

中华人民共和国国家标准

GB/T 21828—2008

化学品 大型溞繁殖试验

Chemicals—*Daphnia magna* reproduction test



081006000213

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

2008年10月 7日
发布

目 次

前 言	III
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 受试物信息	1
4 原理	2
5 参比物	2
6 仪器和设备	2
7 试验准备	2
8 试验程序	3
9 质量保证与质量控制	5
10 数据与报告	6
附录 A(规范性附录) Elendt M4 和 M7 培养基的制备	8
附录 B(资料性附录) 总有机碳(TOC)分析与喂食的藻中 TOC 含量的线性图绘制	10
附录 C(资料性附录) 培养基更换,物理-化学监测数据,喂食、大型溞繁殖和亲溞死亡率数据记录表 ...	12
附录 D(资料性附录) 化学分析结果记录数据表	13
附录 E(资料性附录) 时间-加权平均值的计算	14
参考文献	16

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 211(1998 年)《大型蚤繁殖试验》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改:

——将术语和定义从原文的附录调整为正文内容;

——将计量单位改为我国法定计量单位。

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 为资料性附录。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:环境保护部化学品登记中心。

本标准参加起草单位:沈阳化工研究院安全评价中心、环境保护部南京环境科学研究所、上海市检测中心。

本标准主要起草人:沈英娃、菅小东、周红、蔡磊明、赵玉艳、周军英、李康。

化学品 大型溞繁殖试验

1 范围

本标准规定了大型溞繁殖试验的原理、仪器和设备、试验准备、试验程序、质量保证与质量控制、数据与报告。

本标准适用于测试与评价可能暴露于水生生态环境的化学品对大型溞繁殖的影响。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

亲溞 parent animals

试验开始时用于繁殖的雌溞。

2.2

幼溞 offspring

试验期间亲溞所产的溞。

2.3

死亡 mortality

溞体不动,即不能游动,或轻晃试验容器,15 s内溞的附肢或后腹部也未见活动。

2.4

最低可观察效应浓度 lowest observed effect concentration, LOEC

与对照相比,对受试生物产生显著($P < 0.05$)效应的最低受试物浓度。

2.5

无可观察效应浓度 no observed effect concentration, NOEC

试验中直接低于 LOEC 的受试物设置浓度,即与对照相比,对受试生物未产生显著($P < 0.05$)效应的最高受试物设置浓度。

2.6

效应浓度 EC_x

引起受试生物繁殖量降低 $x\%$ 时的受试物浓度。

2.7

内禀增长率 intrinsic rate of increase

理想状态下种群的最大瞬时增长率。稳定状态的种群,内禀增长率为零;增长的种群,内禀增长率为正;衰退的种群,内禀增长率为负。

2.8

检出限 limit of detection

可以检出但不能定量的最低浓度。

2.9

检测限 limit of determination

可定量测定的最低浓度。

3 受试物信息

a) 结构式;

- b) 纯度;
- c) 水中溶解度;
- d) 蒸气压;
- e) 在水中和光中的化学稳定性;
- f) 在试验条件下的稳定性;
- g) 正辛醇-水的分配系数(P_{ow});
- h) 在水溶液中的可靠的定量分析方法、回收率以及检测限;
- i) 大型蚤急性毒性试验结果;
- j) 快速生物降解性试验结果。

4 原理

将蚤龄小于 24 h 的幼雌蚤(亲蚤)暴露于一定浓度范围的受试物溶液中开始试验。试验周期为 21 d。试验结束时,应对每只存活亲蚤繁殖的存活幼蚤的总数量进行评价(即不包括试验期间死亡的幼蚤)。亲蚤的繁殖量也可以用其他方式表示,如从产生头胎幼蚤开始平均每只亲蚤每天产生的存活幼蚤数量,不过这些结果应另外计算。通过对暴露于受试物中的亲蚤繁殖量与对照比较,确定最低可观察效应浓度(LOEC)和无可观察效应浓度(NOEC)。如可能,利用回归模型估算 EC_{10} (如 EC_{50} 、 EC_{20} 或 EC_{10})。

还应记录存活的亲蚤数量和产头胎蚤的时间。其他参数,如生长情况(体长)和内禀增长率也应研究。

5 参比物

无推荐参比物

6 仪器和设备

6.1 接触到试验溶液的试验容器和其他设备最好是全玻璃制品或由其他化学惰性材料制成。试验容器通常为烧杯。

需用下列部分或全部仪器设备:

- a) 溶解氧测定仪(带有微电极或其他能够测定少量样品的溶解氧浓度的适当装置);
- b) 适当的温度控制设备;
- c) pH 计;
- d) 测定水硬度的设备;
- e) 总有机碳(TOC)测定仪或化学需氧量(COD)测定仪;
- f) 控制光照的设备以及测定光照强度的设备等。

7 试验准备

7.1 受试生物

7.1.1 受试生物的选择

受试生物为大型蚤(*Daphnia magna* Straus)。无性繁殖系最好用基因型进行鉴定。研究^[1]表明,在本标准给定条件下培育,品系 A(来源于法国的 IRCHA)^[3]始终满足质量控制要求,即存活亲蚤所产幼蚤的平均值不少于 60 只。若能满足质量控制要求,也可以使用其他的蚤类品系。

7.1.2 受试生物的驯养

试验开始时,试验用蚤应是小于 24 h 的非头胎蚤。试验用蚤应来源于同一个健康的保种培养,即未表现任何受胁迫现象(如死亡率高,出现雄蚤和冬卵,初产延迟,体色异常等)。日常培养的条件(光

照、温度、培养液、喂食单位体积的动物数量)必须和试验条件一致,如果试验时蚤类培养基与日常使用的培养基不同,试验前最好设置驯养期,一般试验用蚤应在试验条件下驯养 3 周(即一代)以避免新培养基对亲蚤产生胁迫作用。

7.2 试验条件

7.2.1 试验用水

- 推荐使用规定的培养基,如 Elendt M4 和 M7 培养基(见附录 A)。若能满足大型蚤培养的要求,也可考虑其他培养基^{[5]、[6]}。
- 如果使用的培养基中含有未规定的添加成分,应在报告中详细说明,特别是含有含碳组分。建议测定培养基的总有机碳(TOC)和(或)化学需氧量(COD)。建议培养基(在添加藻类食物之前)中的 TOC 应小于 2 mg/L^[7]。
- 当受试物含有金属时,应特别注意培养基的性质(如硬度、螯合能力)有可能发生改变并改变受试物的毒性效应。建议不使用 Elendt M4 和 M7 培养基,同样含有已知螯合剂的其他培养基也尽量避免用于含有金属物质的测试。可选择替代培养基,如不含有 EDTA 的 ASTM 新鲜重组水^[7],并加入海藻提取物^[8]。这种 ASTM 新鲜重组水和海藻提取物的混合物也适合大型蚤的长期培养和试验^[3],尽管海藻中的有机物与金属也有微弱的螯合作用。
- 试验开始和试验期间溶解氧浓度应大于 3 mg/L。pH 值在 6~9 范围内,在同一个试验中变化不能超过 1.5 个单位。硬度大于 140 mg/L(以 CaCO₃ 计)。

7.2.2 试验液

- 选择的试验液浓度一般由贮备液稀释而成。贮备液最好是将受试物加入到试验用水中配制而成。
- 应尽量避免使用溶剂、乳化剂或分散剂,尽管有时需要使用这些物质来配制适当浓度的贮备液。常用的溶剂有丙酮、乙醇、甲醇、二甲基甲酰胺和三甘醇。常用的分散剂有聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、0.01%的甲基纤维素甲醚和聚氧乙烯化氢化蓖麻油。有机溶剂或分散剂在溶液中的最大允许浓度不能超过 0.1 mL/L。在此浓度下,上述溶剂和分散剂无毒且不会提高物质的水中溶解度。任何情况下,受试物的浓度不能超过其在试验用水中的溶解度。

8 试验程序

8.1 暴露条件

8.1.1 试验周期

试验周期为 21 d。

8.1.2 负荷

亲蚤分开培养,每个容器一只,容器中培养基体积 50 mL~200 mL。

尽管允许合并各平行的溶液进行化学分析,有时为了分析测定受试物浓度,需要增加溶液的体积。如果溶液体积超过 100 mL,需要加大对大型蚤的喂食量,并满足喂食标准。对于流水式试验,由于技术原因,试验可以分成 4 个平行,每组 10 只蚤,放在一个较大的容器中,如果试验设计有变化应在报告中注明。

8.1.3 受试生物

- 对于半静态试验,每个试验浓度至少 10 只蚤,并单独分开培养,对照组同样处理。
- 对于流水式试验,40 只蚤分成 4 组,每组 10 只比较适宜^[1]。也可以减少试验生物至少 20 只平均分成 2 个或 4 个平行。

注意:这样以来,如果亲蚤有死亡,就无法计算试验结束时每只存活亲蚤的繁殖量。因此,繁殖量应该以试验开始时亲蚤总数所产存活幼蚤总数表示。

- 亲蚤应被随机分配到各试验容器中,而且此后的操作也都应该按照随机的方式进行。否则会

因偏见导致对浓度影响的错误分析。尤其是按处理组或浓度顺序放置时,一些与时间有关的影响因素,如操作者疲劳或其他过失,都会对高浓度组导致更大的影响。此外,如果试验结果可能受初始因素或环境的影响,如在实验室的位置,应考虑结束试验。

8.1.4 喂食

- a) 对于半静态试验,最好每天喂食,至少也应每周3次(即更换溶液)。否则(如采用流水式试验)应在报告中注明。
- b) 试验期间亲蚤的食物可用:小球藻(*Chlorella* sp.)、羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*) [现为 *Pseudokirchneriella subcapitata*^[11]]和栅藻(*Scenedesmus subspicatus*)。喂食量应以提供给每只亲蚤有机碳数量为基础。研究表明,大型蚤的喂食量(以碳计)为 $0.1 \text{ mg} \sim 0.2 \text{ mg} \cdot (\text{蚤}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ 就可以完全满足繁殖试验的要求^[12]。喂食量在试验期间可以保持不变,也可以在初期稍低,随着亲蚤的生长逐渐增加,但始终应在推荐的范围内,即 $0.1 \text{ mg} \sim 0.2 \text{ mg} \cdot (\text{蚤}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ 。
- c) 如果用替代测定的方法,如藻细胞数量法或光吸收法,来计算喂食率(由于碳含量测定受时间限制,为方便起见,可用这些方法替代),每个实验室都应单独建立碳含量和藻细胞浓度之间的直线图(见附录B)。直线图应至少每年校准一次,如果藻类的培养条件发生变化,还应增加校准频率。此外发现光吸收法比藻细胞数量法更适合做替代测定^[13]。
- d) 应给大型蚤喂食经浓缩的藻液,以减少进入试验容器中的藻培养基。浓缩藻液可通过离心获得,然后用蒸馏水、去离子水或蚤培养液使其重新悬浮。

8.1.5 光照

每天16 h光照,光照强度不超过 $1\,110 \text{ lx} \sim 1\,480 \text{ lx}$ ($15 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \sim 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)。

8.1.6 温度

试验溶液的温度应控制在 $18^\circ\text{C} \sim 22^\circ\text{C}$ 。同一试验中,温度变化小于或等于 2°C (如 $18^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$, $19^\circ\text{C} \sim 21^\circ\text{C}$ 或 $20^\circ\text{C} \sim 22^\circ\text{C}$)。可以另外加一个试验容器监测温度变化。

8.1.7 曝气

试验期间无须曝气。

8.1.8 试验浓度

- a) 应预先知道受试物的毒性(通过急性毒性试验或浓度范围确认试验得知),以助于选择适当的试验浓度。
- b) 正式试验一般包括5个浓度,按几何级数排列,浓度的间隔系数不大于3.2,每个浓度应有适当的平行数量和蚤数。如果试验浓度少于5个,应在试验报告中给予合理解释。受试物浓度不能超过其在试验溶液中的溶解度。
- c) 设置浓度范围时,应注意:
 - 若旨在获得 LOEC 和(或) NOEC,最低试验浓度组的繁殖量不能显著低于对照组。否则,应降低试验浓度重新试验;最高试验浓度组的繁殖量应显著低于对照组。否则,应提高试验浓度重新试验。
 - 若旨在获得 EC_{50} ,应有足够多的试验浓度来计算 EC_{50} 和置信区间。若评估繁殖效应的 EC_{50} ,最高浓度应大于 EC_{50} ,否则,尽管也可以推测出 EC_{50} ,但 EC_{50} 的置信区间将会过宽,很难用合适的模型评价。
 - 试验浓度范围最好不包括对亲蚤的生长产生显著影响的浓度。否则会改变试验的初衷,使统计分析的参数变得复杂。
 - 当使用溶剂或分散剂来配制试验溶液时,其在最终溶液中的最大允许浓度不能超过 0.1 mL/L ,并且在所有试验组中保持一致。

8.1.9 对照

- a) 应设置空白对照组,若使用溶剂或分散剂,还应增设溶剂或分散剂对照组,溶剂或分散剂的浓度应与含有受试物的容器中的一致。应设适当的平行数。
- b) 对照组每个亲蚤间的繁殖量的变异系数应小于或等于 25%,对于亲蚤使用单独培养方式设计的试验来说,应在报告中注明。

8.1.10 试验培养基更换

- a) 试验培养基的更换频率取决于受试物的稳定性,但至少每周 3 次。若在为期最长 3 d 的稳定性预试验中表明受试物不稳定(如在设定值的 80%~120% 范围外或低于初始浓度测定值的 80%),应考虑增加更换频率,或使用流水式系统。
- b) 半静态试验的溶液更换时,应准备另一套试验容器用于放置亲蚤,可以用内径合适的玻璃吸管转移亲蚤。转移亲蚤时应尽量减少所吸原培养基的体积。

8.2 观察

试验期间的观察结果应形成记录表格(见附录 C 和附录 D 的示例)。如果要求测定其他参数,其他观察指标也是应该的(见第 4 章和 8.5)。

8.3 幼蚤

从头胎蚤开始,每天从试验器皿中移出幼蚤,以避免消耗食物影响母蚤。计数存活的幼蚤,对死胎和死亡的幼蚤也要进行记录。

8.4 死亡率

试验期间应每天记录亲蚤的死亡情况,至少与幼蚤记录次数相同。

8.5 其他参数

尽管本准则设计的主要目的是评价对繁殖能力的影响,其他的影响因素也可能被充分定量并满足统计分析的要求。既然有足够的信息表明可能的亚致死效应会比单一的繁殖力更能说明问题,因此生长力测量是非常值得一提的参数;另外建议在试验结束时测定亲蚤的体长(不包括尾刺)。其他观察的指标包括:亲蚤第一次产蚤时间(及尔后产蚤时间)、每只亲蚤产蚤批数和每批数量、死胎数量、雄蚤数或冬卵、种群内禀增长率。

8.6 分析测定频率

8.6.1 至少每周测定一次对照组和最高试验浓度组的新、旧溶液的溶解氧浓度、温度、硬度和 pH 值。

8.6.2 试验期间,应定期测定受试物浓度。

8.6.3 半静态试验的受试物浓度应保持在配制浓度的 $\pm 20\%$ 的范围内。建议试验开始第一周内更换试液时至少测定一次最高和最低浓度组的新配制的溶液(新、旧溶液应为同一试液中的样品)。此后,至少每周分析一次。

8.6.4 当受试物浓度不在配制浓度的 $\pm 20\%$ 内,必须分析所有新、旧试验溶液。当初始浓度是可重复且稳定的,即在初始浓度的 80%~120% 范围内,第 2 周~第 3 周内的化学测定可减少到只测最高与最低浓度组。在所有情况下,仅在每一浓度的一个平行容器被更新之前测定受试物浓度。

8.6.5 若采用流水式试验,除无需测定待更新试验液之外,半静态试验中所述采样方法同样适用。在试验第一周,应增加随机采样次数以确保试验浓度保持稳定。应每天检查稀释率及受试物浓度。

8.6.6 在整个试验期间,若证明受试物浓度保持在配制浓度或初始测定浓度的 $\pm 20\%$ 内,那么结果应以配制浓度或初始测定浓度为基础。若偏差大于配制浓度或初始测定浓度的 $\pm 20\%$,结果应以时间-加权平均值(参见附录 E)表示。

9 质量保证与质量控制

9.1 试验开始时所用亲蚤龄小于 24 h,且为非头胎蚤。

9.2 为保证试验的有效性,对照组应符合以下要求:

- a) 试验结束时,亲蚤的死亡率不能超过 20%;
- b) 试验结束时,每只存活亲蚤所产成活幼蚤的平均值不小于 60 只。

10 数据与报告

10.1 数据处理

10.1.1 按每个试验容器(即平行)计算每只亲蚤所产幼蚤总数。任一平行中,若亲蚤在试验期间死亡或转化成雄蚤,则应在结果处理时排除此平行。统计分析应以扣除后的平行数量为基础。

10.1.2 为了求化学品对繁殖量影响的 LOEC 和 NOEC,可用方差分析(ANOVA)计算每一浓度几个平行的繁殖量平均值和组内剩余偏差,这些可用变异分析。采用一个合适的多重比较法,如 Dunnett 和 william 检验^{[14],[15],[16],[17]},对每一浓度的平均值与对照平均值进行比较。并建议形成图表的形式而不是仅仅做一个显著性检验^[18],如 Bartlett's 检验。如果不做此假设检验,在进行方差分析(ANOVA)前还应先转换数据做齐性检验,或进行加权方差分析(ANOVA)。

10.1.3 应采用统计方法(如最小二乘法),拟合适当的回归曲线(如对数曲线)。曲线应表明参数,计算 EC₅₀、标准误差、置信限。

10.1.4 在最后验证试验的数据分析中^[2],可使用式(1)作对数曲线图,亦可采用其他模型:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

Y——试验结束时每只存活亲蚤所产幼体总数(对每一容器进行计算);

x——浓度;

c——当 x=0 时幼体的期望值;

x₀——种群中的 EC₅₀;

b——斜率值。

此模型适用于大多数情况,对于不适合的情况应进行检验。有些情况下,低浓度有促进效应时使用刺激模型是可行的^[19]。

也可以估计其他效应浓度,如 EC₁₀ 或 EC₂₀,尽管它可以采用与估计 EC₅₀ 不同的模型参数。

10.2 试验报告

试验报告必须报告下列内容:

10.2.1 受试物

- a) 物理属性和相关理化性质;
- b) 化学鉴定数据,包括纯度。

10.2.2 受试生物

品系(无论是否进行过遗传鉴定)、提供者(如果已知)和培养条件。如果不使用大型蚤,而用其他种类,应做鉴定并在报告中注明。

10.2.3 试验条件

- a) 试验程序(如半静态或流水式试验,体积,每升负荷蚤数);
- b) 光照周期和光照强度;
- c) 试验设计(平行数,每一平行的蚤数);
- d) 所用培养基的详细说明;
- e) 附加有机物,包括成分、来源、制备方法、贮备液中的 TOC/COD、试验培养基 TOC/COD 测定值;
- f) 喂食的详细资料,数量和食物类型(包括藻名、品系、培养条件)等;

- g) 试验贮备液的配制方法和更新频率(若使用助溶剂,应给出其浓度)。

10.2.4 结果

- a) 关于受试物稳定性的任何试验结果;
- b) 配制试验浓度和确定试验容器中受试物浓度的所有分析结果,测定方法的回收率与检测限;
- c) 每个容器中受试物的实测浓度。添加回收试验的方法和仪器的最低检测限;
- d) 试验容器中的水质[pH 值、温度和溶解氧浓度、TOC 和(或)COD、硬度];
- e) 每只亲蚤所产幼蚤的完整记录;
- f) 亲蚤死亡数及其死亡时间;
- g) 对照组繁殖量的变异系数(以试验结束时每只亲蚤所产成活幼蚤总数为基础);
- h) 最低可观察效应浓度(LOEC),无可观察效应浓度(NOEC),若可能,也可记录亲蚤死亡的 LOEC 和(或)NOEC;
- i) EC_{50} 和置信区间,用于计算的模型曲线,浓度-效应曲线的斜率及其标准误差;
- j) 其他可观察或测定的生物学效应,并加以合理的解释;
- k) 对偏离的解释说明。

附录 A (规范性附录)

Elendt M4 和 M7 培养基的制备

A.1 对 Elendt M4 和 M7 培养基的适应

根据一些实验室的经验,很难将蚤直接转移到 M4 和 M7 培养基中。应通过逐步适应的过程:即将蚤从原培养基中取出,放入比例较低的 Elendt 培养基中,如 30% 的 Elendt 培养基中,然后增大 Elendt 培养基的比例到 60%,直至 100%。适应期大约需要一个月左右。

A.2 Elendt M4 和 M7 培养基的制备

用去离子水、蒸馏水或反向渗透水(以下均简称水)分别配制贮备液 I、贮备液 II 和混合维生素贮备液。制备 Elendt 培养基时,用贮备液 I (含有所有微量元素的混合液)制备贮备液 II,在使用前最后加入混合维生素贮备液,见表 A.1。

表 A.1 Elendt M7 和 M4 培养基贮备液 II 的制备

贮备液 I (单一物质)	加入到水中的量/ (mg/L)	浓度 (与 M4 培养基的关系)	为制备贮备液 II 将贮备液 I 加入到水中的量/(mL/L)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 倍	1.0	0.25
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7 210	20 000 倍	1.0	0.25
LiCl · H ₂ O	6 120	20 000 倍	1.0	0.25
RbCl	1 420	20 000 倍	1.0	0.25
SrCl ₂ · 6H ₂ O	3 040	20 000 倍	1.0	0.25
NaBr	320	20 000 倍	1.0	0.25
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1 260	20 000 倍	1.0	0.25
CuCl ₂ · 2H ₂ O	335	20 000 倍	1.0	0.25
ZnCl ₂	260	20 000 倍	1.0	1.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	200	20 000 倍	1.0	1.0
KI	65	20 000 倍	1.0	1.0
Na ₂ SeO ₃	43.8	20 000 倍	1.0	1.0
NH ₄ VO ₃	11.5	20 000 倍	1.0	1.0
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5 000	2 000 倍	—	—
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 991	2 000 倍	—	—
2 L Fe-EDTA 溶液		1 000 倍	20.0	5.0
注: Na ₂ EDTA 和 FeSO ₄ 两者单独制备,混在一起后立即灭菌。				

A.3 M4 和 M7 培养基

M4 和 M7 用贮备液Ⅱ、常量营养元素和维生素配制,具体见表 A.2。

表 A.2 M4 和 M7 培养基的配制

组分	加入到水中的量/ (mg/L)	浓度 (与 M4 培养基的关系)	加入到含有所有微量元素混合液中(贮备液Ⅱ的量)/(mL/L)	
			M4	M7
贮备液Ⅱ (微量元素混合液)		20 倍	50	50
常量营养贮备液 (单一物质)				
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000 倍	1.0	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000 倍	0.5	0.5
KCl	58 000	10 000 倍	0.1	0.1
NaHCO_3	64 800	1 000 倍	1.0	1.0
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000 倍	0.2	0.2
NaNO_3	2 740	10 000 倍	0.1	0.1
KH_2PO_4	1 430	10 000 倍	0.1	0.1
K_2HPO_4	1 840	10 000 倍	0.1	0.1
混合维生素贮备液	—	10 000 倍	0.1	0.1
混合维生素贮备液 ^a 是将 3 种维生素加到 1 L 水中制成的,如下所示:				
盐酸硫胺(维生素 B ₁)	750	10 000 倍		
氰钴胺(维生素 B ₁₂)	10	10 000 倍		
钙长石(维生素 H)	7.5	10 000 倍		
注:制备培养基时,为了避免盐沉淀,应将适量的贮备液加入到 500 mL~800 mL 水中,然后定容至 1 L。				
^a 混合维生素贮备液应以较小分装冷藏保存。				

附录 B

(资料性附录)

总有机碳(TOC)分析与喂食的藻中 TOC 含量的线性图绘制

总有机碳中的碳含量通常不能直接测定,但可根据相关性(即线性图),通过测定藻细胞数或光吸收等来确定碳含量。

测定 TOC,高温氧化法优于 UV 或荧光法。

绘制线性图,应采用离心法将藻从生长的培养基中分离,随后用蒸馏水重新悬浮。在每一浓度用三个平行测定替代参数和 TOC 浓度。应分析蒸馏水空白并应从藻样 TOC 浓度推出 TOC 浓度。

线性图的线性部分应超过碳含量范围要求。如图 B.1、图 B.2、图 B.3 的例子所示。

注:这几个图仅为示例,不能用于交流,各实验室必须绘制自己的线性图。

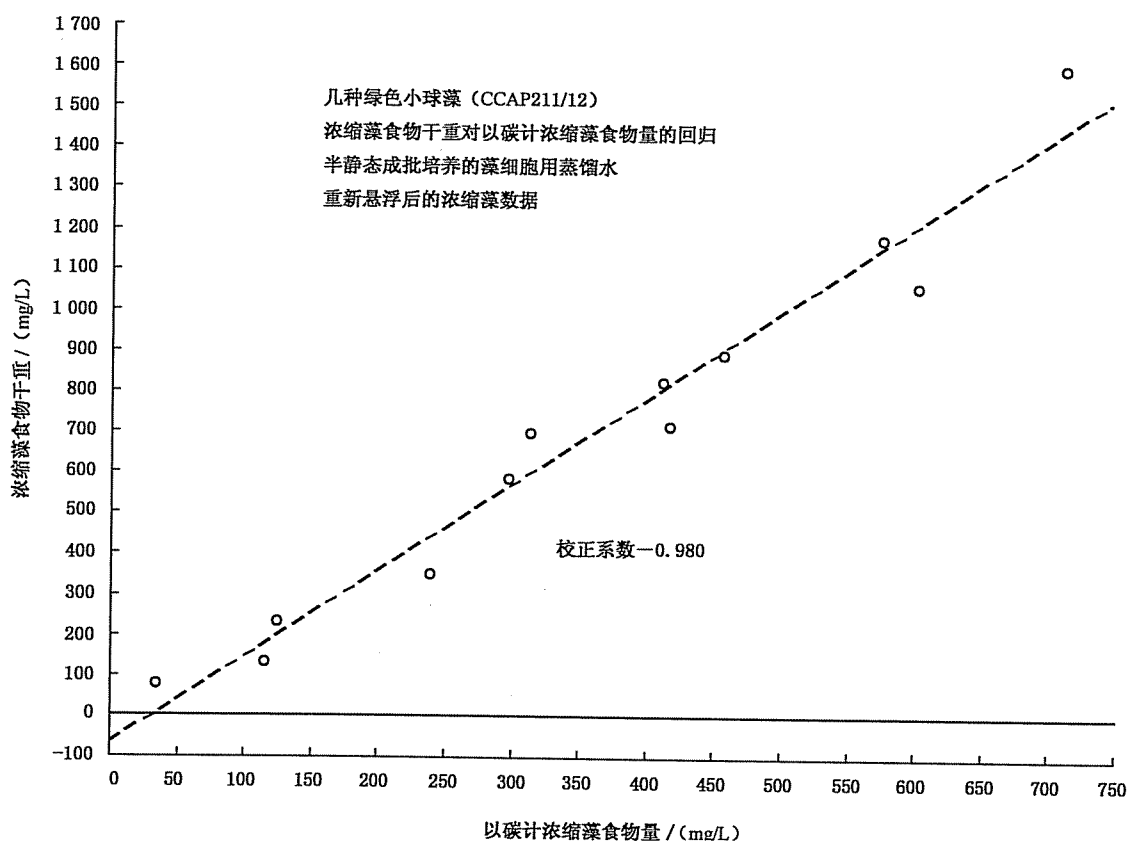


图 B.1 线性图示例

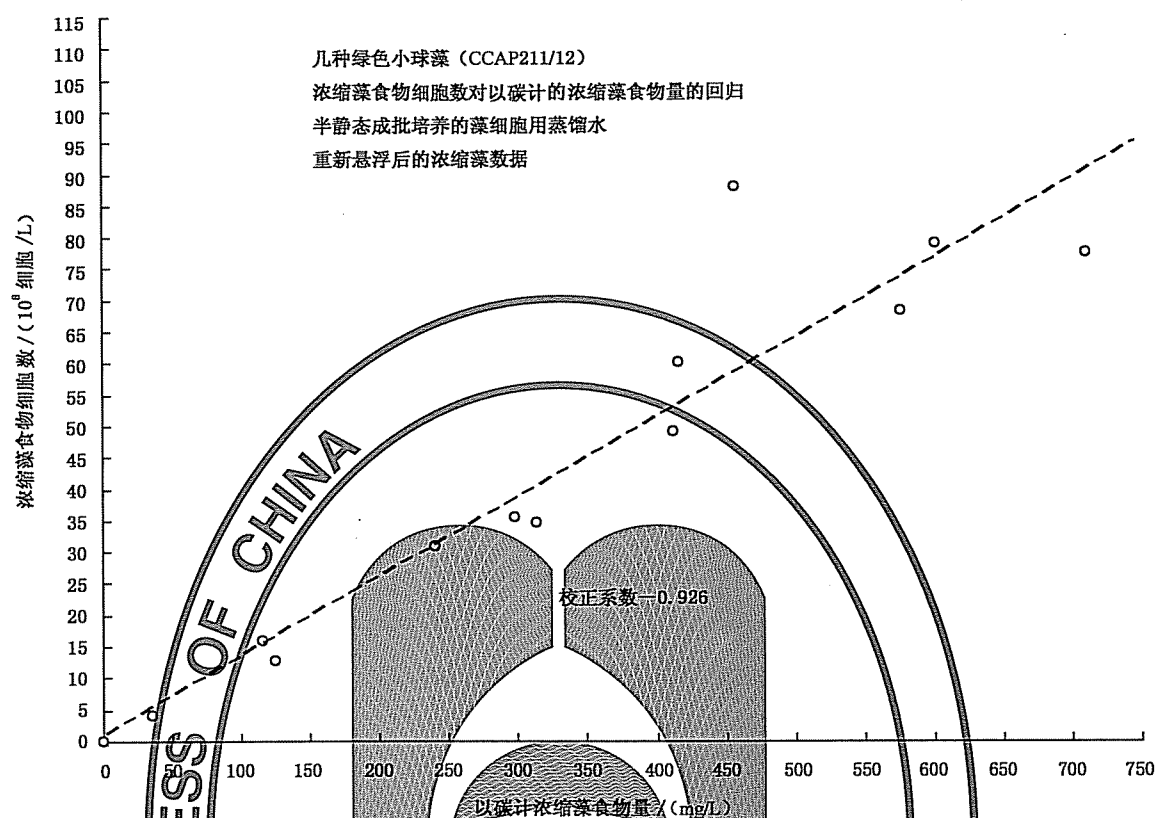


图 B.2 线性图示例

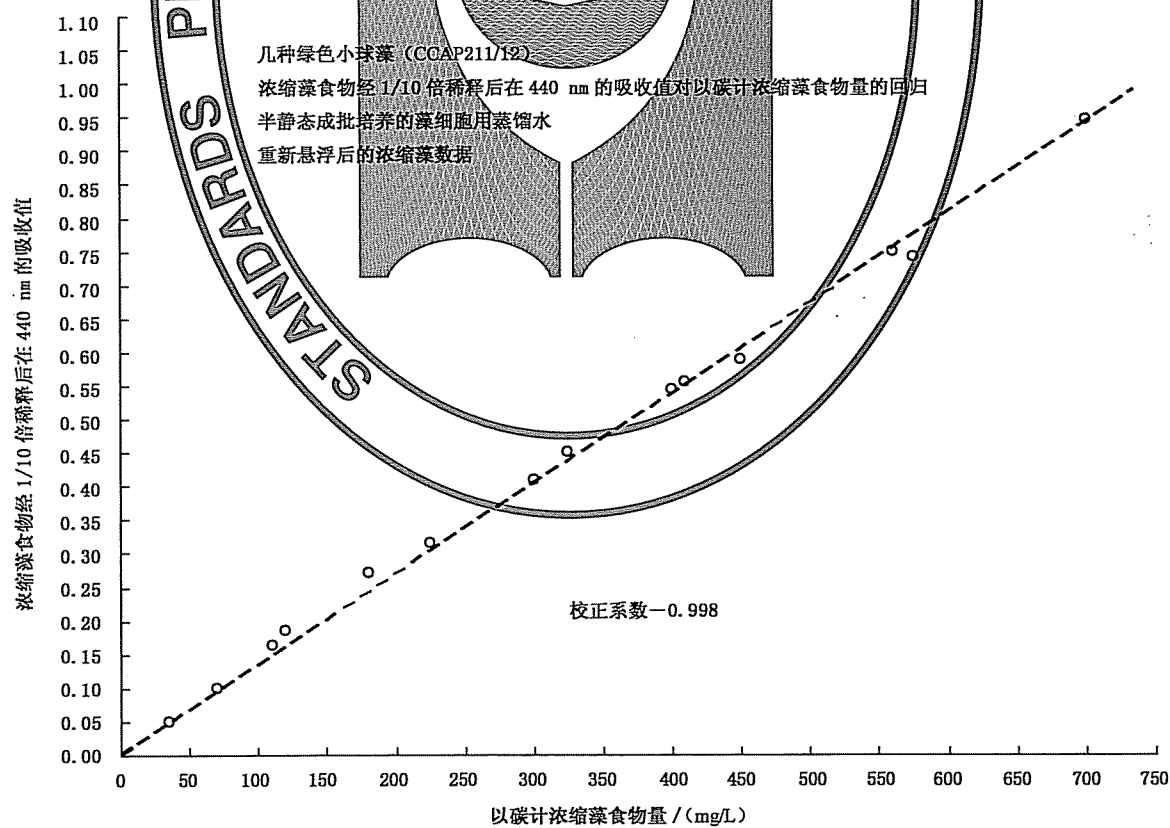


图 B.3 线性图示例

附录 C
(资料性附录)

培养基更换,物理-化学监测数据,大型蚤繁殖和亲蚤死亡率数据记录表

表 C.1 大型溞繁殖试验观察记录表

试验号：	开始日期：	品系：	培养基：	食物类型：	受试物：	配制浓度：																	
试验时间/d	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
培养基更新(√)																							
pH ^a																							新
																							旧
																							新
																							旧
O ₂ 浓度 ^a /(mg/L)																							新
																							旧
温度 ^a /℃																							
是否提供食物(√)																							
存活幼鱼数量 ^b																							
容器	1																						总数
	2																						
	3																						
	4																						
	5																						
	6																						
	7																						
	8																						
	9																						
	10																						
亲鱼累积死亡率 ^c																							总数

^a 应同时说明测试针对的是哪个容器的,即说明容器编号。

^b 在相应的表格以“AB”记录死胎。

^c 在相应的表格中以“M”记录亲鱼死亡率。

^a 应同时说明测试针对应的是哪个容器的,即说明容器编号。

^b 在相应的表格以“AB”记录死胎。^c 在相应的表格中以“M”记录亲渔死亡率。

附 录 D
(资料性附录)
化学分析结果记录数据表

D.1 化学分析结果记录数据表见表 D.1 和表 D.2。

表 D.1 化学分析测定浓度记录数据表

[illegible]

表 D.2 化学分析测定浓度记录数据表(以占配制浓度的百分率表示)

[illegible]

附 录 E
(资料性附录)
时间-加权平均值的计算

若受试物浓度在更换培养基期间是下降的,应从生物学和统计学的考虑为基础,选择某个浓度作为亲渔暴露浓度范围的代表。若繁殖多受峰值浓度影响,则应使用最高浓度,若认为受试物的累积和长期效应更为重要,则时间-加权平均浓度更合适。

时间-加权平均浓度的示例如图 E.1 所示。

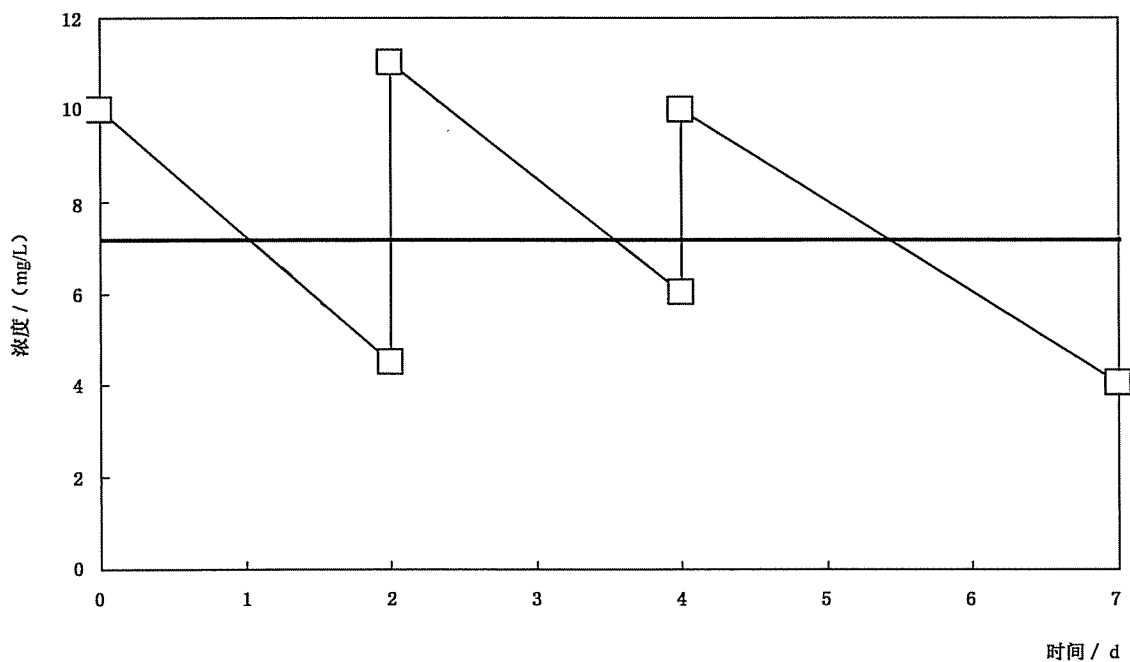


图 E.1 时间-加权平均值示例

图 E.1 是个简化了的试验的示例,试验持续 7 d,在第 0 天、第 2 天、第 4 天更新培养基。

——之字形线代表任意时间点的浓度,假定浓度是沿着某一指数衰减过程下降的。

——6 个菱形点代表在每一个更换周期开始与结束时测定的浓度。

——实线表示时间-加权平均值的位置。

因时间-加权平均值下的面积与浓度曲线下的面积相等,可经计算得出时间-加权平均值。上例的计算见表 E.1。

表 E.1 时间-加权平均值计算

更换编号	x	C_0	C_1	$\ln C_0$	$\ln(C_1)$	S
1	2	10.000	4.493	2.303	1.503	13.767
2	2	11.000	6.037	2.398	1.798	16.544
3	3	10.000	4.066	2.303	1.403	19.781
总天数:7					总面积:50.092	
					时间-加权平均值:7.156	

每一个更新周期指数曲线下的面积用式(E.1)进行计算。

$$S = \frac{C_0 - C_1}{\ln(C_0) - \ln(C_1)} \times d \quad \dots\dots\dots (E.1)$$

式中：

S ——每一更新周期指数曲线下的面积；

d ——更新周期内的天数；

C_0 ——每一更新期开始时测定的浓度；

C_1 ——每一更新期结束时测定的浓度；

$\ln(C_0)$ ——浓度 C_0 的自然对数；

$\ln(C_1)$ ——浓度 C_1 的自然对数。

时间-加权平均值(TW)是用总面积除以总天数。

对于蚤类繁殖试验,表格必须扩大到 21 d。

显然仅仅是在每次更新期的开始和结束时测定浓度,是不可能确定浓度衰减过程为指数型。不同的曲线计算出不同的面积。但指数衰减过程并非是不真实的,而且可能是在缺乏其他信息情况下的最佳曲线。

若在更新期结束时化学分析未发现任何物质,则需慎重。除非可能估测出物质从溶液中消失的速率,否则不可能获得曲线下可靠的面积,因此,也就不可能获得合理的时间-加权平均值。

参 考 文 献

- [1] OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U. K. ,20-21 March 1993.
- [2] OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris 1997.
- [3] Baird, D. J. ; Barber, I. ; Bradley, M. C. ; Soares, A. M. V. M. and Calow, P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Eco-tox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
- [4] Elendt, B. -P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- [5] EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed) , USEPA, Cincinnati, Ohio.
- [6] Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* , 47, 775-782.
- [7] ASTM. (1988) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 20 pp.
- [8] Baird, D. J. ; Soares, A. M. V. M. ; Girling, A; Barber, I; Bradley, M. C. and Calow, P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- [9] Parkhurst, B. R. , Forte, J. L. and Wright, G. P. (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* , 26: 1-8.
- [10] Cowgill, U. M. and Milazzo, D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.* , 120(2): 185-196.
- [11] Korshikov (1990) *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. *Biologice Prace*, 36, 209.
- [12] Sims, I. R. , Watson, S. and Holmes, D. (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.* , 12, 2053-2058.
- [13] Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.* , 128, 459-466.
- [14] Dunnett C. W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* , 50, 1096-1121.
- [15] Dunnett C. W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- [16] Williams D. A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- [17] Williams D. A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Bio-*

metrics, 28: 510-531.

[18] Draper, N. R. and Smith, H (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New-York.

[19] Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.
