄鱼带有深金色光泽,雌鱼因怀有鱼卵而变得体形很大。

A.5 繁殖期

可按如下方式制作产卵箱:

向空箱中注入在 27 °C 下放置 48 h 的干净自来水,并将塑料网箱放入缸内至缸口的下方,为鱼留出容积大约为 1 升的游动空间。早上将六条雌鱼放入篮筐中,并投喂冻干的卤虫。

晚上将九条雄鱼添加到篮筐中，并在关掉照明灯之前再次向鱼投喂冻干的卤虫。

通过晨光来诱发产卵，在光照大约 4 小时后完成产卵。无附着力的鱼卵通过网眼掉落下来，成鱼触及不到它们。

当雌鱼排出全部鱼卵时，将成鱼拿走，并让鱼卵孵化。

A.6 鱼苗的发育

鱼卵在 4 至 5 d 内孵化，鱼苗或刚孵化的小鱼附着在缸壁上，在 24 至 48 h 内静止不动。当鱼苗开始自由游动时，投喂适当的小颗粒专用鱼饲料。3 周后可向鱼苗投喂新孵化出的卤虫，鱼苗在此后的发育速度更快。一个月后，可将它们转移到容积为 200 L 的缸中，投喂活食物和专用饲料的混合物。第三个月性成熟，并达到 3.5 cm 的体长。应注意在某些种类中已观察到发育中的仔鱼自然产生畸变。

进一步的研究表明，食物要素是导致畸形的原因，斑马鱼对这一要素特别敏感（当向其他鱼种投喂相同的专用鱼饲料时，它们正常繁殖）。

附录 B
(资料性附录)
推荐的数据记录表

实验室:	操作者:										
样品号码:	试验开始日期:										
物质:											
纯度:											
杂质:											
如果成分需要测定, 识别的组分:											
储备液的配制方法:					储备液浓度 (mg/L)						
					试验容器中溶剂的最大浓度 (mg/L)						
化学分析方法:											
对照容器数量											
1. 只用稀释水											
受试物:					自试验开始的时间 (h)						
溶解氧浓度 (% ASV ¹⁾)											
pH											
温度 (°C)											
死鱼数量											
2. 稀释水					mg/L 溶剂						
受试物:					自试验开始的时间 (小时)						
溶解氧浓度 (% ASV)											
pH											
温度(°C)											
死鱼数量。											
测试容器编号.					mg/L						
受试物的最初 (测定的或计算的) 浓度											
决定因素:					自试验开始的时间 (h)						
受试物浓度[mg/L (根据分析)]											
溶解氧浓度 (% ASV>)											
pH											
温度 (°C)											
死鱼数量。											
注: 1) 空气饱和值											