

HJ

中华人民共和国国家环境保护标准

HJ□□□-201□

用鱼和海水双壳类软体动物进行
生物浓缩试验

Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and
Saltwater Bivalve Mollusks

(征求意见稿)

20□□-□□-□□发布

20□□-□□-□□实施

环 境 保 护 部 发 布

目 次

前 言.....	I
1 适用范围.....	1
2 术语和定义.....	1
3 方法原理.....	2
4 试剂和材料.....	2
5 仪器和设备.....	3
6 试验.....	3
7 数据结果的处理和有效性.....	6
8 报告.....	8
附录 A（规范性附录）生物浓缩试验的试剂和材料的要求.....	10
附录 B（规范性附录）生物浓缩试验中仪器和设备的要求.....	19
附录 C（规范性附录）最少生物采样程序.....	23

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》，保护环境，保障人体健康，规范用鱼和海水双壳类软体动物进行生物浓缩试验的方法，制定本标准。

本标准规定了用鱼和海水双壳类软体动物进行生物浓缩试验的方法。

本标准的技术内容参照采用《用鱼和海水双壳类软体动物进行生物浓缩试验标准指南》（ASTM E1022-94）。

本标准首次发布。

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：深圳出入境检验检疫局、环境保护部环境标准研究所。

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。

用鱼和海水双壳类软体动物进行生物浓缩试验

1 适用范围

本标准规定了用流动技术对淡水鱼、海水鱼以及海水双壳类软体动物进行生物浓缩实验的方法。

本标准适用于淡水鱼、海水鱼以及海水双壳类软体动物对加在水中稀释的受试物的生物浓缩实验。

2 术语和定义

下列定义和术语适用于本标准。

2.1 表观稳定状态生物浓缩系数 apparent steady-state bioconcentration factor

当受试物在含试验动物的水中浓度均一，BCF 在 2-4 天时间内不发生显著变化。

2.2 试验动物内累积 bioaccumulation

试验动物从环境中吸收某一物质的净累积。

2.3 生物浓缩 bioconcentration

水生生物直接从水溶液中吸收某一物质的净累积。

2.4 生物浓缩系数 bioconcentration factor (BCF)

在生物浓缩试验吸收阶段的任一时刻，水生试验动物一个或多个组织内被吸收受试物的浓度除以该时刻水生试验动物所处的水溶液中同种受试物的有效平均浓度。单位为溶液体积/试验动物质量。(BCFs 通常这样计算，如溶液体积 1L 可与试验动物质量 1kg 相当，因此 BCF 通常不带单位。)

2.5 清除 depuration

生物主动或被动过程消耗的物质。

2.6 清除曲线 depuration curve

在生物浓缩试验清除阶段，受试物在水生试验动物体内浓度对时间作图所得的曲线。

2.7 清除阶段 depuration phase

生物浓缩试验吸收阶段后和在此过程中试验动物在不含受试物的稀释水中的阶段。

2.8 清除速率常数 depuration rate constant

数学意义上的导数值。表示受试物起初在试验动物中，当水生试验动物被投入到无受试

物的稀释水中后，受试物消失的速度。单位通常为时间的倒数。

2.9 有效平均暴露浓度 effective average exposure concentration

在生物浓缩试验吸收阶段任一时刻，受试物在前述阶段被测溶液中的平均浓度。有效暴露浓度不能在达到表观稳定状态之后计算，除非受试物浓度已达到恒定。

2.10 预期稳定态生物浓缩系数 projected steady-state bioconcentration factor

BCF 通过计算 (a) 使用适当隔室模型导出的吸收和清除速率常数导出或 (b) 通过拟合一个适当的有关 BCF 随时间变化的方程得到。

2.11 吸收 uptake

试验动物通过主动或被动过程从环境获得物质的过程。

2.12 吸收曲线 uptake curve

生物浓缩试验吸收阶段试验动物内被测物浓度对时间作图所得曲线。

2.13 吸收阶段 uptake phase

在生物浓缩试验过程中，试验动物暴露在含有受试物稀释水中的阶段。(尽管吸收与清除在吸收阶段都会存在，但是在开始时吸收占主导地位，在吸收阶段后期清除常常变为与吸收相当。偶尔，在吸收阶段清除会超过吸收)。

2.14 吸收速率常数 uptake rate constant

在生物浓缩试验的吸收阶段中，表示受试物被水生生物累积的速率大小的数学导数，以单位时间内每试验动物的溶解量为单位。

3 方法原理

在吸收阶段，试验动物暴露在添加了一些特定浓度受试物的稀释水中，直至达到表观稳定态；在清除阶段，试验动物暴露于无添加任何受试物的稀释水中。试验的两个阶段中，试验动物和水样品定时从试验槽中移出并进行分析，从而通过组织液和水样品中的受试物的浓度计算得到表观稳定态和预期稳定态的生物浓缩系数 (BCF) 以及吸收和清除速率常数。

4 试剂和材料

4.1 稀释水

淡水实验时，稀释水的硬度不超过5 mg/L或平均水平的10%。盐水实验时，盐度不应超过2 g/kg或平均水平的20%。

4.2 受试物

受试物为试剂级或更高级别。

4.3 试验动物

选择合适的试验动物，推荐选择附录 A 表 A.1 选择的试验动物。

试验材料部分的具体要求参见附录 A。

5 仪器和设备

5.1 储水池：

储水池的设计应有利于待测试验动物的驯养、放置和适应。

5.2 构架材料：

可能接触储备液、测试液以及生物用水的设备或设施不能含有化学物。

5.3 测量系统

5.3.1 测量系统必须有测试类别、测试浓度、测试流速的设计；系统可以重复提供待测物质的选定浓度。

5.3.2 在每个试验前，测试系统应该进行校准，必要的时候在测试期间要调整测量系统。

5.3.3 每个试验槽中的流速至少要达到每24小时5倍体积增加物。

5.4 试验槽

试验槽通常由焊接的（非软焊）不锈钢或胶合双倍强度或更强的含有机硅粘合剂的窗户玻璃构成。试验槽尺寸依赖于各试验生物的规模及容纳量。

仪器和设备部分的具体要求参见附录B。

6 试验

6.1 试验条件

6.1.1 溶解氧浓度保持在60%到100%饱和度之间。

6.1.2 离子氨的浓度不应超过 20 $\mu\text{g/L}$ 。

6.1.3 温度：

推荐选择附录 A 表 A.1 所列温度作为鱼浓缩试验的试验温度，在测试过程中，温差不超过 2 $^{\circ}\text{C}$ 。海水双壳类软体动物生物浓缩试验一般温度控制在 8-28 $^{\circ}\text{C}$ 之间，温差必须小于 10 $^{\circ}\text{C}$ ，并保持尽可能低的温度以抑制产卵。

6.1.4 容纳量：

容纳量用试验槽每升溶液中的试验动物的克数（鱼类的全身，双壳类软体动物的整个软组织；体湿需吸干）表示。鱼类和软体动物双壳类的生物浓缩试验，低容纳量和高流速是比较合适的。鱼类容纳量在 24 小时内不超过 1 克/升，且测试期间任何时候都不能超过 10 克/升。

双壳类软体动物的最大容纳量主要取决于在稀释水中食物的数量。如果补充的海水藻类不添加到稀释水中，容纳量为每小时通过试验槽的每升溶液应不超过一个试验动物。

6.1.5 试验设计

生物浓缩试验设计的重点包括每一次处理的试验槽的数目、吸收和清除阶段的持续时间、每个阶段采样点的数目和间隔、每个采样点样本数量和分析的样本数量。适当的采样程序可参见附录C中的表C.1。设立同种试验动物的处理对照组，包括一个吸收阶段和一个清除阶段，在对照处理中，两个阶段中的试验动物暴露在没有添加任何受试物的稀释水中。

6.1.6 吸收时间的选择

吸收时间应该持续至达到表观稳定状态或到了28天，实现表观稳态的标准就是采取适当的间隔的三套样本（鱼的全身及双壳类软体动物的总软组织）的BCFs无显著差异（ $\alpha = 0.05$ ）。以S表示表观稳定状态的天数。

6.1.7 吸收阶段的采样方法

除对照组外，吸收阶段至少有5个采样时间点，5个采样点应接近S/16，S/8，S/4，S/2和S。经过S/4时间，测试样品的浓度不应低于20%。

6.1.8 清除时间的选择——清除阶段应该持续至试验动物样品中受试物浓度小于百分之十的稳定状态浓度或低于检出限。

6.1.9 清除阶段的抽样方法——除对照组外，清除阶段至少有4个采样点，四个取样点依次为D/4、D/2、3D/4和D。

6.1.10 水样的采样方法——清除阶段采集试验动物样品时，至少采集两个样本，样品的测试溶液也应在清除阶段开始的24和48小时之前进行收集，并在清除阶段至少每三天收集一次。

6.1.11 **对照组**——对照组试验动物的取样应在清除阶段开始和结束的时候，对照处理的溶液样品也是如此。

6.2. 试验

6.2.1 将试验动物放置在已达到稳定浓度的测试溶液中，客观随机地分布在各试验槽中。鱼至少每天喂食一次，试验槽每天抽吸清洗一次。测试期间每天都应该观察每次处理试验动物后其患病、受刺激、刺痛和其他不利影响等的迹象。

6.2.2 试验动物的取样

按要求采集试验动物的样品。鱼样以其不受影响的方式取走，每一次处理使用一个不同

的网。鱼样取出后，用蒸馏水漂洗，如有杂质污染需吸干，用解剖针插入大脑杀死或用剪刀切断脊髓以上区域。鱼的重量（体湿需吸干）和标准长度(从鼻尖到尾椎蒂)应该在取样后 15 分钟内测定，如果鱼性成熟，则要确定雌雄。整个身体的分析应在 8 小时内完成，否则用适合受试物的方式保存。

双壳类软体动物取样后要测量从壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离。贝壳通过切断闭壳肌打开，不切开动物，摇动软体动物3次，以消除多余的水，并去除顶部壳。余下的闭壳肌，应从下面壳上所有软组织完好无损地切断去除。称重整个软组织，并且在8小时内分析，否则用适合受试物的方式保存。

在鱼类和扇贝测试中，4 个肌肉样品（有或没有皮肤）或内收肌从其它试验动物的可食性组织中获得，取样时间是在吸收阶段结束时。

鱼性成熟或者有双壳类软体动物产生，应对雄性和雌性的脂肪含量分别测量。对照试验动物中的脂肪含量以及受试物浓度在吸收开始和结束阶段测定。

如使用放射性受试物质，有时需要分析组织样本。

所有被测试试验动物应该在测试结束时销毁。

6.2.3 试验溶液的测量

6.2.3.1 水质—在测量开始时、进行中和完成时需检测稀释水和试验用盐水的硬度、碱度、pH 值和电导率。对照组每周检测一次。盐水的盐度需每天测量。最高测试浓度时的碱度和 pH 值需测定。在双壳类软体动物试验过程中，应该每周测试试验槽中的颗粒物和有机碳总量；如果受试物是一个中性有机化工品，其 $\log Kow$ 大于 4，应该每周测量溶解性有机碳。

6.2.3.2 温度-温度至少每小时监控一次或者每天测定一次最大和最小温度。此外，测试的开始时、进行中和完成时，在所有的测试槽中必须调节温度。

6.2.3.3 受试物

6.2.3.3.1 按要求对溶液中受试物的浓度进行测量。水样应从测试槽中距离顶部、底部和侧面的中间点用滴管或虹吸管或氟烃塑料软管吸取，确保不含有任何液体表面的泡沫或者是从底部或侧面搅起的物质。容器和吸管或虹吸管应该在收集样品前用试验溶液润洗。水样应该收集在合适大小的容器内，以便于受试物可以直接被清除或分析。如果存在于试验溶液的固体颗粒含量大于 5mg/L，需取两个样品，一个样品做上述处理，另一个样品在取样和分析前进行过滤或者离心处理，以确定受试物与固体颗粒相关的百分比。

6.2.3.3.2 在吸收阶段获得的最高测定含量除以最低值必须小于 2。否则，测量系统应被校正，并且应分析从正常的试验槽得到的其他样品，以确定究竟是抽样不当还是分析方法不恰当。

6.2.4 分析

6.2.4.1 除了受试物，通常也要测定在水样和组织样品中其他主要物质。

6.2.4.2 通常在 48 小时的采集时间内对组织样品和水样进行分析。若不能立即分析，应作适当的处理和储存。

6.2.4.3 应尽可能依据相关的国家标准进行分析测定。非离子氨浓度可以从 pH、温度和氨的浓度通过计算而得到。

6.2.4.4 放射性物质的分析：

6.2.4.4.1 当生物浓缩测试通过放射性同位素标记时，组织样品可以通过使用一种组织增溶剂来制备，以方便计算。通过燃烧样品后捕获生成的含放射性同位素标记的二氧化碳，这种方法更为简单。

6.2.4.4.2 当生物浓缩测试通过放射性同位素标记有机物质时，总的放射性应该对所有样品测量。此外，所选的水样和组织样品应该被检测，以确定与杂质、反应和生物降解产物有关的放射性的百分率，这通常用气相或液相色谱的方法。

7 数据结果的处理和有效性

7.1 结果处理

7.1.1 有些情况下，可以从一个试验中计算获得多个结果。如果需要对不同类型的组织样品（整个身体、肌肉等）进行必要的测量，各自独立的结果可以分别从各个样品的测试中获得。同样，如果进行了恰当的测试，独立的结果有时也能适用计算不同类型的物质（母材，杂质，受试物添加了反应和生物降解产物的情况）。如果可能，对（a）测试母液和（b）测试母液添加了结构相似的反应和生物降解产物（难溶于水、有相当毒性）的独立结果的计算是尤为希望得到的。报告的结果应反映实际上进行测量的类型。

7.1.2 水中受试物的浓度 C_w ，以及组织样品中受试物的浓度 C_t ，应通过回收率修正（回收率少于 90%），并用可比的单位表示。例如，如果 C_w 以 $\mu\text{g/L}$ 为单位，则应该以 ng/g 或 $\mu\text{g/kg}$ 为单位。除了人造受试物以外， C_t 应尽可能用对照试验动物的浓度来修正。如果受试物是放射性的， C_w 和 C_t 应用放射衰减和本底放射性来修正。

7.1.3 对于中性试验动物，其 K_{ow} 的对数值大于 4 的，水中可溶解化合物总量的百分比可被估算。第一步是测量水中可溶解化合物总量；从溶解的物质中分离出晶体颗粒，可以用过滤或离心沉淀法，或两者兼用。可溶解化合物的百分比可通过水中的溶解有机碳浓度和化合物的 K_{ow} 来估算。

7.1.4 如果在吸收阶段明显达到了稳定态，表观稳定态生物浓缩系数 BCF 应由达到表观稳定态时获得的 BCF 几何平均值获得，需要达到 95% 的置信限。如果表观稳定态还没达到，则计算吸收阶段末期的 BCF。在任一种情况下，如果吸收曲线并没有以渐进线的方式接近稳定态，则必须计算足够的 BCF 数据点以描述吸收曲线并计算最高的 BCF 点。

7.1.5 吸收速率常数、清除速率常数、预期稳定状态 BCF 都应全部计算并达到 95% 的置信限。它们都可用适当隔室模型和非线性参数估算法来计算。吸收速率常数、清除速率常数、预期稳定状态的 BCF 也可通过图像-代数法求导数，然而 95% 的置信限可能会得不到，则结果可能会被质疑。

7.1.6 如果 BCF 可以测试足够多的次数，预期稳定状态的 BCF 的计算也许可以从测量数据拟合出一个方程。

7.1.7 计算过程以及置信极限的分析应与实验设计的内容相一致。例如，假如点估计和置信限都从置于同一试验槽的测试有机物的数据计算，得到的置信限只能被认为所测试的试验动物的批次内的变动情况，而不是考虑了批次、试验槽、实验室之间的变动。

7.2 试验结果的有效性

当下列一种或多种情况发生时，一个生物浓缩测试通常应被认为是无效的，除非，温度被测量了无数次、只出现高于 6°C 的一次温差的情况。但是，如果温度只进行了最少次数的测量，有一次高于 6°C 的温差就可能意味着，如果继续进行多次测量，就会有更多的这种温差情况。

7.2.1 试验动物在防病菌处理或治疗后 10 天内试验开始进行。

7.2.2 在试验动物被放置于试验槽之前，最后的 48 小时内，在测试温度下动物体不能在稀释的水溶液中喂养。

7.2.3 吸收阶段在明显到达平衡态之前或没到达 28 天之前即被终止。

7.2.4 在任何处理中，超过 10% 的试验动物死亡或者出现明显症状的疾病、受刺激或者其他不良的特征。

7.2.5 在鱼类的试验中所测的最高和最低测试温度相差超过了 6°C，或者在双壳类软体动物的试验中相差超过了 10°C。

7.2.6 在任何试验槽中测量溶解氧浓度的加权平均值少于饱和值的 60%。

7.2.7 在试验溶液的浓度没有按 7.1.10 的要求测试。

7.2.8 在吸收阶段中，受试物测定的最高浓度达到了同一试验槽中测定的最低浓度的 2 倍以上。

7.2.9 当使用放射性同位素标记受试物时，水样和组织样品中与杂质相关的放射性百分率并不

是通过气相或液相色谱确定的。

7.2.10 需要对试验动物、对照试验中的水以及食物中受试物的浓度的影响进行评估。

7.2.11 所有组织分析结果基于湿组织重量，如果结果基于干组织重量，要确定干湿重量比率。

7.2.12 每种分析方法的精确值与偏差应该由恰当的基质来决定，即相关的组织，从含有试验动物的稀释水溶液中提取的样品以及食物。在适当的时候，试剂空白、回收率和认证的相关标准应该在分析样品时被考虑。

8 报告

8.1 生物浓缩测试结果记录应包括以下直接或引用相关信息的信息：

8.1.1 测试名称和研究者姓名，实验室的名称和位置，开始和结束测试的日期；

8.1.2 受试物质的来源，批号、组成（标识以及主成分的浓度和主要杂质），所知的物理和化学性质，所用的任何介质（溶剂）的标识和浓度，此外，如果受试物是放射性的，还要包括杂质的放射性百分比以及确定的方法；

8.1.3 稀释水的来源，化学性质，对任何预处理的描述，任何有关某一物种在水中的生存、发育和繁殖能力的情况说明。

8.1.4 试验动物的来源、学名以及如何检验（适当时，对鲑鱼的应变能力），观察的病况，疾病处理，体温保持状况，适应过程，食物，喂养方法，生长速率，以及（a）对于鱼类，年龄（如果可知），生命阶段，体重平均值和分布范围（体湿需吸干），三个时期的标准长度（吻端到尾柄）：吸收阶段的开始和结束以及清除阶段的结束；（b）对于双壳类软体动物，年龄（如果可知），测试开始前壳嘴的尖端到远端瓣边缘的距离的平均值和分布范围，三个时期软组织体重平均值和分布范围（体湿需甩干）：吸收阶段的开始和结束以及清除阶段的结束；

8.1.5 食物的来源，成分，测试浓度以及其他污染物，喂养频率和配给量；

8.1.6 实验设计和试验槽的描述，试验槽中溶液的深度和体积，每次处理试验动物的数量，容纳量及光照，测量系统的描述，每 24 小时体积增加的流速；

8.1.7 溶解氧浓度（以百分率表示，相对于饱和值）的测量范围和权重平均值，测试前或测试过程中溶液的任何通气情况的描述；

8.1.8 适应的温度范围和平均值，测试温度和测试方法；

8.1.9 进行对照试验时的试验动物的百分率以及其他情况的百分率，其他情况包括死亡、出现疾病症状，受刺激或者其他不良的特征。

8.1.10 在测试中，鱼类是否具有性别特征，或双壳类软体动物是否进行生殖；

- 8.1.11 分析的组织样品和水样的描述，获取、制备和储存样品的方法；
- 8.1.12 水质、受试物的杂质及反应和生物降解产物的浓度化学分析所用的方法和结果（标准偏差和置信限），并考虑合理性分析和试剂空白；
- 8.1.13 脂类测量所用的方法和结果；
- 8.1.14 一组数据表格，包括测试溶液和组织中的受试物（脂类，如果可得）的浓度，表格需有详尽的细节，可以进行独立的统计分析；
- 8.1.15 三者取其一：(a) 表观稳定态 BCF 或者吸收阶段末期的 BCF，(b) 预期稳定状态的 BCF 以及吸收和清除速率常数，(c) 包括 (a) 和 (b)；如果可行，每项数据达到 95% 的置信限，此外，还有所有数据计算方法的描述，包括是否对回收率、背景、放射衰减等作了修正。
- 8.1.16 如果结果基于干组织重量，则需要湿、干组织的重量比。
- 8.1.17 测试中的各种不正常现象，这些现象带来的任何偏差，以及任何其他相关信息。
- 8.2 报告应该包含足够的信息，以清晰地描述试验过程和试验结果。

附录 A

(规范性附录)

生物浓缩试验的试剂和材料的要求

A.1 稀释水

A.1.1 要求—稀释水应 (a) 供应充足; (b) 能被实验试验动物接受; (c) 性质一致; 并且不能对试验结果造成影响。

A.1.1.1 稀释水应不会对试验用动物有不利影响, 对生物浓缩试验来说, 稀释水用于试验动物可接受的最小准则是在健康试验中试验动物在适应环境和试验期间能够幸存, 并没有受到刺激的征兆, 如变色或有不同寻常的行为。另外, 水不应影响试验动物吸收和清除受试物的能力。因此, 接受稀释水用于试验动物试验的一个较好准则是至少有一种水生动物物种能够在其中满意地生存、成长和繁殖。除非稀释水的可接受性已经在之前被证明, 稀释水应在试验期间证明有以下表现, 要么 (a) 至少一种水生动物物种能够在实验室环境或在生命周期毒性试验中能够生存、成长和繁殖, 要么 (b) 至少一种鱼类将在部分生命周期或早期生命阶段毒性试验中表现出可接受性。

A.1.1.2 稀释水不应因为如吸附或络合受试物等原因影响生物浓缩试验结果。因此, 除非如 A.1.1.3 所述, 总有机碳量 (TOC) 和颗粒物质的浓度在鱼的试验中不应超过 5 mg/L, 海水双壳软体动物的试验不应超过 20 mg/L。

A.1.1.4 稀释水的品质在试验中应保持一致。在淡水中进行实验时, 水的硬度范围不应超过 5 mg/L 或平均水平的 10%。在盐水中进行实验时, 盐度不应超过 2 g/kg 或平均水平的 20%。

A.1.1.5 如果想在生物浓缩试验结果中研究环境因素的影响如 TOC、颗粒物或溶解氧, 需要使用自然或人工的高 TOC 或颗粒物或低溶解氧的水。如果使用这种水, 对水的特性进行适当的分析就非常重要, 通过与更多的稀释水的对比试验, 得到特殊用水结果的解释。

A.1.2 来源

A.1.2.1 虽然可以使用再生水, 但一般不在生物浓缩试验中使用, 因为需要的水量很大。另外, 当再生水使用时, 再生水很难提供海水双壳软体动物足够数量的可接受食物。

A.1.2.2 如果使用天然水, 天然水应从未受污染、质量保持一致的水源获得。对淡水来说, 井水和泉水优于地表水。如果使用地表水作为淡水或海水, 取水位置应将质量波动和受污染的可能性降至最小, 使硫化物和铁的浓度最大。

A.1.2.3 对海水双壳类软体动物生物浓缩试验来说, 需要在浮游生物最多的位置取水以维持生

物的生长和生存。

A.1.2.4 不能使用，或准备使用氯化的水作为稀释水，因为所有的余氯和氯产生的氧化剂对水生动物的毒性很大。脱氯水应仅作为不得已的选择，因为脱氯通常都不会完全。亚硫酸氢钠在用于水脱氯时好于亚硫酸钠，但两者都比碳过滤器更可靠，尤其是在除氯胺的时候。一些有机氯胺，无论如何都会缓慢地与亚硫酸氢钠反应。除了余氯以外，饮用水通常含有无法接受的高浓度铜、铅、锌和氟化物，而且质量易变。必要时，额外浓度的大多数金属离子通常需要用螯合树脂去除。如果脱氯水用于稀释水或作为预备水使用，那么（1）稀释水的可接受性在试验中必须得到证明，或者（2）必须在一周不连续的时间内3次满足（a）或（b），（a）指的是在稀释水中的新的汤氏纺锤水蚤，糖虾（一种动物释放不超过30h，能够在没有食物时存活48小时），双壳类软体动物幼虫，或第一龄期水蚤在没有食物时存活48小时。（b）是所有余氯在淡水中浓度或氯产生的氧化剂在盐水中浓度小于8 µg/L。

A.1.3 处理

A.1.3.1 稀释水在加入试验物之前应使用气泡石、表面曝气机或体积曝气机集中曝气。足够的曝气将提高 pH 值，使溶解氧和其他气体达到平衡，并将氧和挥发物浓度降到最小。稀释水中溶解氧浓度的饱和度应在 90-100%之间，这将帮助试验槽中溶解氧浓度达到适宜的值。避免溶解气体的过度饱和导致稀释水发热，防止气泡病的发生。

A.1.3.2 在双壳类软体动物试验时，通常使用未过滤和未杀菌过的天然海水，以尽可能多地提供天然浮游生物食品。

A.1.3.3 除双壳类软体动物试验之外，其他试验可以使用沙、短袜、袋子、深入型套筒过滤，保持颗粒物在适宜的较低浓度并通过紫外杀菌或好的过滤器过滤的预处理，或两者都使用。

A.1.3.4 除双壳类软体动物试验之外，其他试验可能需要地表水源的盐水通过一个 15µm 或更小的过滤器进行有效过滤，以除去寄生虫。

A.1.3.5 除双壳类软体动物试验之外，其他试验用稀释水可能被不需要的微生物污染，这就可能需要一个通过合适的并配备强度计和流量对照的紫外杀菌器，或通过一个 0.22 µm 或小于该孔径的过滤器。

A.1.3.6 如添加物证明对试验动物没有影响，通过添加适当的试剂级化学品、海盐、酸、碱和去离子水或蒸馏水，可以对硬度，盐度，pH 值进行调节。

A.1.4 表征一下述的项目每年应测量两次或两次以上，其前提就是如果使用了地表水或两年内这些项目没有隔半年测定一次：

A.1.4.1 所有的水—碱度，pH 值，电导率，颗粒物，总有机碳，总有机磷农药，有机氯剂

(或总有机磷农药加多氯联苯), 氯化苯氧除草剂, 氨, 氰化物, 硫化物, 溴, 氟, 碘化物, 硝酸盐, 磷酸盐, 硫酸盐, 钙, 镁, 钾, 铝, 砷, 铍, 硼, 镉, 铬, 钴, 铜, 铁, 铅, 锰, 汞, 钼, 镍, 硒, 银和锌。

A.1.4.2 淡水—硬度, 氯化物和钠。

A.1.4.3 盐水—盐分。

A.1.4.4 对每种使用的方法, 检测限应低于 (a) 在稀释水中的浓度, 或是 (b) 已证明对实验试验动物有不利影响的最低浓度。

A.2 受试物

A.2.1 概要—受试物应为试剂级或更高级别, 除非是特定需要的试验研究, 才会使用商用产品, 技术等级或使用级物质。试验开始前, 要了解受试物的以下信息:

A.2.1.1 主要成分和主要杂质的特性和浓度, 例如, 杂质构成超过约 1% 的物质。

A.2.1.2 在稀释水中的溶解性和稳定性。

A.2.1.3 预期稳定状态的 BCF。这可能从具有相同或不同的物种的相同或类似物质的试验结果中得到。作为有机化学品, 这些可以从已报导的稳定状态 BCFs 和这些物理化学性质如辛醇-水分配系数和水中溶解度之间的相关性得到。

A.2.1.4 表观稳定状态的评估时间。

A.2.1.5 实验试验动物的急性毒性 (需要慢性毒性的测量和评估)。

A.2.1.6 计划用水浓度和预期的稳定状态组织中的浓度, 其中的十分之一预期的稳定状态组织中的浓度分析方法的精度和偏差。

A.2.2 放射性同位素示踪实验原料—放射性同位素示踪实验原料偶尔在简化分析试验溶液和实验试验动物时用到。这些物质的有效性极大地被两种情况所限制: (a) 许多放射性同位素原料包含超过 1% 的放射性同位素杂质, 少量的杂质具有很高的 BCF, 这将极大地影响具有较低 BCF 的化学品的表观 BCF, 并且 (b) 放射性同位素化学品在实验试验动物内彻底产生代谢变化, 一种或多种代谢物会有放射性, 化学品的表观 BCF 将会非常高。克服这两个难题的唯一方法是验证在组织中和水中的放射性与母化学品相关。象薄层色谱这样的技术在证明放射性与母化学品不相关上比验证代谢物与母化学品相关更实用。通常需要使用气相色谱进行检测, 这意味着确定有关的 BCF 时, 长远而言, 使用放射性同位素示踪试验原料并不节省资源。

A.2.3 储备溶液—在一些情况中, 试验系统中受试物能被直接添加入稀释水, 但通常受试物都是溶解在溶剂中以形成储备溶液, 之后再在试验系统中加入稀释水。如果使用了储备溶液,

受试物在溶液中的浓度和稳定性应在开始试验之前就已确定。如果受试物会发生光分解，储备溶液应避光。

A.2.3.1 除了分析可水解性、易氧化性、可还原的物质外，试验中首选溶剂是稀释水，虽然试验中需要过滤或除菌（或是两者都需要）。如果稀释水的硬度或盐分不受影响，可使用蒸馏水和去离子水。已经特别开发了几种技术用于准备微溶性材质的水性储备溶液。在准备水性储备溶液时，可以使用最少量的强酸和碱，但这些试剂可能对试验液的 pH 有一点影响。使用更多的可溶性受试物，如氯化物或硫酸盐的有机胺，钠或钾盐的酚类和有机酸，金属的氯化物或硝酸盐（而非碳酸盐或氢氧化物），可能对 pH 值的影响超过使用所需最少剂量的强酸或碱。

A.2.3.2 如果使用除稀释水以外的溶剂，其浓度在试验液中应保持最小并不应降低试验物种的生长和生存。三甘醇因为其对水生动物的低毒性、低波动性和对有机化学品的强溶解能力，在准备储备溶液时往往是一个很好的有机溶剂。其他与水混溶的有机溶剂，如甲醇、乙醇、丙酮，也可以使用，但它们可能会刺激生长不良的微生物，并且丙酮也相当不稳定。如果使用一种有机溶剂，应使用试剂级或更高级别，其浓度在任何试验液中不应超过 0.1mL/L。在准备储备溶液时不能使用表面活性剂，因为它们可能会影响受试物在试验液中的形态（这些限制并不适用于任何成分的混合物，配方设计物质或商业产品，除非这一额外数量的溶剂是用来准备储备溶液）。

A.2.3.3 如果使用除稀释水以外的溶剂，可以同时用两种不相关的化学溶剂或两种不同浓度的同一溶剂进行试验，以获得溶剂对试验结果可能影响的信息。

A.2.4 试验浓度—几种因素可能影响到试验浓度的选择：

A.2.4.1 受试物在试验液中的浓度不能使试验动物受到刺激，否则会对试验期间试验动物有不利影响。最高可接受试验浓度通常通过调节适当的急—慢性比值能够评估得到，对鱼类来说，96-h LC50，对双壳类软体动物，48-h EC50，这个数值是基于晶胚和幼虫的存活和生长得出的，有一些化学品的值是3左右，但也有少数在100以上。

A.2.4.2 为了在吸收阶段和在90%被清除后的实验试验动物中，溶液中受试物的浓度能被精确的测量，试验浓度必须足够高。因此，溶液浓度应等于或高于最高的（a）稀释水背景的3倍；（b）在稀释水中分析方法检测限的3倍；（c）预期稳定状态的BCF实验试验动物中的背景的30倍；以及（d）预期稳定状态的BCF组织中的分析方法检测限的30倍。

A.2.4.3 受试物应溶解在试验液中；受试物不应该存在其他一些形式，如胶体，颗粒，或乳化除非这些都是试验物的内在性质。因为在接近饱和溶液时通常会遇到这些问题，试验浓度通常不应超过试验物在稀释水中溶解度的一半。

A.2.4.4 如果能够评估起在天然水中的预期浓度，并能满足以上条件时，使用此浓度作为试验浓度。

A.2.4.5 如果需要确定是否吸收、清除和BCF与水的浓度无关，应在试验浓度进行生物浓缩试验，其覆盖范围因子将至少为10。

A.3 试验动物

A.3.1 物种—只要可能和合适，试验应使用表1所列物种进行。选择这些物种是基于以下因素：易得；商业，娱乐和生态的重要性；过去的成功运用，以及在实验室中便于处理。鼓励使用这些物种以增加结果的可比较性，以及少量物种具有的较多信息而不是许多物种具有的少量信息的实用性。如果所需物种难以获得，应使用表中所列的物种。仅当特别关注时才使用特殊种属品系物种。使用物种的学名应使用合适的分类学索引进行核实。如果淡水鱼材料的结果可行，同时需要海水动物的结果，通常用一只海水鱼类试验时有一只海水双壳类软体动物会更好，因为，与双壳类软体动物和两者任一种类鱼类之间相比，BCFs将更近似于淡水鱼和海水鱼类之间。

表 A.1 物种和试验温度

物种 ^A	试验温度， °C
淡水类：	
虹鳟鱼， <i>Salmo gairdneri</i> Richardson	12
黑头呆鱼， <i>Pimephales promelas</i> Rafinesque	17, 22
斑点叉尾鮰， <i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque)	17, 22
蓝鳃太阳鱼， <i>Lepomis macrochirus</i> Rafinesque	17, 22
海水类：	
紫贻贝， <i>Mytilus edulis</i> Linnaeus	环境温度
扇贝， <i>Pecten</i> spp.	环境温度
牡蛎， <i>Crassostrea gigas</i> Thunberg C. <i>virginica</i> Gmelin	环境温度
杂色鲮， <i>Cyprinodon variegatus</i> Lacepede	22
底鲮， <i>Fundulus heteroclitus</i> (Linnaeus)	22
小鳍底鲮， <i>Fundulus parvipinnis</i> Girard	17
三刺鱼， <i>Gasterosteus aculeatus</i> Linnaeus	17
钉头鱼， <i>Lagodon rhomboides</i> (Linnaeus)	22
斑鱼， <i>Leiostomus xanthurus</i> Lacepede	22
海鳎， <i>Cymatogaster aggregata</i> Gibbons	12

A 使用物种的学名应使用合适的分类学索引进行核实

A.3.2 尺寸—所有在试验中使用的试验动物尺寸和年龄应一致。

A.3.2.1 鱼—除非需要特殊生命阶段的数据，应使用幼鱼进行试验，确切地说，幼年后期或大

一点的、会积极进食的，但不是性成熟、产卵或最近产了卵的鱼。在任一单一试验中，所有的鱼都应来自同一年龄段，最长的鱼的标准体长（鼻尖至有尾部肉柄）不超过最短鱼的 2 倍。在惯用尺寸的试验槽中要容纳所需数量的鱼，用相对较小的鱼（小于 10 克）是有利的。鱼可接受的最小尺寸决定于其组织中试验物的测定能力，因为鱼需要足够大达到满足在每一条鱼中能进行受试物的测定，甚至有必要时还要在其肌肉组织中进行测定。

A.3.2.1.1 同一物种的成年雌鱼或雄鱼有时具有不同的脂肪含量。因此，在利用有机化学品试验要求 (a) 鱼在试验期间任何时候都未性成熟，或 (b) 在分析的任何时候，每种鱼的性别都应决定和记录，并且雌性和雄性两者的脂肪含量度应分别测量。通常可通过降低温度和缩短日长光周期或两种方式防止性成熟的过程。

A.3.2.2 双壳类软体动物—使用相对较大的软体动物（壳嘴尖部到远端瓣边缘距离大于60mm）会造成正常大小的试验槽很难容纳所需数量的软体动物。但软体动物也应足够大（壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离大于40mm），能达到在动物体中测定受试物的要求，如需要的话，还要在扇贝闭壳肌中能够测量。在任一试验中，所有软体动物应来自同一年龄段，同时最大的软体动物壳嘴尖部到远端瓣边缘距离应不超过最小的软体动物的1.5倍。

备注1：壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离是最客观的定义，通常会在生物浓缩实验中使用到这个参数，也容易测试。一些物种可能需要三维测量。最需要测量的是软组织的重量，但在试验前不能测量，应在试验结束后进行。

A.3.2.2.1 在试验期间应禁止双壳类软体动物产卵。使用性未成熟动物和已知抑制产卵的试验温度都是可用的预防措施。应每天检查试验槽的底部是否有如白色晶胚膜的产卵迹象。

A.3.3 来源-试验中所有动物应为同一来源。实验室培养的诸如黑头呆鱼和杂色鳞通常提供的背景资料、年龄、大小、性质应是众所周知的，并在所有实验室是类似的。其它淡水鱼一般来源于私人或国家孵化所。任何时候使用的鲑鱼或鳟鱼应证明无病，例如传染性的胰脏坏死，疥疮病，肾脏疾病，肠遭红嘴病，眩晕病。证明的要求各个地方不同，各个物种也不同。其它推荐的物种通常从相对无污染的野生群体中获得。

A.3.4 照顾和处理—生物应该妥善照管和处理，使它们免受刺激。

A.3.4.1 每当试验动物被带入一个设施，它们必须被隔离14天或更长时间，直至它们至少看起来无任何疾病。试验动物或水从一台隔离箱向其他箱体转移时不可使用抄网、清洁用品及其它设备。

A.3.4.2 保持试验动物状况良好，避免受到不必要的刺激，它们不应拥挤或承受温度或水质的快速变化。一般来说，在 12 小时内水温改变不应超过 3℃ 以上，最好是 72 小时内变化不超过

3℃，溶解氧的浓度应保持 60%和 100 %饱和度之间，更理想的是加上连续轻柔曝气。总溶解气体浓度应小于 105%饱和度。除双壳类软体动物外，被某些微生物污染的水可经过合适的配备强度计和流量对照的紫外杀菌器，或通过一个 0.22 μm 或小于该孔径的过滤器。在放置及适应箱体中非离子氨浓度应小于 20μg/L。

A.3.4.3 放置及适应箱应该按需要擦洗或刷涂。不同组别试验动物使用之间，箱体应用碘消灵消毒或者用 200mg/L 的次氯酸消毒 1 h，一个小时内刷洗完，然后冲洗干净。

A.3.4.4 试验动物应尽量少处理。当必须处理时，应该轻柔，小心，并要求快速，以免试验动物受到惊扰。在处理过程中生物有受伤或跌落，鱼有接触到干面时，都应该抛弃。处理大于 0.5克鱼的最好的方式是抄网。这种鱼网是市场现有的，也可从小型网状尼龙网、尼龙或蚕丝（绢）筛布、浮游生物网、或类似无结材料织成。处理鳃鱼时网最好涂敷聚氨酯树脂。处理鱼设备在使用期间应用蒸汽或碘消灵或者200mg/L次氯酸钠消毒。处理或喂养之前应该洗手。

A.3.4.5 在隔离、放置和适应期间，每日应仔细观察试验动物，观察其受刺激、物理损害、死亡率、疾病和外来寄生虫的迹象。损伤至死的、异常的个体都应该抛弃。用探头接触打开的双壳类软体动物而它不关闭时应该抛弃这些动物。双壳类软体动物从未打开或没有粪便或类似粪便物时也应该抛弃。如果肉眼可见鱼有不进食或者翻动、闪动、不规律游动、瘦弱、在水面气喘吁吁、过度换气，出血，产生过量粘液，或显示不正常颜色等这些行为和外部表象，其导致原因应被查明。如果试验动物表示出任何的疾病或有外部寄生虫病，应采取适当措施。

A.3.5 喂食：

A.3.5.1 确定受试物在食物中的浓度。

A.3.5.2 鱼类至少每天喂食一次，以供其生存、生长和繁殖。食物必须达到以下要求才能使用在本试验中，（a）一批食物能维持至少一种水产动物的生存、生长和繁殖，或（b）有机氯的浓度不超过 0.15 μg/g（湿重），或有机氯农药（含多氯联苯）的总浓度不超过 0.3 μg/g（湿重）。

A.3.5.3 对于双壳类软体动物，应提供含有充足食物的足量水，以维持其生存和生长。如果使用未加入海藻的未经消毒和未经过滤的天然海水，至少每小时每只动物需要有 1 升水，这通常是壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离为 40 至 60 毫米的软体动物所需要的最小量，如果流速或食物浓度过低，或两者都过低，稀释水中可添加海水绿藻，如巴夫金藻或等鞭金藻,或硅藻如海链藻。

A.3.6 疾病处理-鱼可能是经过化学处理治疗或使用适当的方法来预防某些疾病。如果他们受到严重病变，更好的是立即丢弃整批鱼。有其他疾病的鱼和其他所有患病动物应立即丢弃，

因为系统的细菌感染通常不能有效治愈，没有深入的治疗内部寄生虫不能除去，病毒性传染病就不能得到治疗，而且无脊椎动物几乎不可能得到有效的处理。诊疗后至少 10 天之内不能进行试验，试验中试验动物不允许进行治疗。一般来说，因为在收集或运输期间可能受到刺激或药物处理的缘故，试验动物不应在到达一个设备之前的 16 小时进行处理。然而在某些情况下，有必要立即进行预防性治疗，如在热天时治疗蓝鳃太阳鱼的柱状病。

A.3.7 放置—试验动物应置于未被污染的，温度恒定、水质恒定的并水汽不断的水中，水处于流动系统中，鱼每天至少补充两次大量的水，每个双壳类软体动物（壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离为 40 至 60 毫米）要补充 1 升水/小时；如果流速更快将更理想。试验动物应置于该稀释水中，设置温度为试验温度。表 1 所列温度对放置各物种总体上是好的。但是对于长时间放置，一般来说，保持低于表 1 的温度将会更容易和更安全，因为其代谢率和数量以及疾病暴发程度就会降低。

A.3.8 适应-防止测试试验动物因为试验室中水质或温度的瞬时变化而受刺激，开始试验前几天，适当数量的类似大小的生物应当从放置箱转移到适应池，适应池中鱼每天至少补充两次大量的水，每个双壳类软体动物（壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离为40至60毫米）要补充1升水/小时。水在适应箱体也应逐步改变，两天或两天以上时间内从100%放置水到100%稀释水。同样地，水温也应逐步改变，以72 h之内不超过3℃的速度变化，最后达到试验温度。所有动物在放到试验室之前必须喂养在稀释水中，在试验温度下保持至少48小时。倘若未得到充分的实验确定，适应期可能要花更长的时间。因此，可能时使用长于最低指定值的适应期。

A.3.9 性质-所有用在测试中的试验动物应在可接受的性质范围内。

A.3.9.1 损伤、死亡、异常及生病的动物应按照A.3.4.5和A.3.6处置。

A.3.9.2 动物应该 (a) 用水和食物来养殖，食物至少能支持试验动物的生存，生长，繁殖； (b) 从未加料和化学处理的水体中获得以及用满足以上要求的水和食物喂养；或 (c) 分析表明：

(1) 不含有高浓度的化学物质，这些化学物是它们可能接触的 (2) 或者有机氯的浓度不超过0.15 µg/g（湿重）或有机氯农药总浓度（含多氯联苯）不超过0.3µg/g（湿重）。对(c)来说，一批生物中分析几个有代表性的动物足够了；不必要分析每一批动物或者每一个试验前都分析。

A.3.9.3 对于试验化学品，应分析几个代表性的试验动物。如果测试样品浓度超过10%的预期稳定状态的浓度，试验动物在稀释用水中保持一段时间或使用其它试验动物可能是合适的。

A.3.9.4 到达实验室后，软体动物至少4天、鱼类至少14天才能用于试验。

A.3.9.5 试验动物如果有个别看起来是染病的或以其他方式显示异常，或者在测试前48小时之

内超过3%的生物死亡，那么这组动物应弃而不用。如果某一动物种群不能符合这些标准，所有个体都不能使用，或进行额外的10天处理，有必要的时候再进行适应试验。

附录 B

（规范性附录）

生物浓缩试验中仪器和设备的要求

B.1 设备

流动储水池应有利于待测试验动物驯养，放置，适应。抬高装稀释水的水箱或流浆箱，或两者均抬高，稀释水可由无压给料进入保持适应水池或测量系统，这一系统用于准备测试液和将测试液转送至测试槽。供水系统应带有过滤器和鼓气装置。试验槽应置于恒温，循环水条件下。流浆箱，放置、驯养、适应水箱需要通风，控温。通风的空气应无油、烟、水，需过滤去除油和水，最好使用0.22 μm 细菌过滤器过滤空气。在放置、适应、测试期间，应使用遮挡物或分割区保护试验动物免受干扰，防止不必要的惊扰。实验室必须通风良好，空气无烟。为了进一步降低测试化学品和其他物质，特别是挥发性物质对实验试验动物的污染，放置、驯养、适应水箱不能放置于进行生物浓缩或毒性试验的房间，也不能置于准备储备液、测试液以及设备清洗的场所。16小时光照和8小时黑暗的光照周期通过计时设备可方便控制，但更理想的是12小时光照-12小时黑暗或者14小时光照-10小时黑暗的光照周期，因为这样会延缓试验动物的生长。当光开启时，最好有15-30分钟的过渡期，以降低试验动物因突然的光照而受到刺激；光关闭时也最好有过渡期。

B.2 构架材料

可能接触储备液、测试液以及生物用水的设备或设施不能含有化学物，这些化学物可能是通过水溶液渗透或溶解进入，进而反作用于试验动物。另外，这些设备和设施应选择能减少受试物从水中吸附的材料。优先选择使用玻璃、316号不锈钢、尼龙和氟塑料等材料，以尽量减少物质的渗透、稀释、吸附，有一个特例就是在海水下测试金属时不应使用不锈钢。混泥土和硬塑胶（未添加增塑剂）可用来制作成驯养、放置、适用环境的水箱和再生水系统，在使用前须用流动的稀释水浸泡数天。再生水系统不应该在海水条件下使用铸铁管，因为胶体铁将被加入到稀释水，滤网需要清除铁锈粒子。特别设计系统通常是从天然水源中取得海水，在储备液和待测液测试之前或测试过程中，紫铜、黄铜、铅、镀锌金属和天然橡胶不应接触稀释水。氯丁橡胶及以上没有提及的材料不应该被使用，除非是一个敏感水产品种，生存时间为48或96个小时，在使用那些材料前应在静水中浸泡。

B.3 测量系统

B.3.1 测量系统必须有测试类别、测试浓度、测试流速的设计；系统可以重复提供待测物质的选定浓度的设计。组合各种洗涤器、“浸渍鸟”、虹吸管、泵、螺线管、阀等的各种测量系统已成功被使用。由于生物浓缩试验通常有一个对照处理和受试物的浓缩，测试系统通常由以下部分组成，一个测量受试物溶液的设备，两个测定稀释水的装置和两个小型混合槽（或分离槽，如果需要使用两个试验槽），混合槽用于在进入试验槽前混合各自的测试溶液。

B.3.2 在每个试验前，测试系统应该进行校准，校准通过测试经过每个试验槽的流速和测量在每个槽中受试物的浓度或在测量系统中每个部分的体积进行。在整个测试过程中，应该每天上下午目测测量系统运转情况。必要的时候在测试期间要调整测量系统。

B.3.3 每个试验槽中的流速至少要达到每24小时5倍体积增加物，根据容纳量的情况可能更大。在双壳类软体动物的试验中，最小流速还取决于在稀释水中食物供给的数量。通常使用至少每24小时10倍体积增加物的流速比较理想，尤其在试验的初始阶段当吸收最大的时候，但是较高的流速会增加稀释水和使用的受试物的数量。如果由微生物降解、水解、氧化、光解、还原、吸附或挥发作用使得受试物快速流失，使用一个较高的流速也是比较理想的。在试验的任一特定时间里，通过任两个试验槽的流速差别不能超过10%。假如相同数量的实验试验动物从所有的容器中移出，在所有试验槽中，只要流速保持在至少每24小时5倍体积增加物，而且容纳量和温度保持在合理范围，溶液的深度或者流速，或者两者会等量减少。

B.4 试验槽

B.4.1 在一个对水生物的毒性测试中，一个试验槽应是一个最小的物理单元场所，并且要无水源。不过，每个试验槽里面可以用屏风和杯子来制造两个或两个以上的隔间。这样溶液就可以从一个隔间流到另一个隔间，为了保证精确度，不能从一个试验槽到另一个试验槽。因为试验中溶液可以在同一个试验槽内的不同隔间中流动，这些同一试验槽的隔间中的溶液温度、试剂的浓度、病原菌含量和外界污染情况就会比同样试验条件下不同试验槽的隔间之间情况更相近。试验槽应该被保护起来，这样才可以防止外来细菌以及降低试剂和受试物的蒸发。在测试中，所有的试验槽和隔间必须完全一致。

B.4.2 试验槽通常由焊接的（非软焊）不锈钢或胶合双倍强度或更强的含有机硅粘合剂的窗户玻璃构成。塞子和硅树脂粘合剂会吸附一些很难去除的有机氯和有机磷农药。因此，试验溶液应尽可能避免与塞子和胶粘剂接触。如果实在需要额外的胶粘剂，它们也应位于容器之外，而不是容器内部。

B.4.3 最小尺寸的试验槽和最小深度的试验溶液依赖于各试验生物的规模及容纳量。试验槽的

最小的横向尺寸应至少是最大的试验生物的最大横向尺寸的 1.5 倍。鱼的试验溶液的深度应该至少是最大的实验试验动物高度的 3 倍；此外，对于超过 0.5 克（湿重）的鱼，试验溶液的深度至少应为 150 毫米，对于较小的鱼，试验溶液的深度至少应为 50 毫米。对于扩充至 150 毫米的容器，顶部有时需要加盖，以防止鱼跳出。对于双壳类软体动物，在整个试验过程中试验溶液应该彻底淹没该生物。对于壳嘴的尖端到远端瓣的边缘的距离小于 60 毫米双壳类软体动物的试验，以及对于小鱼（少于 10 克）的试验也常常使用 300 毫米深的全玻璃试验槽以及 30 升的溶液。在试验槽中使用了过量的溶液将不必要地增加稀释水和试验使用的受试物的量或者平均保持时间，或两者都不必增加。

B.4.4 清洗——测量系统、试验槽以及用于准备和贮存稀释水、储藏溶液以及试验溶液的设备应清洗后才能使用。新的设备应该用洗涤剂冲洗，用水、水混溶的有机溶剂、酸的水溶液（如 10% 的浓盐酸）漂洗，并至少两次由蒸馏水、去离子水稀释水漂洗。（某些有机溶剂，可能留下不溶于水的薄膜。）重铬酸钾—硫酸清洁液，可用于同时含有有机溶剂和酸的地方，但它也可能会损坏有机硅粘合剂，因此需要特殊的处理技巧。在每次试验结束后，所有设备若要再次使用，应立即（a）清空，（b）用水漂洗，（c）按适当的程序清洗，去除受试物（如，使用酸以消除金属及碱；使用洗涤剂、有机溶剂或活性炭以去除有机化学品），（d）用蒸馏水、去离子水或稀释水冲洗至少两次。酸用于去除矿物质，每升 200 毫克的次氯酸用于去除有机物和消毒。（每升 200 毫克的 OCl^- 可通过 6 毫升液体家用含氯漂白剂加 1 升水中获得。氯酸盐对于大部分水产动物来说是有毒的，并且它很难从材料上冲洗掉。这常常是通过与硫代硫酸钠、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠反应，或通过蒸馏水中 20 分钟的高温消毒，或通过干燥设备并放置至少 24 小时后才开启使用来去除。）测量系统和试验槽应在使用之前用稀释水清洗。

B.5 可接受性——新放置、适应以及试验设施应进行毒性试验后才能开启使用。

B.6 安全措施

B.6.1 如果预防措施不充分，许多化学品可能对人类有不良影响。因此，应该通过配戴合适的防护手套（尤其是当清洗设备或把双手放入在试验溶液中时）、实验服、围裙、眼镜，或通过使用抄网或钳以消除试验动物中的试验溶液来尽可能地减少所有受试物和溶液与皮肤的接触。

B.6.1.1 对挥发性物质进行测试时，应考虑特别的安全措施，如封盖试验槽、对容器周围的通风以及使用油烟罩。试验开始前应对其毒性、建议处理程序以及受试物的化学和物理性能加以研究。在使用放射性受试物或可致癌或怀疑可致癌的化学品时，必需使用特别措施。

B.6.2 虽然在大多数情况下，对储备液、试验溶液以及试验生物的处置没有什么特别问题，但

在开始测试之前，还是要对卫生和安全防范措施以及适用的法律法规加以研究。在处置储备液和试验溶液之前，有必要去除或降解受试物。

B.6.3 清洗含挥发性溶剂如丙酮的设备，只能在通风良好的环境中进行，此时该环境中不允许吸烟，不允许有任何明火，包括指示灯。

B.6.4 酸性溶液不应与次氯酸钠溶液混合，否则可能会产生有害的烟雾。

B.6.5 为保护双手不被锋利的贝壳划破，处理双壳类软体动物时必须戴上棉手套（如果有必要的话，还应使用适当的防护手套）。

B.6.6 因为稀释水和试验溶液通常是良好电导体，使用接地系统和检漏仪有助于避免电冲击的影响。食盐水是很好的导体，故强力推荐使用防护装置。

B.6.7 准备稀释酸溶液时，应将浓酸加入水中，而不是反过来。打开一瓶浓酸，或将浓酸加入水中，而且必须在通风橱中进行。

附录 C

(规范性附录)

最少生物采样程序

表 C.1 最少生物采样程序

物质	1	2	3	4
Log K _{ow} ^A	3.13	5.01	5.73	5.89 ^B
S ^C (days)	2	12	24	28 ^B
吸收阶段 ^D				
Initial	0	0	0	0
S/16	0.13	0.75	1.5	1.8
S/8	0.25	1.5	3	3.5
S/4	0.5	3	6	7
S/2	1	6	12	14
附加 ^E	18	21
S	2	12	24	28
S+1 ^F or S + S/12 ^G	3	13	26	... ^H
U=S+2 ^F or S+S/6 ^G	4	14	28	... ^H
清除阶段				
U+D/4	4.5	17	4.5	35 ^J
U+D/2	5	20	5	42 ^J
U+3D;/r	5.5	23	5.5	49 ^J
U+D	6	26	6	56^J

A K_{ow}=辛醇-水分配系数。

B 或更高。

C S=预计表观稳定状态的天数（在这些例子中，S从K_{ow}估算出）。

D U 吸收阶段长。

E 额外中期采样点，使任何两个连续的点多余七天。

F 当S少于12天时。

G 当S在12至24天之间。

H 吸收阶段不超过28天。

D 清除阶段=S的长度。

J D=S=U=28天。