

中华人民共和国国家标准

GB/T 21830—2008

化学品 溞类急性活动抑制试验

Chemicals—*Daphnia* sp., acute immobilisation test



081006000212

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

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. 202(2004 年)《溞类急性活动抑制试验》(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 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、广东出入境检验检疫局、广东省微生物研究所。

本标准主要起草人:菅小东、周红、赵圆、蔡磊明、赵玉艳、许崇辉、梅承芳。

化学品 溞类急性活动抑制试验

1 范围

本标准规定了化学品 溞类急性活动抑制试验的原理、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溞类急性活动的抑制作用。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

半数效应浓度(EC_{50}) **median effective concentration**

引起 50% 的受试溞活动抑制的受试物浓度。

2.2

活动抑制 **immobilisation**

轻晃试验容器, 15 s 内溞体不能游动, 视为活动受到抑制。

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) 正辛醇-水的分配系数(P_{ow});
- g) 在水溶液中的可靠的定量分析方法、回收率以及检测限;
- h) 快速生物降解性试验结果。

4 原理

幼溞(试验开始时溞龄小于 24 h)以一定的浓度范围暴露于受试物溶液中 48 h, 相对于空白对照组, 观察记录 24 h 和 48 h 受试物对溞类活动抑制情况。通过对结果分析计算 48 h 的 EC_{50} 。亦可选 24 h 的 EC_{50} 结果。

5 参比物

推荐使用重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$), 其 24 h EC_{50} 值范围为 0.6 mg/L~2.1 mg/L, 参见参考文献[1]、[5]。

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。试验容器通常为试管或烧杯, 每次使用前必须按照标准的实验室程序清洗干净; 试验容器应便于加盖, 以减少水分蒸发造成的损失, 并避免灰尘进入溶液。挥发性物质应在足够大的完全密闭的容器中进行, 以免溶解氧受限或过低。

6.2 需用下列部分或全部仪器设备：

- 溶解氧仪(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)；
- pH 计；
- 适当的温度控制设备；
- 总有机碳(TOC)测定仪；
- 化学需氧量(COD)测定仪；
- 测定水硬度的设备等。

7 试验准备

7.1 受试生物

7.1.1 受试生物的选择

首选大型溞(*Daphnia magna* Straus),也可以使用其他溞类,如蚤状溞(*Daphnia pulex*)。试验开始时试验用溞应是小于 24 h 的非头胎溞。试验用溞应来源于同一个保种培养的健康溞,即未表现任何受胁迫现象(如:死亡率高、出现雄溞和冬卵、头胎延迟、体色异常等)。

7.1.2 受试生物的驯养

保种培养的条件(光照、温度、培养液)应和试验条件一致,试验前最好设置驯养期,一般试验用溞应在试验条件下驯养至少 48 h。

7.2 试验条件

7.2.1 试验用水

- a) 只要能够使溞类在培养、驯化及试验期间存活,天然水(地表/地下水)、重组水或去氯自来水及其他水均可(应符合附录 A 规定)。试验期间水质应保持稳定,重组水组成应为将已知特定含量的分析纯的试剂添加到去离子水或蒸馏水中,重组水如附录 B 所示,相关的参考文献见 [1]、[6]。注意:培养液中应含有已知的螯合剂,如附录 B 中的 M4 和 M7 培养液应避免用于含有金属的受试物的测试。对于大型溞(*Daphnia magna* Straus)来说,水质条件为:pH 值为 6~9,硬度(以 CaCO_3 计)为 140 mg/L~250 mg/L,如果用于其他溞类,也可以适当降低硬度。稀释水在使用前应充分曝气使溶解氧浓度达到饱和。
- b) 如果采用天然水,应至少每年两次(或怀疑水质可能发生明显变化时)取样测定水质,并测定重金属(如 Cu、Pb、Zn、Hg、Cd、Ni 等)含量,如果采用去氯自来水,应每天分析残留氯的含量;如果采用地表/地下水,应测定电导率并分析水中的总有机碳(TOC)或化学需氧量(COD)。

7.2.2 试验液

- a) 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。应尽量避免使用助溶剂、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。有关助溶剂、乳化剂或分散剂的准则见参考文献[4]。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。
- b) 通常不能调节试验液的 pH 值。如果溶液的 pH 不在 6~9 范围内,调节贮备液的 pH 值同时进行第二套试验。调节 pH 值可以使用 HCl 或 NaOH,但必须保证贮备液的性质、浓度不发生改变,即不发生化学反应或沉淀作用。

8 试验程序

8.1 暴露条件

8.1.1 试验组和对照组

- a) 试验容器中盛有适当体积的试验用水和受试物溶液。对照组和试验组的容器中的空气与溶液的体积比应相同,然后放入溞。每个试验浓度组和对照组至少 20 只溞,分成 4 组,每组 5 只

蚤。负荷量为每只蚤不小于 2 mL。当受试物浓度不稳定时可采用半静态或流水式系统进行试验。

- b) 除受试物组外,还应至少设置一组空白对照组,如果使用溶剂还应包括溶剂对照组,溶剂对照组中的溶剂浓度应与受试物组中的溶剂浓度一致。

8.1.2 试验浓度

- a) 正式试验前应先进行预试验以确定浓度范围,除非受试物已有可用的毒性资料。因此先将蚤类暴露于较大范围浓度系列的受试物溶液中 48 h,每个浓度 5 只蚤,不设平行。若在短时间内即能够确定可用的浓度范围,预试验的暴露期也可缩短(24 h 或更短)。
- b) 根据预试验的结果进行正式试验,在包括使蚤全部产生活动抑制的最低浓度和未产生活动抑制的最高浓度之间(即 $EC_{0.1} \sim EC_{100}$)以几何级数设置浓度系列。至少设 5 个浓度,公比不大于 2.2。如果试验浓度少于 5 个,应在试验报告中给予合理解释。

8.1.3 培养条件

温度 $18^{\circ}\text{C} \sim 22^{\circ}\text{C}$,同一试验中,温度变化小于或等于 1°C ;光照周期(光暗比)为 16 h:8 h,若受试物易光解,亦可在完全黑暗的条件下进行测试。

试验期间试验容器中不能充气,不能调节 pH 值,不能喂食受试蚤类。

8.1.4 试验周期

试验周期为 48 h。

8.2 观察

试验后 24 h 和 48 h 分别观察每个试验容器中试验蚤类的受抑制情况。除了活动受抑制外,其他任何异常症状或表现均应记录。

8.3 分析测量

8.3.1 试验开始和结束时,应测定对照组和最高浓度组试验液的溶解氧浓度和 pH 值。对照组溶解氧浓度应符合标准的规定。在同一测试中,试验期间 pH 值通常不能超过 1.5 个单位。测定对照组容器中的温度或环境空气温度,至少在试验开始和结束时分别测定温度,最好连续记录温度。

8.3.2 应测定试验液中受试物的浓度,至少在试验开始和结束时分别测定最高浓度组和最低浓度组试验液中受试物的浓度。建议用测定浓度计算试验结果。如果能够提供有力证据证明试验期间受试物的浓度能维持在配制浓度(或初始测定浓度) $\pm 20\%$ 的范围内,可以用配制浓度或初始测定浓度来计算。

8.4 限度试验

限度试验的浓度为 100 mg/L 或受试物在试验溶液中的最大溶解度(二者中选浓度低者),以表明 EC_{50} 大于其限度浓度。限度试验需用 20 只蚤(最好分成 4 组,每组 5 只),对照组相同。如果试验结束时,抑制率超过 10%,还应进行完整的试验。并记录受试蚤类的任何异常反应和行为。

9 质量保证与质量控制

9.1.1 对照组(包括空白对照组和溶剂对照组)蚤类的受抑制率不能超过 10%;其受抑制情况包括:活动受抑制、有疾病症状或受损伤,例如变色、行为异常(如飘浮于液面)等。

9.1.2 试验结束时对照组和试验组的溶解氧浓度应不小于 3 mg/L 。

10 数据与报告

10.1 数据

10.1.1 以表格形式列出 24 h 和 48 h 对照组和各试验组试验蚤数、活动受抑制蚤数及百分率。以 24 h 和 48 h 抑制百分率与受试物浓度作剂量-效应曲线,选择合适的统计方法(如概率单位法)计算 24 h EC_{50} (可选)和 48 h EC_{50} 及其 95% 的置信区间^{[7],[8]}。

10.1.2 当获得的数据使用标准的方法无法统计时,无抑制作用的最高浓度和引起 100% 抑制的最低

浓度可用于推导 EC_{50} (可以认为其为两者浓度的几何平均值)。

10.2 试验报告

试验报告应包括以下内容：

10.2.1 受试物

- a) 物理属性和相关理化性质；
- b) 化学标识鉴别数据,包括纯度。

10.2.2 受试生物

溞类的来源和种类,提供者(若已知),培养条件(包括食物的种类、来源、喂食量以及喂食频率)。

10.2.3 试验条件

- a) 试验容器:试验容器的类型和容积,试验液的体积,每个容器中溞类的数量,每个浓度的平行数；
- b) 贮备液和试验液制备的方法,包括助溶剂、分散剂和乳化剂的使用及其浓度；
- c) 试验用水:来源和水质特征(包括 pH 值、硬度、Ca/Mg、Na/K、碱度和电导率等)。若使用重组水,应提供其组成和制备方法；
- d) 培养条件:温度、光照强度和光照周期、溶解氧、pH 值等。

10.2.4 结果

- a) 各观察时间点内对照组和试验组中溞类活动受抑制或行为异常的数量和百分数；
- b) 参比物的试验结果；
- c) 每个容器中受试物的配制浓度和所有分析测定受试物浓度的结果,分析方法的回收率和检测限；
- d) 试验期间水质测定结果,包括温度、pH 值和溶解氧；
- e) 24 h EC_{50} (可选)和 48 h EC_{50} 及其 95% 置信区间,以及剂量-效应曲线及其标准误差。用于计算 EC_{50} 的统计程序；
- f) 如果出现偏离,需说明偏离及对试验结果的影响。

附 录 A
(规范性附录)
合格试验用水的部分化学特性

A.1 合格试验用水的部分化学特性见表 A.1。

表 A.1 合格试验用水的部分化学特性

物 质	浓 度
颗粒物	<20 mg/L
总有机碳(TOC)	<2 mg/L
游离氨	<1 μg/L
残留氯	<10 μg/L
总有机磷农药	<50 ng/L
总有机氯农药与多氯联苯(PCB)	<50 ng/L
总有机氯	<25 ng/L

附录 B
(资料性附录)
推荐的重组水和培养液

B.1 重组水

适宜的重组水示例见表 B.1。

表 B.1 ISO 试验用水(见参考文献[1])

贮备液(单一物质)		每升水 ^a 贮备液的加入量/mL
物质	每升水 ^a 的加入量/g	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	11.76	25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.93	25
NaHCO ₃	2.59	25
KCl	0.23	25
^a 水为纯水,如去离子水、蒸馏水或反向渗透水,其电导率不能超过 10 μS/cm。		

B.2 培养液**B.2.1 对 Elendt M4 和 M7 培养基的适应**

根据一些实验室的经验,很难将溞直接转移到 M4 和 M7 培养基中。应通过逐步适应的过程:即将溞从原培养基中取出,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。

B.2.2 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 B.2。

表 B.2 Elendt M4 和 M7 培养基的制备

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

表 B.2 (续)

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
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	—	—
2L 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。				

B.2.3 M4 和 M7 培养基

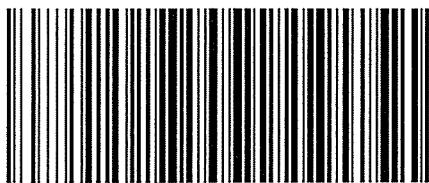
M4 和 M7 用贮备液 II、常量营养元素和维生素配制。具体见表 B.3。

表 B.3 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 I)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)				
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1 000 倍	1.0	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ 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
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	5 000 倍	0.2	0.2
NaNO ₃	2 740	10 000 倍	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 倍	0.1	0.1
K ₂ HPO 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
注 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 2: 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。				

参 考 文 献

- [1] ISO 6341. (1996). Water quality—Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)—Acute toxicity test. Third edition, 1996.
- [2] EPA OPPTS 850. 1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines—Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.
- [3] Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- [4] Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
- [5] Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.
- [6] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.
- [7] Stephan C. E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). ASTM STP 634—American Society for Testing and Materials. 65-84.
- [8] Finney D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.
-



GB/T 21830-2008

版权专有 侵权必究

*

书号: 155066 · 1-32606

定价: 14.00 元