



中华人民共和国国家标准

GB/T 21806—2008

化学品 鱼类幼体生长试验

Chemicals—Fish, juvenile growth test

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 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. 215(2000 年)《鱼类幼体生长试验》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改：

——推荐鱼种增加了稀有𬶋卿(*Gobiocypris rarus*)和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)，并增加了相应的试验条件；

——将术语和定义从原文的附录调整为正文内容。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 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：上海市环境科学研究院、环境保护部南京环境科学研究所、沈阳化工研究院安全评价中心。

本标准主要起草人：卢玲、沈英娃、周红、梁丹涛、胡双庆、韩志华、陈光。

化学品 鱼类幼体生长试验

1 范围

本标准规定了化学品 鱼类幼体生长试验的方法概述、试验准备、试验程序、质量保证与质量控制、数据与报告。

本标准适用于评价化学物质对幼鱼生长的延长暴露影响。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

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

与对照相比,对试验生物产生显著($p<0.05$)效应的最低受试物浓度。

2.2

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。

2.3

效应浓度 **EC_x**

与对照组相比较,引起受试鱼生长率变化 $x\%$ 的受试物浓度。

2.4

负荷率 **loading rate**

每升水中鱼的鲜重。

2.5

饲养密度 **loading rate**

每升水中的鱼的数目。

2.6

单尾鱼比生长率 **individual fish specific growth rate**

根据单尾鱼的初始重量得出的生长率。

2.7

容器平均比生长率 **tank-average specific growth rate**

某浓度下某个容器中鱼的平均生长率。

2.8

假定比生长率 **pseudo specific growth rate**

与整个容器中鱼的初始平均重量相比较而得出的单尾鱼平均生长率。

3 受试物信息

- a) 结构式;
- b) 纯度;
- c) 水中溶解度;
- d) 蒸气压;
- e) 水解离常数(pKa);

- f) 正辛醇-水的分配系数(P_{ow})；
- g) 在水中和光中的稳定性；
- h) 在试验条件下的稳定性；
- i) 同一受试鱼种的 LC_{50} 值；
- j) 快速生物降解性试验结果；
- k) 在试验液中受试生物的可靠定量分析方法及其精确度、检测限。

4 方法概述

4.1 原理

处于指数生长阶段的幼鱼，在受试物的亚致死浓度范围内暴露于流水式试验条件或半静态试验条件。试验周期为 28 d。每天投饵，投饵量根据鱼的初始重量计算，14 d 后重新计算投饵量。试验前后称重鱼。通过回归模型来估算引起百分之 x 生长率变化的浓度，并分析对其生长率的影响。通过与对照组的比较确定最低可观察效应浓度(LOEC)，以及无可观察效应浓度(NOEC)。

4.2 参比物

无推荐的参比物。

5 仪器设备

实验室常规仪器设备；
溶解氧和 pH 测定仪；
测定水硬度、碱度的设备；
温度控制及连续测温设备；
适宜的精密天平(至少精确到±0.5%)；
用化学惰性材料制成的试验容器，其容积应适于推荐的负荷和饲养密度(见附录 A)。

6 试验准备

6.1 系统选择

试验期间，应尽可能维持条件恒定，使用流水式试验系统或半静态试验系统。

6.2 试验鱼类

6.2.1 试验鱼类的选择

推荐使用的淡水鱼种为稀有𬶋𬶋(*Gobiocypris rarus*)、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)，见附录 A。

如果使用其他鱼种，试验过程需调整相应的试验条件，并在报告中说明试验鱼种和试验方法选择的理由。

6.2.2 试验鱼的驯养

试验鱼应来自单一种群，并来自同一批卵或幼鱼。试验前应在与试验相同的条件下驯养 14 d 以上。驯养及试验期间，每天投饵量应为体重的 2%~4%。

驯养开始 48 h 后，记录死亡率，并按下列标准处理：

- 驯养 7 d 内，死亡率大于 10%，舍弃全组鱼；
- 死亡率在 5%~10% 之间，继续驯养 7 d；在继续驯养的 7 d 内死亡率超过 5%，舍弃全组鱼；
- 驯养 7 d 内，死亡率小于 5%，接受该组鱼试验。

试验开始前的两周内及试验期间不对鱼进行任何疾病处理。

6.3 试验用水

6.3.1 水质

试验用水的 pH 值应为 6.5~8.5, 在试验期间变化幅度应保持在±0.5 的范围之内。推荐硬度(CaCO_3)大于 140 mg/L。定期取样进行分析, 分析测定重金属(如 Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), 主要的阴、阳离子(如 Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), 农药(如总有机磷和总有机氯农药), 总有机碳和悬浮物。合格稀释水的要求参见附录 B。试验期间水质应恒定。

6.3.2 试验溶液

通过稀释贮备液的方法来配制所确定浓度的试液。贮备液的配制推荐采用机械方式(例如搅拌或超声)使受试物在稀释水中进行简单的混合或搅动。需要使用助溶剂或分散剂时, 助溶剂对照组不能对幼鱼生长有明显影响, 也不能对幼鱼有任何可观察的不利影响。推荐的助溶剂:丙酮、乙醇、甲醇、二甲基亚砜、二甲基替甲酰胺、三甘醇。推荐的分散剂:聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、吐温 80、0.01% 的纤维素甲醚、聚氧乙烯化氢化蓖麻油。

流水式试验应具备连续分配和稀释受试物贮备液的系统。每天定时检查贮备液和稀释水的流速, 变化应小于或等于 10%。

半静态试验中, 试液的更新频率取决于受试物的稳定性。浓度不稳定的受试物, 采用流水式试验。

7 试验程序

7.1 设计

7.1.1 回归分析设计

试验设计原则:

- 试验设计的浓度应包含效应浓度。应设计预备试验;
- 试验包括 1 个空白对照组及 5 个浓度梯度试验组。试验中使用助溶剂时, 需增设助溶剂对照组;
- 采用几何级数系列或对数系列(见附录 C)设置试验浓度, 推荐对数间隔;
- 试验容器超过 6 个时, 超出的部分容器可设置为平行, 或用于增加梯度浓度;
- 回归分析优于方差分析。没有合适的回归模型($r^2 < 0.9$)时, 使用 NOEC 或 LOEC。

7.1.2 方差分析估计 NOEC/LOEC 值的设计

每个浓度设置平行, 对试验组进行统计分析。没有平行组时, 对处于相同条件下的各试验鱼进行统计分析。

设置 5 个浓度组, 以几何级数分布, 浓度间隔系数小于或等于 3.2。

平行对照组的容器数量及试验鱼的数量应为每个试验浓度组数量的两倍。不设置平行时, 对照组鱼的数量应与每个试验浓度组数量相同。

根据容器数量进行方差分析(ANOVA), 需要足够的平行组, 标准差自由度应大于或等于 5。

7.2 准备条件

7.2.1 试验鱼的选择和称量

试验前取样称量, 保持试验鱼的重量差异小。推荐试验用鱼的大小范围见附录 A。试验用鱼的个体重量应在平均体重的±10%内, 任何情况下都不得超过 25%。试验前取部分鱼样品称量以测定平均体重。

试验前 24 h 停止喂食, 随机挑选试验鱼。常规麻醉剂麻醉, 逐尾称鲜重至相应精度(附录 A)。合适重量的鱼随机分配到每个试验容器。记录容器中鱼的总鲜重。对幼鱼的处理应尽量小心以避免对试验动物的胁迫与损伤。

试验 28 d 后对鱼再次称重。需要重新计算饵料投喂量时,在试验 14 d 进行称重。

7.2.2 暴露条件

试验持续时间:大于或等于 28 d。

负荷率与饲养密度应与试验所使用的鱼种(见附录 A)相适应。在任何情况下,负荷率应保持溶解氧浓度不小于 60% 空气饱和值。试验期间推荐的水质更新频率为 6 L/(g·d)。

投喂适量饵料(见附录 A)。称重前 24 h 内不投喂。每天喂食的量可分为同等的两份,并分次投喂。每天用吸管清除容器底部的饵料残渣和排泄物。

光照周期与水温应适合试验鱼种(见附录 A)。

7.2.3 试验浓度

设置 5 个受试物浓度。试验浓度低于 5 个应说明理由。设置的最高浓度不得超过受试物的水中溶解度。

若使用助溶剂,其最终浓度应小于或等于 0.1 mL/L。尽量避免使用该类物质。

稀释水对照组的数量依据试验设计而定。使用助溶剂时,助溶剂对照组的数量应与稀释水对照组相同。

7.3 试验操作

7.3.1 分析测试

试验期间定期测试受试物浓度。

流水式试验时,每天检测稀释水与受试物贮备液的流速,流速变动小于或等于 10%。受试物浓度在配制浓度的±20%内,在试验开始时及其后每周 1 次,测定最高及最低浓度组的浓度。受试物浓度超出配制浓度的±20%,应分析所有试验浓度组的水样,分析测试频率同上。

半静态试验时,受试物浓度在设定值的±20%内,在试验开始时及其后每周 1 次,分析测定新配制的试液和原试液,样品取自最高及最低浓度组。试验期间受试物浓度超出配制浓度的±20%,应分析测定所有试验浓度,测试频率同上。

试验结果应以测定浓度为准。试验期间受试物浓度保持在配制浓度的±20%内,结果可采用配制浓度。

用 0.45 μm 孔径的滤膜对水样进行过滤或离心,推荐离心。

试验期间应测定所有试验容器中的溶解氧、pH 值和水温。测定对照组和 1 个最高浓度组中的总硬度、碱度、盐度。半静态试验,每次试液更新前后应测试溶解氧和 pH 值。流水式试验至少每周测试 1 次 pH 值。每个试验应测定硬度和碱度。在 1 个试验容器中连续监测水温。

7.3.2 观察

试验结束时,对所有存活的鱼按试验容器称总鲜重或逐尾称鲜重。推荐称量总重。

试验期间每天观察记录所有外部异常现象和反常行为。记录所有死亡率,尽快移除死鱼。不替换死鱼,负荷率和饲养密度应符合试验鱼的需求,以避免因试验容器中鱼数变化对试验鱼的生长造成影响,投喂量需相应调整。

8 质量保证与质量控制

- a) 试验结束时对照组鱼的死亡率小于或等于 10%;
- b) 对照组鱼的平均重量的增长,应大于或等于 50% 初始平均重量;
- c) 试验期间溶解氧浓度大于或等于 60% 空气饱和值;
- d) 试验期间各试验容器间的水温差小于或等于 ±1°C,并应保持在受试生物适宜温度的±2°C 范围内(见附录 A)。

9 数据与报告

9.1 数据处理

9.1.1 统计参数

对死亡率超过 10% 的容器不计算生长率。说明所有试验浓度的死亡率。

介于时间 t_1 和 t_2 间的比生长率 r 的计算方法见式(1)、式(2)和式(3):

式中：

r_1 —单尾鱼的比生长率,单位为每天(d^{-1});

r_2 ——每个容器的鱼的平均比生长率,单位为每天(d^{-1});

r_3 ——假定比生长率,单位为每天(d^{-1});

W_1, W_2 ——某尾鱼分别在时间 t_1 与 t_2 时的重量, 单位为克(g);

$\log_e W_1$ ——试验开始期间单尾鱼的体重对数;

$\log_e W_2$ ——试验结束期间单尾鱼的体重对数;

$\log_e W_1$ ——试验开始期间容器中鱼重 W_1 的对数平均值;

$\log_e W_2$ ——试验结束期间容器中鱼重 W_2 的对数平均值;

t_1 , t_2 ——试验开始与试验结束的间隔时间,单位为天(d)。

r_1 , r_2 , r_3 根据 0 d~28 d 计算,理想的结果按 0 d~14 d 和 14 d~28 d 计算(例如在试验进行 14 d 时测量)。

9.1.2 统计分析方法

9.1.2.1 结果的回归分析(浓度-反应模型)

符合比生长率与浓度之间的数学关系,用于估算 EC_x 。根据 r 的容器平均值(r_2)进行分析,适用于个体较小鱼种。

绘制容器平均比生长率(r_2)与浓度的关系图。

选择恰当的模型，有适当的理论支持。

当容器中存活的鱼数量不等,建立模型时应称重。

拟合模型图应显示与数据的关系。

9.1.2.2 LOEC 的估计结果分析

试验中每个浓度组都有平行, LOEC 根据容器平均比生长率的方差分析(ANOVA)估算。存在显著性差异(以 $p=0.05$ 为界限)时,采用邓恩特(Dunnett)或威廉(William)检验,将每个浓度组的 r 平均值与对照组的 r 平均值比较,确定最低浓度。当参数法不能满足正态分布(例如萨皮罗-威尔克 Shapiro-Wilk 检验)或非齐次性差异(巴特利特 Bartlett 检验)时,在方差分析前将数据转换为齐次性差异,或进行加权方差分析。

试验中每个浓度没有平行,根据由单尾鱼得出的假定比生长率 r_3 来进行方差分析。

将每个试验浓度组的平均值 r_3 与对照组的平均值 r_1 进行比较, 确定 LOEC。

9.2 试验报告

试验报告应包括：试验名称、目的、试验原理、试验的准确起止日期以及下列内容：

- a) 受试物
 - 物理属性和相关理化特性；
 - 化学标识数据,包括受试物纯度、所用的定量分析方法等。
- b) 供试鱼种
 - 学名、品系、个体大小、来源以及所有的前处理等。
- c) 试验条件
 - 试验程序；
 - 试验设计；
 - 贮备液的配制方法与试液更新频率;如使用助溶剂,应给出其化学名和浓度；
 - 试验的设置浓度、实测浓度及其标准差,以及分析测量方法等；
 - 稀释水特性:pH值、硬度、碱度、温度、溶解氧浓度、残留氯水平(如测定),总有机碳、悬浮物、盐度(如测定)以及其他所做的测定；
 - 试验容器中水质,pH、硬度,温度和溶解氧浓度；
 - 饵料的详细信息。
- d) 试验结果
 - 对照组总存活率,是否符合该鱼种的有关标准,符合有效存活标准的证据,以及所有试验浓度组中的死亡率数据；
 - 所用的统计分析技术,依据平行或鱼进行统计,数据处理与所用技术的理由；
 - 列表数据包括:在0 d、14 d以及28 d时的个体重或平均鱼重,或者0 d~28 d期间或0 d~14 d 和 14 d~28 d 期间的容器平均鱼重或假定的比生长率。
 - 统计分析结果,以表格和图形表示,包括标准差,以及LOEC($p=0.05$)和NOEC或EC_x。
 - 所有鱼的异常反应发生率,以及由受试物引起的各种可观察效应。
- e) 结果讨论
 - 结果讨论,对偏离测试准则之处加以说明。如果试验溶液中的受试物实测浓度在数量级上接近分析方法的检测限,或半静态试验中,新配制的试液与更新前的试液之间出现受试物浓度下降时,应慎重解释结果。

附录 A
(资料性附录)
试验鱼种及适宜的试验条件

A.1 试验鱼种及适宜的试验条件见表 A.1。

表 A.1 试验鱼种及适宜的试验条件

鱼种	推荐的试验温度范围/℃	光周期/h	推荐的初始鱼重范围/g	测量精度	负荷率/(g/L)	饲养密度/(尾/L)	饵料	试验周期/d
斑马鱼 <i>Brachydanio rerio</i>	21~25	12~16	0.050~0.100	1 mg	0.2~1.0	5~10	活饵料 (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥28
稀有𬶋鲫 <i>Gobiocyparis rarus</i>	21~25	12~16	0.050~0.100	1 mg	0.2~1.0	5~10	活饵料 (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥28
剑尾鱼 <i>Xiphophorus helleri</i>	21~25	12~16	0.5~2.5	50 mg	1.2~2.0	4	活饵料 (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥28
虹鱥鱼 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	12.5~16.0	12~16	1~5	100 mg 左右	1.2~2.0	4	干的鲑鱼 鱼苗食品	≥28
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	21~25	12~16	0.050~0.100	1 mg 左右	0.2~1.0	5~20	活饵料 (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥28

附录 B
(资料性附录)
合格稀释水的化学特性

B.1 合格稀释水的化学特性见表 B.1。

表 B.1 合格稀释水的化学特性

物 质	浓 度
颗粒物	<20 mg/L
总有机碳	<2 mg/L
游离氯	<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 C
(资料性附录)
毒性试验的浓度对数系列

C.1 毒性试验的浓度对数系列见表 C.1。

表 C.1 毒性试验的浓度对数系列^[1]

栏(在 100 和 10 之间,或在 10 和 1 之间的浓度数目)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	25	32	37	42
1.0	4.6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	6.3	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

^a 5 个(或更多)连续系列浓度可从一个栏中选择。栏(x)的中点浓度亦存在于栏($2x+1$)中。表中所列数值以(mg/L 或 $\mu\text{g}/\text{L}$)表示,亦可将数值乘以或除以 10。如果不能确定毒性水平,可考虑使用栏 1 的数值。

C.2 参考文献

- [1] Environment Canada. (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or Atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

参 考 文 献

- [1] Solbe J. F de L G. Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Rest of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2, 1987.
- [2] Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M, 1990.
- [3] Crossland N. O. A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 1985, 14: 1855-1870.
- [4] Nagel R., Bresch H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N., and Höfte B. B. Effect of 3,4-dichloraniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 1991, 21: 157-164.
- [5] Yamamoto, Tokio. Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokyo, Japan, 1975.
- [6] Holcombe, G. W., Benoit, D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol., 1995, 28: 287-297.
- [7] Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota, 1991.
- [8] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 1993.
- [9] Stephan C. E. and Rogers J. W. Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1985: 328-338.
- [10] Environment Canada. Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p. 215 OECD/OCDE, 1992.
- [11] Cox D. R. Planning of experiments. Wiley Edt, 1958.
- [12] Pack S. Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, December 1991: 10-12.
- [13] Dunnett C. W. A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 1955, 50: 1096-1121.
- [14] Dunnett C. W. New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 1964, 20: 482-491.
- [15] Williams D. A. A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 1971, 27: 103-117.
- [16] Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville, N. T. A technique using sequential feedings of different coloured foods to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture, 1994, 120: 123-133.

- [17] Quinton, J. C. and Blake, R. W. The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 1990, 37:33-41.
- [18] Post, G. Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Testbook of Fish Health*. T. F. H. Publications, Inc., Neptune City, New Jersey, USA., 1987;288.
- [19] Bruce, R. D. and Versteeg D. J. A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 1992, 11:1485-1494.
- [20] DeGraeve, G. M. , Cooney, J. M. , Pollock, T. L. , Reichenbach, J. H. , Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test: intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA,1989.
- [21] Norbert-King T. J. An interpolation estimate for chronic toxicity: the IC_p approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab. , Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988;12.
- [22] Williams D. A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 1972, 28: 510-531.
-

中华人民共和国
国家标准
化学品 鱼类幼体生长试验
GB/T 21806—2008

*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号

邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 21 千字
2008 年 7 月第一版 2008 年 7 月第一次印刷

*
书号: 155066 · 1-32205

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权所有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 21806—2008