

附件 9

《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法（征求意见稿）》
编制说明

《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》

标准编制组

二〇一八年十月

项目名称：水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

项目统一编号：2015-9

承担单位：常州市环境监测中心

编制组主要成员：薛银刚、滕加泉、徐东炯、王 倩、余若祯、陈 桥、
施昕澜、汤佳峰、宗玉婷、潘 晨

环境标准研究所技术管理负责人：魏玉霞、陈艳卿

环境监测司项目负责人：李 江

目 录

1 项目背景.....	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 工作过程.....	1
2 标准制订的必要性分析.....	2
2.1 被测对象的环境危害.....	3
2.2 相关环保标准和环保工作的需要.....	3
3 国内外相关标准研究.....	5
3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	5
3.2 国内相关分析方法研究.....	7
3.3 与国内外相关标准的关系.....	8
4 标准制订的基本原则和技术路线.....	10
4.1 标准制订的基本原则.....	10
4.2 标准制订的技术路线.....	11
5 方法研究报告.....	13
5.1 方法研究的目标.....	13
5.2 术语和定义.....	13
5.3 方法原理.....	15
5.4 干扰和消除.....	16
5.5 试剂和材料.....	16
5.6 仪器和设备.....	23
5.8 分析步骤.....	29
5.9 结果计算与表示.....	34
5.10 质量保证和质量控制.....	35
5.11 实验室内验证.....	39
6 方法验证.....	41
6.1 方法验证方案.....	41
6.2 方法验证过程.....	42
7 与开题报告的差别说明.....	45
8 标准实施建议.....	45
9 参考文献.....	46
附 方法验证报告.....	48

《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2015年3月原环境保护部下发了《关于开展2015年度国家环境保护标准项目实施工作的通知》（环办函〔2015〕329号），其中明确下达了《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》的项目计划，项目统一编号为2015-9。

本标准制订的承担单位为常州市环境监测中心（江苏省环境保护水环境生物监测重点实验室），参加单位为中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组

2015年4月，接到本标准编制任务后，常州市环境监测中心成立标准方法编制组（以下简称“编制组”），成员以多年从事生物监测及环境科研工作的高级工程师和工程师为主。

1.2.2 查询国内外相关标准和文献资料

2015年4月~12月，编制组调研了国内外相关试验方法的研究进展，查阅了ISO国际标准及其他国内外有关标准（包括OECD、ASTM等以及国内相关标准）和文献中关于此类试验情况。按照该标准下达任务要求，本标准的技术内容主要参考《水质 废水对斑马鱼卵急性毒性的测定》（ISO 15088-2007），即“Water quality-Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)”，同时参考了OECD 236测试指南“Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test”，将以上资料进行翻译。

1.2.3 开题论证，确定标准制订的技术路线

2016年1月，环境保护部科技标准司在北京组织召开本标准开题论证会，与会专家通过质询、讨论，认为标准承担单位提供的材料齐全、内容详实完整；对国内外相关标准及文献进行了充分调研；标准定位基本准确，主要内容及编制标准的技术路线较为合理、可行。同时提出具体修改意见。论证意见主要有：明确方法的适用范围；补充样品采样要求、样品的前处理方法；完善各环节的质量保证和质量控制要求；明确两个毒性终点的表达方法；以标准参考毒物、统一的生活污水和工业废水开展实验室间的方法验证。编制组随后根据专家意见对标准文本草案和编制说明进行了修改完善。

1.2.4 落实专家组意见，深入开展方法试验

2016年2月~2017年8月，根据开题论证意见，编制组按照《国家环境保护标准制修订工

作管理办法》（国环规科技〔2017〕1号）、《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）、《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》（环科函〔2009〕10号）和《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565-2010）的要求深入开展试验研究，确定了标准方法的试验条件及QA/QC的相关要求（如参比物质种类及浓度等）。同时针对适用范围做了大量的研究和验证工作。

1.2.5 组织方法验证工作

按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，2017年8月～11月，编制组组织六家有资质实验室进行本方法的验证工作，随后对数据进行汇总和整理分析。

验证单位：中国环境科学研究院环境分析测试技术中心、中国环境监测总站、生态环境部南京环境科学研究所、浙江省环境监测中心、浙江省农业科学院农产品质量标准研究所、江苏国创环保科技有限公司。

1.2.6 编写标准征求意见稿和编制说明

2017年12月～2018年5月，根据实验研究结果、实验室间验证结果，在总结分析国内外相关标准的基础上，编写完成《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》的标准文本征求意见稿和编制说明初稿。

1.2.7 征求意见稿和编制说明专家研讨

2018年5月底，召开《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》标准文本征求意见稿和编制说明初稿的专家研讨会，专家组建议进一步规范标准文本中的术语和定义、试剂和材料、样品采集方法的表述，细化测试的试验步骤，增加不同发育阶段和鱼卵测试效应判断示例图的资料性附录；编制说明中细化标准内容的确定依据；按照 HJ 168 和 HJ 565 进行标准文本和编制说明的编辑性修改。同时专家组对该标准适用范围也进行了讨论，确认了本标准适用于生活污水和工业废水的急性毒性测定。编制组根据专家组意见进行了修改完善。

1.2.8 征求意见稿和编制说明技术审查会

2018年7月25日，在北京正式召开本标准征求意见稿技术审查会，会议审查结论为通过，同时形成如下修改意见：将适用范围改为“本标准适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水的急性毒性的测定”；编制说明中增加溶解氧对鱼卵孵化的影响；标准文本中优化受精卵的判定，进一步明确毒性测试终点，补充 LC₅₀ 的计算方法，完善质量保证和质量控制的表述，增加斑马鱼及鱼卵的安全处置要求，编制组根据专家意见进行修改完善后，正式提交本标准征求意见稿及编制说明。

2 标准制订的必要性分析

2.1 被测对象的环境危害

近年来,随着我国工业化和城市化的加快,城市生活污水和工业废水的排放总量和所含各种污染物的成分也在迅速增加,有些排放废水虽然常规理化指标达标,但实际上仍可能含有对人体健康具有危害的污染物,这些污染物在水环境中的长期积累,使得水体综合污染和复合毒性的现象越来越突出。

尤其是许多有毒有害的微污染物,如 POPs 包括有机氯农药(OCPs)、多环芳烃(PAHs)、全氟辛酸磺酸(PFOS)和全氟辛酸铵(PFOA)以及消毒副产物等新型污染物在国内外城市污水处理厂的排水中均有检出,虽然在环境中残留水平很低,对综合指标 BOD、COD 和 TOC 等的贡献极小,这些环境毒性物质在较高浓度时可引起生物的急性毒性效应,在较低浓度时往往还有其他生物危害作用。如容易导致动物和人生育能力下降及其后代生存、繁殖能力减弱,造成两栖类等种群的衰退,甚至区域性灭绝,对生态环境和人类健康构成威胁。

近年来,国内外已有很多研究学者通过采用发光细菌、大型溞、鱼类(斑马鱼、青鳉、稀有鮎鲫)、藻类等各种测试生物研究发现不同排水具有较强的急性毒性效应。因而有必要加强水质综合毒性监控和生态健康风险评价,对保证水体的生态环境安全具有重要的意义,也是未来水质目标采用毒性指标管控和生物风险评估的重要依据。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

2.2.1 环境监管的迫切需求

目前,我国污水排放的监督和管理主要采用物理化学监测方法,根据理化指标进行评价、计算污染物等标污染负荷及进行总量控制等。自 1973 年我国第一个污染物排放标准《工业“三废”排放试行标准》(GB J4—1973)发布以来,截至 2018 年,我国已有 67 项国家水污染物排放标准,包括 1 项污水综合排放标准和 60 多项行业水污染物排放标准。经过 40 多年的发展,我国水污染物排放标准中涉及的污染物控制项目不断丰富完善。目前,我国水污染物排放标准控制污染物项目共 100 余项,基本满足当前水环境管理的需求。然而,这些标准并不能反映废水排放后对生物的综合毒性。考虑到在排放标准中应体现防范环境风险的理念,保护人体健康和生态环境,综合毒性指标的应用得到人们越来越多的关注。同时,增加综合毒性指标可以与理化手段优势互补,为环境管理以及相关决策提供全面、快捷、可靠依据。

美国、加拿大、德国等发达国家早在上世纪七八十年代就已经开始实施废水综合毒性控制,排水综合毒性评价技术在发达国家的环境管理和改善环境水质的过程中起到了重要作用。如 US EPA(美国国家环境保护局)将 WET(whole effluent toxicity, 排水综合毒性)定义为由水生生物毒性测试直接测量的排水综合毒性效应,将 WETT(whole effluent toxicity test,

排水综合毒性测试)定义为用一组淡水、海水与河口的标准化植物、无脊椎动物和脊椎动物评估排水和受纳水体的急性和慢性综合毒性的测试,并且将 WET 技术与水质基准项目、水生生态评价项目并称为水质毒性控制战略的三大控制措施。新西兰和韩国也采用 WET 表示排水综合毒性。英国和澳大利亚采用 DTA (direct toxicity assessment, 直接毒性评价)表示排水综合毒性。加拿大则采用 EEM (environmental effects monitoring, 环境效应监测)表示排水综合毒性。OSPAR (欧洲大陆国家组织《保护东北大西洋海洋环境公约》15 国)和 COHIBA (波罗的海有害物质控制项目 8 国)进一步提出 WEA (whole effluent assessment, 排水综合测试),其定义为一组用于评价排水的持久性、生物蓄积性和综合毒性的生物学测试。这些标准的建立能够有效地督促工业废水处理工艺的改进和优化,保证工业废水的水质安全,控制水环境污染和保护水资源。

2008 年,我国在制药工业系列排放标准 (GB 21903~GB 21908) 中首次引入了综合毒性指标,即“急性毒性 (HgCl₂ 毒性当量计)”。制药工业系列排放标准中“急性毒性 (HgCl₂ 毒性当量计)”的标准限值主要根据发光细菌法检测废水综合毒性分级标准,即 HgCl₂ 毒性当量指标值 < 0.07 mg/L 属于低毒,由此确定标准限值为毒性当量 0.07 mg/L,将废水毒性控制在低毒范围内。这表明了环境管理对毒理学指标需求的提升,也是未来发展的必然趋势。

2.2.2 相关环保标准和环保工作的需要

在 2014 年度国家环境保护标准计划项目指南的环境管理规范中提到“废水综合毒性评价技术规范”,在 2015 年度国家环境保护标准计划项目指南中就出现“水质急性毒性的测定斑马鱼卵法”(配套《城镇污水处理厂污染物排放标准》)。《国家环境保护标准“十三五”发展规划》中着重提到“根据《大气十条》《水十条》《土十条》环境管理需求和监测技术进展,着力构建支撑质量标准、排放标准实施的环境监测类标准体系。制订一批反映水生生物急性毒性、慢性毒性以及致突变性的监测分析方法标准,配套水环境综合毒性评价体系的建立,健全生物类监测分析方法标准制修订技术方法体系”。

近年来,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,原环境保护部实施了国家环境保护标准《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)的修订任务。2015 年 11 月原环境保护部发布《关于征求国家环境保护标准<城镇污水处理厂污染物排放标准>(征求意见稿)意见的函》(环办函〔2015〕1782 号),发布《城镇污水处理厂污染物排放标准》征求意见稿和编制说明向社会征求意见,此次修订增加了一些选择控制项目。为防范环境风险,在水污染项目的选择控制项目中,首次增加综合毒性指标来反映排放废水的综合毒性。包括发光细菌、大型溞、水藻和斑马鱼卵急性毒性,并规定了管理限值。其中就包括《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》标准方法,

并将鱼卵的毒性标准限值确定为废水的 2 倍稀释倍数，见表 1。

表 1 《城镇污水处理厂污染物排放标准》（征求意见稿）中控制项目的排放限值

序号	控制项目	排放限值（稀释倍数）
1	鱼卵毒性	2
2	蚤类毒性	8
3	藻类毒性	16
4	发光细菌毒性	32

由此可见，标准《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》的制订能够满足当前《城镇污水处理厂污染物排放标准》修订的需求，有利于补充完善正在制订的《废水综合毒性评价技术规范》，为有效的保护我国水生态系统和评价我国水生态环境的生态风险具有重要意义。

3 国内外相关标准研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

斑马鱼卵作为实验生物模型的独特优势：1) 亲鱼体型小，易于饲养，从而减少饲养空间和管理成本；2) 亲鱼产卵量大，每条雌鱼一天可产卵几百个，每周可产卵一次，保证了受试生物的来源和用量，能够确保统计学的要求；3) 鱼卵是体外发育，鱼卵试验能够在细胞培养板或者在细菌培养皿中进行，可直接观察组织和器官的整个发育过程；4) 鱼卵体积小，在进行毒理试验时需要药量及耗材少、设备体积小。从而减少成本，便于操作；5) 鱼卵试验周期短，从受精卵开始鱼卵能够依靠自身的卵黄囊供给营养存活好几天，并能清楚的看到畸形现象，整个过程不超过一周。此外，使用早期生命阶段的鱼卵进行毒性测试，一般比斑马鱼幼体和成体更为敏感，研究结果可为环境类基准和标准的建立提供理论依据。斑马鱼急性毒性测定方法在我国化学品和废水急性毒性的管理上起到了积极作用，但是随着目前试验动物伦理学“3R”原则的倡导以及高通量测试的需求，越来越倾向于采用细胞和鱼卵的测试方法来替代。

通过 ISO、ASTM、OECD 等国外标准的查新发现，ASTM 发布了“Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians” E1192-97 (2008)，该方法利用淡水和海水生物如鱼类、无脊椎动物和两栖类对水环境样品和废水进行急性毒性试验，在标准的测试生物部分中提出可以使用鱼类的早期敏感生命阶段进行废水和水环境样品的测试，其中包括鱼卵。

ISO 已经制订和颁布了“Water quality-Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” (ISO 15088-2007)，标准规定了废水对斑马鱼鱼卵 48 h 内急性

毒性测定的方法，该标准适用于城市生活污水和工业废水。同时，ISO 推荐该标准为鱼类急性毒性试验（ISO 7346-1、ISO 7346-2）的替代方法。

自 ISO 15088-2007 标准实施后，欧盟及成员国（13 个国家）也参照该标准颁布了其国家和欧盟标准，标准内容和该标准一致，未做任何改动。如：欧盟（EN ISO 15088-2008）、英国（BS EN ISO 15088-2008）、法国（NF T90-365-2009）、德国（DIN EN ISO 15088-2009）等，具体情况如表 2 所示。

表 2 国外相关标准情况

序号	标准制订主体		标准名称	标准编号	采用时间
1	美国		Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (对鱼类、大型无脊椎动物和两栖类水环境样品和废水进行急性毒性试验的标准指南)	ASTM E1192 - 97	2008
2	国际组织	ISO	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	ISO 15088	2007
3		OECD	Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (鱼类胚胎急性毒性 (FET) 试验)	OECD 236	2013
4	欧盟及成员国	欧盟	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	EN ISO 15088	2008
5		英国	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	BS EN ISO 15088	2008
6		德国	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	DIN EN ISO 15088	2009
7		法国	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	NF T90-365	2009
8		意大利	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	UNI EN ISO 15088	2009
9		立陶宛	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	LST EN ISO 15088	2009
10		丹麦	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	DS/EN ISO 15088	2009
11		爱尔兰	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	I.S. EN ISO 15088	2009
12		比利时	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	NBN EN ISO 15088	2009

续表 2

13	欧盟 及成 员国	奥地利	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	ONORM EN ISO 15088	2009
14		挪威	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	NS EN ISO 15088	2009
15		波兰	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	PN EN ISO 15088	2009
16		荷兰	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	NEN EN ISO 15088	2009
17		瑞士	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	SN EN ISO 15088	2009
18	亚洲	新加坡	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	SS EN ISO 15088 Ed. 1	2009
19		韩国	Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) (水质 废水对斑马鱼卵的急性毒性的测定(<i>Danio rerio</i>))	KS I ISO 15088	2009

OECD 在 2013 年发布了 236 号鱼类胚胎测试指南“Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test”，该指南是使用斑马鱼胚胎来进行急性毒性试验，测定化学品对鱼胚胎期的急性毒性，已被成功地应用于多种不同溶解度、挥发性和疏水性的化学品物质。

3.2 国内相关分析方法研究

我国在废水综合毒性的测定上现行的标准主要有：1)《水质 物质对蚤类（大型蚤）急性毒性测定方法》(GB/T 13266-91)；2)《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441-1995)；3)《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》(GB/T 13267-91)，该标准参照采用国际标准 ISO 7346 1~3《水质—物质对淡水鱼（斑马鱼 *Brachydanio rerio*) 急性致死毒性的测定》；4)《工业废水的试验方法 鱼类急性毒性试验》(GB/T 21814-2008)，该标准等同采用日本工业标准 JIS K 0102-71:1998。

2008 年，我国在制药工业系列排放标准（GB 21903~GB 21908）中首次引入了综合毒性指标，即“急性毒性（HgCl₂ 毒性当量计）”。根据《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441—1995），该方法的测试时间为 15 min，测试结果采用 HgCl₂ 的毒性当量进行表征。制药工业系列排放标准中“急性毒性（HgCl₂ 毒性当量计）”的标准限值主要根据发

光细菌法检测废水综合毒性分级标准，即 HgCl_2 毒性指标值 $<0.07 \text{ mg/L}$ 属于低毒，由此确定标准限值为 0.07 mg/L ，将废水毒性控制在低毒范围内。

《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》（GB/T 13267-91）应用于上海市地方标准《污水综合排放标准》（DB 31/199—2009），在表 2 的第二类污染物排放限值中规定了所有排污单位总排口排水要采用鱼类急性毒性（96 h LC_{50} ）进行监测，排放限值为 96 h 100% 废水原液未达半数致死效应。

以上表明了环境管理对毒理学指标需求的提升，也是未来发展的必然趋势。上述标准在我国化学品和废水急性毒性的测试上都起到了积极作用，但是由于高通量测试和高敏感性的需求，越来越倾向于采用细胞和胚胎类的替代方法。

目前我们国家还没有制订关于采用斑马鱼卵法来测定水质急性毒性的方法，与发达国家还存在一些差距。因此基于我国水生态系统保护目的，配套《城镇污水处理厂污染物排放标准》，亟待开发《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》毒性试验标准。

3.3 与国内外相关标准的关系

本标准方法的制订以 ISO 15088-2007 “Water quality-Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 方法为基础，参照借鉴 OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” 指南，与上述两种方法的关系和比较见表 3。

表 3 相关试验方法主要技术指标比较

指标	ISO 15088-2007	OECD 236	本标准方法
适用范围	规定了一种通过测定稀释度或浓度来反映废水在 48h 内对斑马鱼卵的急性毒性作用的方法，也适用于处理过的城市生活污水和工业废水的急性毒性测试	适用于化学品的急性毒性	适用于生活污水、工业废水、地表水和地下水的急性毒性测定（参照 ISO 15088）
受试生物	受精的斑马鱼卵	受精的斑马鱼卵	受精的斑马鱼卵（参照 ISO 15088）
	繁殖时雄、雌比 2:1	繁殖时雄、雌比 2:1	繁殖时雄、雌比 2:1（参照 ISO 15088）
	筛选 4-细胞期至 128-细胞期的受精卵	同时使用 3 个产卵箱。为避免遗传偏差，鱼卵应从最少 3 个育种组中收集并混合，然后随机筛选受精卵，尽快开始试验	至少进行 3 组以上配种、产卵，将鱼卵收集、混合后，筛选 4-细胞期至 128-细胞期的受精卵。（参照 ISO 15088 和 OECD 236）
	受精率 $>50\%$	每尾雌鱼受精率 $\geq 70\%$	每尾雌鱼受精率 $\geq 70\%$ （参照 OECD 236）
参比物质及浓度	3.7 mg/L 的 3,4-二氯苯胺	4 mg/L 的 3,4-二氯苯胺	3.7 mg/L 的 3,4-二氯苯胺（参照 ISO 15088）

续表 3

指标	ISO 15088-2007	OECD 236	本标准方法
样品采集	按 ISO 5667-16 要求进行水样采集	/	使用 1 000 ml 及以上惰性材料（如聚四氟乙烯）制成的采样瓶按照 HJ/T 91 规定要求采集水样，满瓶密封（采样容器参照 ISO 5667-16，采样过程参照 HJ/T 91）
样品运输与保存	2℃~8℃避光运输和保存，不超过 48 h (ISO 5667-16)	/	2℃~8℃避光运输和保存，不超过 48 h；需长期保存，则尽快于-18℃保存，不超过 2 个月 (参照 ISO 5667-16-2017)
样品预处理 (温度调节)	低于-18℃保存的水样，不超过 25℃解冻，或在 2℃~8℃冷藏过夜解冻 (ISO 5667-16)	26℃±1℃	低于-18℃保存的水样，不超过 25℃解冻，或在 2℃~8℃冷藏过夜解冻 (参照 ISO 5667-16-2017)；试验开始前，26℃±1℃避光平衡至恒温后用于试验 (参照 OECD 236)
样品预处理 (pH 调节)	调节至 7.0±0.2	调节至 6.5~8.5	调节至 6.5~8.5 (参照 OECD 236、GB 11607-89)
样品预处理 (溶解氧调节)	溶解氧浓度不低于 4 mg/L（大约 50%饱和度），且不能过饱和。	无	溶解氧浓度不低于 4 mg/L（大约 50%饱和度），且不能过饱和。 (参照 ISO 15088)
试验用水	用 ISO 7346-1 和 ISO 7346-2 中指定的标准稀释水： —294.0 mg/L 氯化钙， CaCl ₂ ·2H ₂ O —123.3 mg/L 硫酸镁， MgSO ₄ ·7H ₂ O —63.0 mg/L 碳酸氢钠， NaHCO ₃ —5.5 mg/L 氯化钾，KCl	硬度 100~300 mg/L（以碳酸钙计），也可使用水质良好的地表水和井水	标准稀释水： —294.0 mg/L 氯化钙，CaCl ₂ ·2H ₂ O —123.3 mg/L 硫酸镁，MgSO ₄ ·7H ₂ O —63.0 mg/L 碳酸氢钠，NaHCO ₃ —5.5 mg/L 氯化钾，KCl (参照 ISO 15088)
样品稀释	按照 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、6 倍、8 倍、12 倍、16 倍、24 倍和 32 倍，选择稀释度进行稀释	每一化学品做 5 个浓度梯度，按等比级数进行稀释，等比级数不能超过 2.2	按照 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、6 倍、8 倍、12 倍、16 倍、24 倍和 32 倍，选择稀释度进行稀释 (参照 ISO 15088)
鱼卵暴露	每一稀释比 10 个； 阴性对照 10 个； 阳性对照 10 个； 板孔对照每一板 4 个	每一浓度梯度 20 个； 阴性对照 20 个； 阳性对照 20 个； 板孔对照每一板 4 个	每一稀释比 10 个； 阴性对照 10 个； 阳性对照 10 个； 板孔对照每一板 4 个 (参照 ISO 15088)
暴露时间	暴露时间 48 h	暴露时间 96 h	暴露时间 48 h (参照 ISO 15088)

指标	ISO 15088-2007	OECD 236	本标准方法
测试终点判定	每 24 h 观察并记录, 48 h 后鱼卵出现以下任一情况视胚胎为死亡: —卵凝结 —尾部未分离 —心跳未能检测出	每 24 h 观察并记录, 48 h 后出现以下任一情况视胚胎为死亡: —卵凝结 —体节未形成 —尾部未分离 —心跳未能检测出	每 24 h 观察并记录, 48 h 后出现以下任一情况视胚胎为死亡: —卵凝结 —体节未形成 —尾部未分离 —心跳未能检测出 (参照 ISO 15088、OECD 236)
质量保证和质量控制	培养 48 h 后: 板孔对照组鱼卵不得死亡; 阴性对照水样鱼卵存活率 $\geq 90\%$; 阳性对照水样鱼卵死亡率 $> 10\%$ 。	培养 96 h 后: 胚胎在阴性对照以及相应的溶剂对照中的整体存活率 $\geq 90\%$; 阳性对照的死亡率应 $> 30\%$; 阴性对照 (以及溶剂对照) 孵化率应 $\geq 80\%$; 阴性对照和最高浓度测试中的溶解氧饱和度应 $\geq 80\%$ 。	培养 48 h 后: 板孔对照组鱼卵不得死亡; 阴性对照水样鱼卵存活率 $\geq 90\%$; 阳性对照水样鱼卵死亡率 $> 10\%$ 。 (参照 ISO 15088)

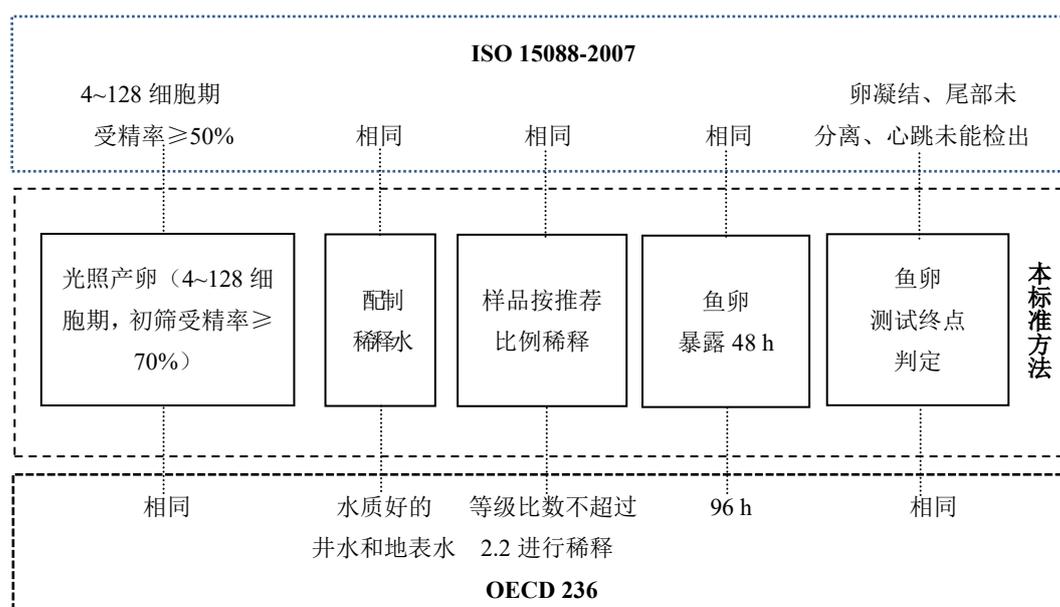


图 1 本标准与相关标准的关系图

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

本标准依据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（国环规科技〔2017〕1号）、《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》（环科函〔2009〕10号）要求，以国内外最新的标准方法和相关文献研究成果为编制基础。同时考虑到国内现有监测机构的技术水平、管理水平、经济条

件等实际情况，确保所编制标准能够在全国范围内推广应用。标准制订过程中主要遵循以下原则：

1) 满足相关环保管理标准和环保工作的要求，尤其是配套《城镇污水处理厂污染物排放标准》；

2) 方法准确可靠，以 ISO 15088-2007 标准为主要编制依据，同时参照 OECD 236 方法，对试验条件参数进行研究验证，相关方法性能指标满足环境监测技术及环境管理的要求；

3) 方法具有普遍适用性，易于推广使用。

4.2 标准制订的技术路线

本标准制订以 ISO 15088-2007 国际标准为基础进行转化，适当借鉴 OECD 236 方法，并充分考虑目前我国环境监测的技术经济水平，具有较强的科学性、先进性、可行性和可操作性，能够满足相关环保管理标准和环保工作的要求。

标准制订以后预计在国内具有较好的推广前景，所使用的仪器设备及器具均为实验室常用设备，本试验中专用的斑马鱼养殖系统可以根据具体要求直接购买或定制，在试验操作等技术环节方面，只要进行针对性的培训便可以开展水质急性毒性的检测工作。

技术路线详见图 2。

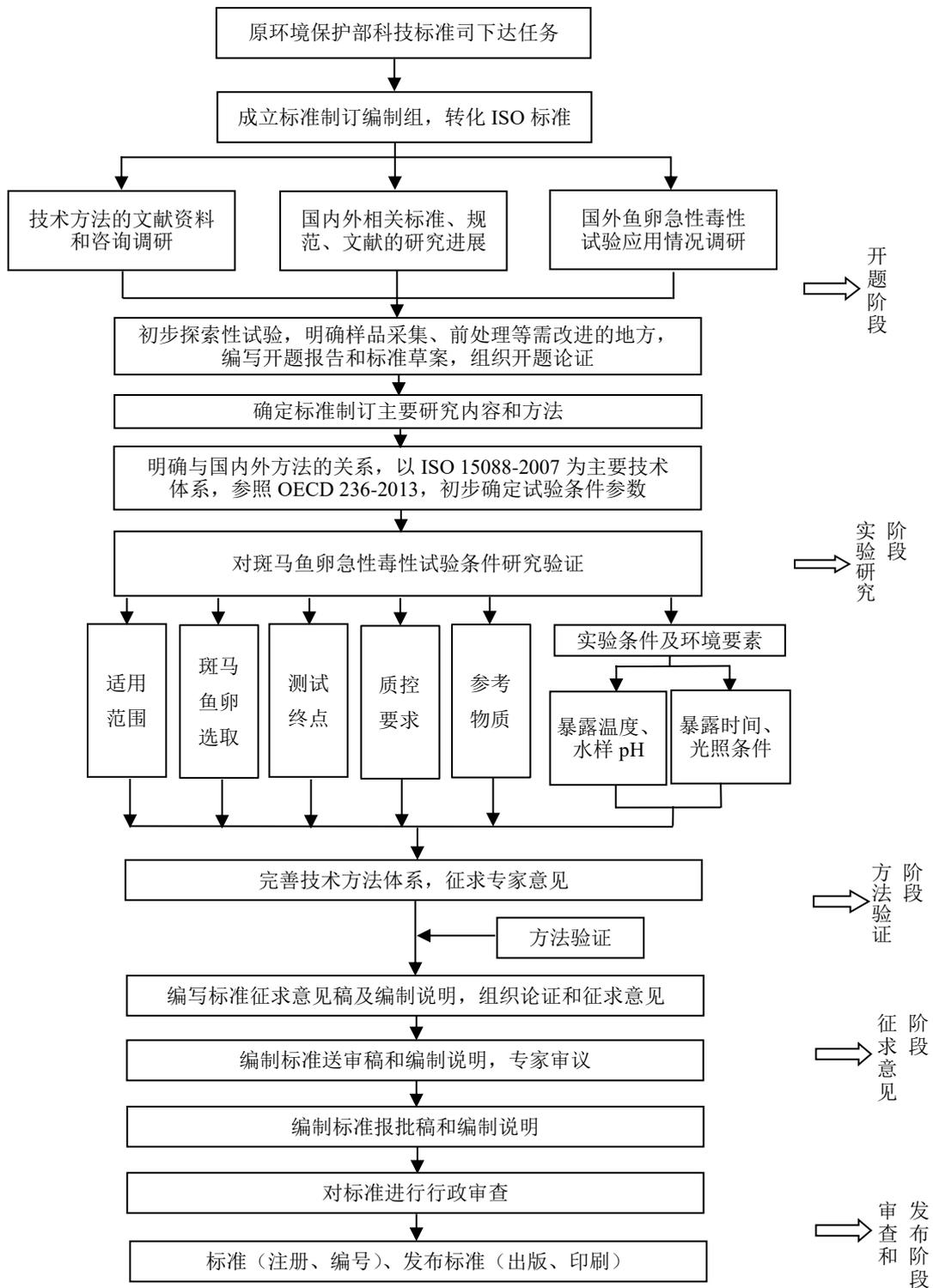


图 2 标准制订技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

5.1.1 本方法标准适用范围

本标准规定了水质急性毒性测定的斑马鱼卵试验方法，适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水的急性毒性测定。

5.1.2 本方法标准拟达到的技术要求

本方法测定的是水质的急性毒性综合效应，测试目标非单一物质，测定结果以斑马鱼卵死亡最低无效应稀释倍数（LID）来表征受试水样急性毒性，由于各受试水样成分和性质不同，不适于套用检出限、测定范围及准确度的概念。

本方法的性能适宜于用精密度来衡量，实验室内及实验室间验证时对方法的精密度进行了案例分析。

本方法的性能也适宜用有效性来衡量，以板对照、阴性对照水样和阳性对照水样进行质量控制，板对照和阴性对照水样鱼卵存活率分别为 100%和 $\geq 90\%$ ，阳性对照水样鱼卵死亡率 $> 10\%$ 。

5.2 术语和定义

5.2.1 鱼卵 fish egg

指处于卵膜破裂前整个发育阶段的卵细胞。

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中对鱼卵的定义 “fish egg generally used term for all development stages of an egg cell (inside the chorion) within this International Standard. NOTE If necessary, the following qualifiers for this term are used: ‘not fertilized’, immediately after spawning; ‘freshly fertilized’, between 4-cell stage and 128-cell stage; ‘embryo’, if the developing embryo is visible inside the egg before hatching.” ——本标准中，鱼卵指处于整个发育阶段的卵细胞（破卵膜前的卵细胞）。注：如有必要，使用下列限定语限定本术语：“未受精”，刚产卵；“新鲜受精卵”，4-细胞期至 128-细胞期；“胚胎”，破膜前胚胎发育较为明显阶段。

斑马鱼卵相关发育阶段见图3。

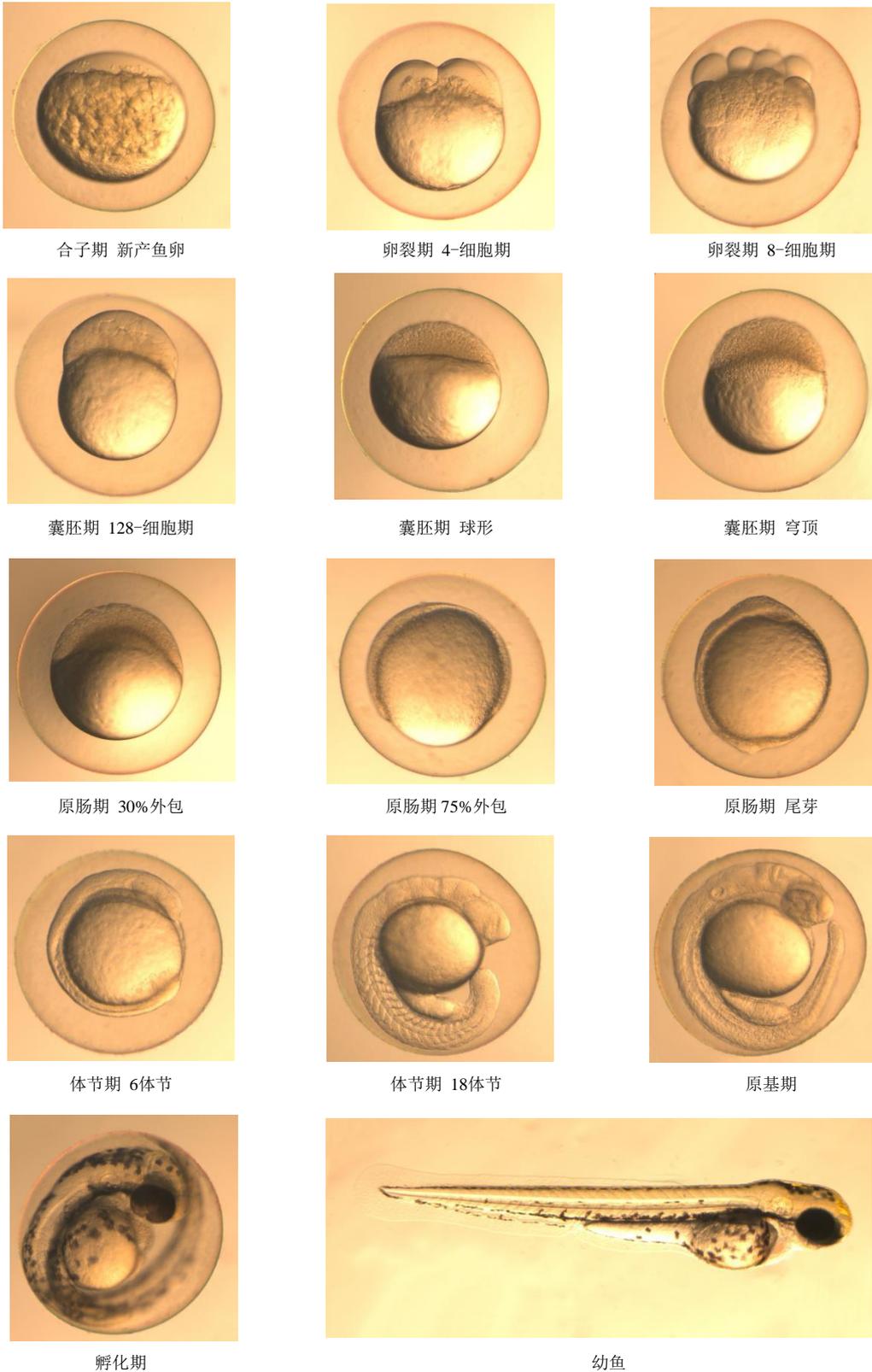


图3 斑马鱼卵相关发育阶段

5.2.2 稀释倍数 dilution level

原水样占稀释后水样总体积分数的倒数，一般以 D 来表示。例如，水样未稀释，则稀释倍数 $D=1$ ；取 250 ml 水样稀释至 1 000 ml（即体积分数为 25%），则稀释倍数 $D=4$ 。

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中对稀释倍数的定义 “reciprocal value of the volume fraction of waste water in dilution water in which the test is conducted” ——废水在稀释后水样中所占体积分数的倒数。

5.2.3 最低无效应稀释倍数 lowest ineffective dilution

测试中不产生测试效应的最低稀释倍数，本标准指能使不少于 90% 鱼卵存活的水样的最低稀释倍数，用 LID 表示。

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中对最低无效应稀释倍数的定义 “lowest ineffective dilution tested, expressed as dilution level D (3.2), at which no inhibition, or only effects not exceeding the test-specific variability, are observed” 、 “lowest ineffective dilution within a test batch in which at least 90% of the eggs do not show any effect according to this International Standard” ——测试中不产生测试效应的最低稀释倍数。根据本标准，在一批测试中至少 90% 的鱼卵未受到影响的最低无效应稀释倍数。

5.2.4 半数致死浓度 LC_{50}

本标准中，半数致死浓度是指暴露 48 h 后使 50% 斑马鱼卵死亡的水样体积分数，用 LC_{50} 表示。

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中对半数效应浓度的定义 “concentration at which there is an effect on 50% of the organisms in line with the test criterion” ——使 50% 受试生物产生效应的浓度。

5.2.5 参比物质 reference substance

测试中，用于验证方法敏感性的已知阳性对照物质。

依据 ISO 5667-16 “Water quality - Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples” 中对参比物质的定义 “known substance to verify the sensitivity of the method——用于验证方法敏感性的已知物质”。

5.3 方法原理

使用 24 孔细胞培养板，在板对照、阴性对照和阳性对照控制的条件下，将 4~128-细胞期的斑马鱼受精卵置于不同稀释倍数的水样中，在 $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养 48 h，根据

鱼卵存活与死亡的统计数据求出 LID 或 LC₅₀ 值，表征水样的急性毒性。

参照 ISO 15088-2007 中“方法原理”的表述：In a dilution series, waste water graduated to integral volume ratio is mixed with dilution water giving defined dilution levels, D. After exposure of fertilized fish eggs to the test batches for 48 h using microplates, the dilution limit in which no acute toxic effect occurs is determined (LID). At 26 °C, the embryos hatch after 72 h to 96 h. The test duration is 48 h. As a positive control, a solution of 3.7 mg/L of the reference substance, 3,4-dichloroaniline, is tested with 10 fertilized eggs. This International Standard may also be used to calculate dose-response-based EC₅₀ values as percentages of waste water without changing the test design——在一个废水的稀释系列中，稀释后水样总体积与原水样的比值就是稀释倍数 D。受精鱼卵在该批次水样中于微孔板内暴露 48 h 后，求出无急性毒性效应的最低稀释倍数 (LID)。在 26 °C 时，胚胎大约 72~96 h 后孵出，但本试验时间为 48 h。使用 10 个受精卵于 3.7 mg/L 的 3,4-二氯苯胺工作液进行测试，作为阳性对照。该标准也可以基于剂量-效应关系来求得以废水百分比浓度来表示的 LC₅₀ 值。

5.4 干扰和消除

水样浊度或色度干扰测试终点判断，可用塑料滴管缓慢从 24 孔细胞培养板中吸出一定量的水样后再行观察，避免触碰鱼卵；观察结束后，若需继续暴露，则用塑料滴管将原水样移回，恢复原有暴露体积。

以上操作是为了排除水样浊度或色度对测试效应观察的干扰，以便清晰地观察鱼卵的发育情况，对测试过程和鱼卵无影响。

5.5 试剂和材料

5.5.1 受试生物

5.5.1.1 种鱼

正常野生型斑马鱼 (*Danio rerio*) 呈银白色带蓝色水平条纹，成鱼体长可达 3.5 cm 左右。使用健壮、无疾病、无畸形、产卵量及受精率高的野生型斑马鱼作为种鱼用于产卵，鱼龄在 6 月~24 月之间。健康雌鱼腹部银亮，饱满膨大。健康雄鱼体型修长，腹部扁平，身体带有金黄色光泽。种鱼在产卵前 6 个月不予使用任何药物。

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.1.1: For the production of eggs, use only apparently healthy spawners free from externally visible diseases and aged between 6 months and 24 months. Do not treat parental test fish with any pharmaceuticals (acute or prophylactic) during the 6 months

immediately before spawning. ——使用健康、无疾病的斑马鱼 (*Danio rerio*) 用于产卵, 鱼龄在 6~24 个月之间。在产卵前 6 个月不予使用任何药物。同时, GB/T 13267-1991 《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》4.1 试验生物中要求“试验鱼应无明显的疾病和肉眼可见的畸形”。

ISO 7346-1996 “Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio*)” 附录 A.1 “The body is cylindrical with 7 to 9 dark blue horizontal stripes on silver.” ——在银白色的鱼体上有 7 至 9 条深蓝色水平条纹。“Males are slimmer than females and possess a golden sheen. Females are more silvery and the abdomen is distended, particularly prior to spawning.” ——雄性较雌性瘦, 带有金黄色光泽。雌性更偏呈银白色, 产卵前腹部特别膨胀。

ISO 7346-1996 附录 A.6 “The fish are sexually mature at 3 months and attain a length of 3,5 cm.” ——三个月后, 鱼性成熟, 体长达 3.5 cm。同时, GB/T 13267-1991 《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》附录 B5 “三个月后, 鱼性成熟, 体长达 3.5 cm 左右”。对此, 本实验室研究的情况如下表, 达到上述标准的要求。

表4 成熟斑马鱼体长统计

鱼龄	6个月					12个月				
体长 (cm)	3.5	3.5	3.7	3.4	3.7	4.3	4.1	4.0	4.0	3.8
	3.4	3.4	3.7	3.6	3.3	4.0	4.1	4.5	3.7	3.8
	3.6	3.6	3.7	3.3	3.4	3.9	4.0	4.2	3.8	4.0
	3.4	3.5	3.6	3.2	3.5	3.9	3.8	4.1	3.8	3.9
	3.6	3.3	3.4	3.3	3.6	3.8	4.0	4.2	3.9	4.0
	3.7	3.2	3.3	3.4	3.3	3.7	4.2	4.3	4.0	3.8
平均体长 (cm)	3.47					3.99				
标准偏差 (cm)	0.16					0.19				
95%置信区间 (cm)	3.17~3.77					3.62~4.36				

应当选择产卵量高、受精率高的种鱼用于产卵。鱼卵受精率实验室研究情况见 5.5.1.2 鱼卵部分, 种鱼产卵量的实验室研究情况如下。

GB/T 13267-1991 《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》附录 B4 “雌鱼每次产卵约 300 粒”。对此, 本实验室研究情况如下表, 单尾雌鱼 300 粒是较高水平的产卵量。

表5 斑马鱼产卵量统计

结果	雌鱼产卵量 (粒/尾)				
	统计值	304	272	253	312
	310	282	249	252	291
平均产卵量	285.2				
标准偏差	28.1				
95%置信区间	230~340				

斑马鱼种鱼是获取斑马鱼卵的前提条件,为随时获取鱼卵需将斑马鱼种鱼维持在随时都可产卵的状态,以下为斑马鱼种鱼驯养及维持的条件。

1) 用水

使用标准稀释水用于斑马鱼种鱼的驯养及维持。自来水经物理、化学、生物复合净化处理(例如活性炭、反渗透膜等等方法),用 NaCl 调节电导率至 300~500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 后作为养殖水也可用于种鱼的驯养及维持。这是目前国内外斑马鱼养殖自动控制系统对斑马鱼种鱼驯养维持的实际做法。

2) 水质

水中不应含有余氯等消毒剂,溶解氧饱和度应至少保持在 80%, pH 值介于 6.5~8.5。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.1.3 Water for fish keeping and breeding 的要求 “The oxygen saturation should be at least 80 %. For keeping and breeding, suitable drinking water (e.g. free from disinfectants) may be used alternatively” ——氧饱和度至少应为 80%,种鱼饲养和维持,可用适当的饮用水(例如不含消毒剂)替代。OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” 附录 2 喂养方法部分要求 “pH = 6.5-8.5” ——pH 值 6.5~8.5。

3) 水温

26 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.1.3 Water for fish keeping and breeding 的要求水温为 26 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

4) 光照

每天 16 h / 8 h、14 h / 10 h 或 12 h / 12 h 的光/暗周期,可随季节进行调整。光照强度 540 lux 左右。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.1.5 Light conditions 的要求 “The photoperiod is constantly adjusted throughout the year, i.e. 16/8 h (light/dark) or 12/12 h. NOTE Any physiological tolerable

light conditions and photoperiods are acceptable.”——每天 16/8 小时或 12/12 小时的光/暗周期，在一年中可随季节进行调整。光照强度以人体舒适为宜。OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test ” 附录 2 喂养方法部分要求 “Illumination 540 - 1080 lux” ——光照为 540 - 1080 lux。实际上光照不宜过强，以鱼体适宜及人体舒适为准，本标准方法取 540 lux 左右。

5) 负荷

保证每尾种鱼 1~1.5 g/L 水的活动空间。

GB 13267-91 的方法中要求鱼的容积负载率都不得超过 1 g/L，而《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性致死毒性的测定 流水法》（征求意见稿）要求鱼的容积负载率都不得超过 1.5 g/L，同时结合咨询专家意见，本标准规定为每尾种鱼 1~1.5 g/L 水的活动空间。

6) 饵料

以市售丰年虫卵为种鱼饵料，按所购商品说明孵化虫卵后喂食。

首先，种鱼喂以人工饵料对鱼卵质量的保证不利，本实验室以人工饵料喂养种鱼 1 个月后，统计 10 尾雌鱼产卵情况，产卵量 50~130 粒/每尾，不符合每尾雌鱼每次产卵可达约 300 粒的要求；受精率每尾 20%~70%，但受精率 70%极少出现，基本不能满足每尾雌鱼所产鱼卵的受精率应 \geq 70%的要求；此外，还出现鱼卵明显变小、“空壳”、发白等情况。因此，人工饲料喂养种鱼无法保证试验所需鱼卵的质量。实际上，ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.1.4 要求 “Supplemental feeding with for example living food (*Artemia spec.*-nauplia, *Daphnia* in appropriate size) is recommended.”——推荐补充活食（卤虫-无节幼体，适宜大小的蚤）。OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test ” 附录 2 喂养方法部分要求 “Feeding live food provides a source of environmental enrichment and therefore live food should be given wherever possible.” ——喂养活食提供了天然营养的来源，因此应该在任何可能的情况下给予活的食物。本实验室以孵化后的丰年虫喂养种鱼，产卵量见表 5，受精率见 5.11 实验室内验证部分的情况，两项指标均达到本标准方法的要求。

其次，种鱼饲养适宜采用活食，ISO 7346-1996 A4 部分说明 “This (live food) consists of white worms (enchytraeids), *Daphnia* and brine shrimps (*Artemia*).” ——活食由线蚓、蚤和丰年虫组成。这里线蚓、蚤较耐污，在有机污染较高的水中有较丰富的生长，但这样的环境往往存在有毒有害物质的污染，故其质量可控性较差。OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test ” 附录 2 喂养方法部分要求 “additionally brine shrimp (*Artemia spec.*) nauplii and / or small daphnids of appropriate size obtained from an uncontaminated source.” ——从未受污

染的来源获得适当大小的丰年虫无节幼体和/或小型溞类。因此，本标准不考虑活食直接或间接从野外获取。对斑马鱼种鱼而言，丰年虫是理想的活食饵料，在水生生物实验室和水产养殖产业中广泛应用，其生产及应用均已产业化，质量有保障，避免野外获取的污染风险，有利于本实验方法的规范化和质量保证。

7) 产卵周期

三个月龄的斑马鱼可达到性成熟，选择鱼龄 6~24 月的雌雄种鱼配对，产卵后应分开饲养恢复 1.5~2 周才能重新配对产卵。为保证鱼卵的获取，应维持足够数量的种鱼。

ISO 7346-1996 附录 A.6 “The fish are sexually mature at 3 months and attain a length of 3,5 cm.” ——三个月后，鱼性成熟…。同时，GB/T 13267-1991 《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》附录 B5 “三个月后，鱼性成熟，…”。

根据中科院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心提供的斑马鱼维持饲养作业指导书，雌雄种鱼配对产卵后，应分开饲养恢复 1.5 周~2 周才能重新配对产卵。本实验室按此要求获得了较好的效果，若恢复期过短，则往往出现“雌雄种鱼无交配行为、产卵量偏少、受精率低、阴性对照鱼卵死亡率>10%”等现象，不能满足试验的要求。

5.5.1.2 鱼卵

受精率 $\geq 70\%$ ，处于 4~128-细胞期（见标准文本附录 A）。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.2.1 “The fertilization rate should be more than 50%.” ——受精率应 $> 50\%$ 。OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” 中规定每尾雌鱼 “The fertilisation rate should be $\geq 70\%$.” ——受精率应 $\geq 70\%$ 。较高的受精率意味着较高质量的鱼卵，有利于保证阴性对照试验的成功，因此本标准采用 OECD 方法对鱼卵受精率 $\geq 70\%$ 的要求。对此，本实验室在 5.11 部分对养殖水、稀释水、3.7 mg/L 的 3,4-二氯苯胺阳性对照水样、湟里河应急水样、生活污水处理前后水样、工业废水处理前后水样、三种化学品样品等水样进行的实验室内验证时均可获得受精率 $\geq 70\%$ 的鱼卵，表 6 是某两次测试时斑马鱼配对每尾雌鱼鱼卵受精率的统计案例，因此，上述要求是可行的。

表 6 每尾雌鱼所产鱼卵受精率统计

结果	每尾雌鱼所产鱼卵受精率				
统计值	86.67%	95.5%	83.33%	96.38%	94.49%
	91.44%	96.69%	96.84%	91.61%	94.33%
范围	83.33%~96.84%				

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to

zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.2.2 Differentiation of eggs 中 “Use only fertilized eggs from the 4-cell stage to the 128-cell stage for the test.” ——仅取 4-细胞期到 128-细胞期的受精卵用于试验。

5.5.2 试剂

除非另有说明，分析时使用符合国家标准的分析纯试剂。试验用水使用新制蒸馏水或去离子水，满足 pH 值 6.5~8.5，电导率 $<10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 的要求。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 6.1 “Water, deionized or of equivalent purity (conductivity $<10\ \mu\text{S}/\text{cm}$) ” ——去离子水或蒸馏水（电导率 $<10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ ）。

OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” 中 ANNEX 2 “Water quality” 对 pH 值的规定 “pH 在 6.5 - 8.5” ——pH 应在 6.5~8.5 之间。

5.5.2.1 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=0.1\ \text{mol}/\text{L}$ 。

量取 8.3 ml 浓盐酸，用水定容至 1 000 ml。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 对盐酸溶液的规定 “Hydrochloric acid, e.g. $c(\text{HCl}) = 0.1\ \text{mol}/\text{L}$.” ——盐酸， $c(\text{HCl})=0.1\ \text{mol}/\text{L}$ 。当水样为碱性时，用来将水样调至中性。

5.5.2.2 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=0.1\ \text{mol}/\text{L}$ 。

称取 4 g 氢氧化钠，溶于少量水中，用水定容至 1 000 ml。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 对氢氧化钠溶液的规定 “Sodium hydroxide solution, e.g. $c(\text{NaOH}) = 0.1\ \text{mol}/\text{L}$.” ——氢氧化钠溶液， $c(\text{NaOH})=0.1\ \text{mol}/\text{L}$ 。当水样为酸性时，用来将水样调至中性。

5.5.2.3 参比物质溶液

1) 参比物质 3,4-二氯苯胺储备液： $\rho(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N})=100\ \text{mg}/\text{L}$ 。

称取 0.05 g 3,4-二氯苯胺，溶于少量水中，用标准稀释水定容至 500 ml，静置 24 h，调节 pH 值至 7.0。避光冷藏保存，储备液可储存 6 个月。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 对 3,4-二氯苯胺储备液的配比规定 “Stir 0.05 g of dichloroaniline in 500 ml of dilution water for 24 h. Adjust the pH to 7.0. Kept dark in a refrigerator, this stock solution may be stored for up to 6 months.” ——称取 0.05 g 3,4-二氯苯胺溶解于 500 mg/L 稀释水中，存放 24 h。调节 pH 值 7.0。避光冷藏保存，储备液储存 6 个月。

2) 参比物质 3,4-二氯苯胺工作液, $\rho(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N})=3.7 \text{ mg/L}$ 。

量取 3.7 ml 3,4-二氯苯胺储备液, 用标准稀释水定容至 100 ml, 使用前按标准文本 8.2.1 步骤平衡至 $26 \text{ }^\circ\text{C}\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。该溶液作为阳性对照 (标准文本 9.6) 水样, 临用前现配。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中 6.4 “A concentration of 3.7 mg/L is used as positive control.” — 3.7 mg/L 浓度作为阳性对照。

5.5.2.4 标准稀释水

1) 氯化钙储备液: $\rho(\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O})=11.76 \text{ g/L}$ 。

称取 11.76 g 氯化钙, 溶于少量水中, 用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

2) 硫酸镁储备液: $\rho(\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O})=4.93 \text{ g/L}$ 。

称取 4.93 g 硫酸镁, 溶于少量水中, 用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

3) 碳酸氢钠储备液: $\rho(\text{NaHCO}_3)=2.52 \text{ g/L}$ 。

称取 2.52 g 碳酸氢钠, 溶于少量水中, 用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

4) 氯化钾储备液: $\rho(\text{KCl})=0.22 \text{ g/L}$ 。

称取 0.22 g 氯化钾, 溶于少量水中, 用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

将以上四种储备溶液各 25 ml 混合, 用水定容至 1 000 ml。

标准稀释水用于 3,4-二氯苯胺工作液 (标准文本 6.2.10) 配制以及水样稀释 (标准文本 8.3) 前, 应按标准文本 8.2.1 步骤平衡水温至 $26 \text{ }^\circ\text{C}\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 并用空气曝气至溶解氧浓度达到空气饱和值。

标准稀释水用于配种 (标准文本 9.1)、产卵及鱼卵初筛 (标准文本 9.2)、板对照和阴性对照试验 (标准文本 9.6) 时, 应按标准文本 8.2.1 步骤平衡水温至 $26 \text{ }^\circ\text{C}\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 并用空气曝气至溶解氧浓度至少达到空气饱和值的 80%。

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中 6.5 对稀释水的规定:

“294.0 mg/L of calcium chloride dihydrate, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ” —— 294.0 mg/L 氯化钙, $\text{CaCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$;

“123.3 mg/L of magnesium sulfate heptahydrate, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ” —— 123.3 mg/L 硫酸镁, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

“63.0 mg/L of sodium hydrogen carbonate, NaHCO_3 ” —— 63.0 mg/L 碳酸氢钠, NaHCO_3 ;

“5.5 mg/L of potassium chloride, KCl ” —— 5.5 mg/L 氯化钾, KCl 。

“Before adding the reference substance or waste water samples to be tested, the dilution

water shall be equilibrated with air to 100% oxygen saturation at $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.”——在加入参比物质或者用于测试的废水水样前，稀释水应在 $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下平衡至氧饱和度 100%。

5.6 仪器和设备

1) 冷藏采样箱： $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；

标准文本 8.1 样品的采集和保存中要求在 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光的条件下运输和保存。

2) pH 计：测量范围 $0\sim 14$ ，最小分度为 0.1pH 单位；

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 7 仪器部分列出 “pH-meter” ——pH 计。

3) 溶解氧测定仪：测量范围 $0\sim 20\text{ mg/L}$ ，最小分度为 0.1 mg/L；

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 7 仪器部分列出 “Oxygen probe, see ISO 5814.” ——氧探头，见 ISO 5814。

4) 倒置显微镜和/或体视显微镜：最小放大倍数为 $30\times$ ；

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 7 仪器部分列出 “Inverse microscope and/or binocular, with a minimum magnification of $30\times$.” ——倒置显微镜和/或体视镜，最小放大倍数为 $30\times$ 。

5) 冰箱：冷藏室 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；冷冻室 $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；

标准文本 8.1 样品的采集和保存中要求在 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光的条件下运输和保存，水样若需长期保存，应尽快低于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存；标准文本 8.2.1 温度调节中要求可在 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下解冻。

6) 恒温培养箱或恒温室： $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 7 仪器部分要求使用 “Temperature-controlled incubator or climatization of the room” ——温控培养箱或人工气候房。

7) 斑马鱼养殖系统：包括净水、储水、供水、水质控制及循环等系统；

8) 市售 24 孔细胞培养板：每孔容积 $2.5\sim 5\text{ ml}$ ；

作为暴露试验容器用于鱼卵暴露。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 7 仪器部分要求使用 “Exposure vessels, with a volume of 2.5 ml to 5 ml, plain ground, i.e. polystyrene one-way microplates (24 wells).” ——暴露容器，体积为 $2.5\sim 5\text{ ml}$ ，平底，一次性聚苯乙烯微孔板（24 孔）。

9) 产卵盒：惰性材料，规格 20 cm×10 cm×11 cm（如图 4 所示），可选择市售；

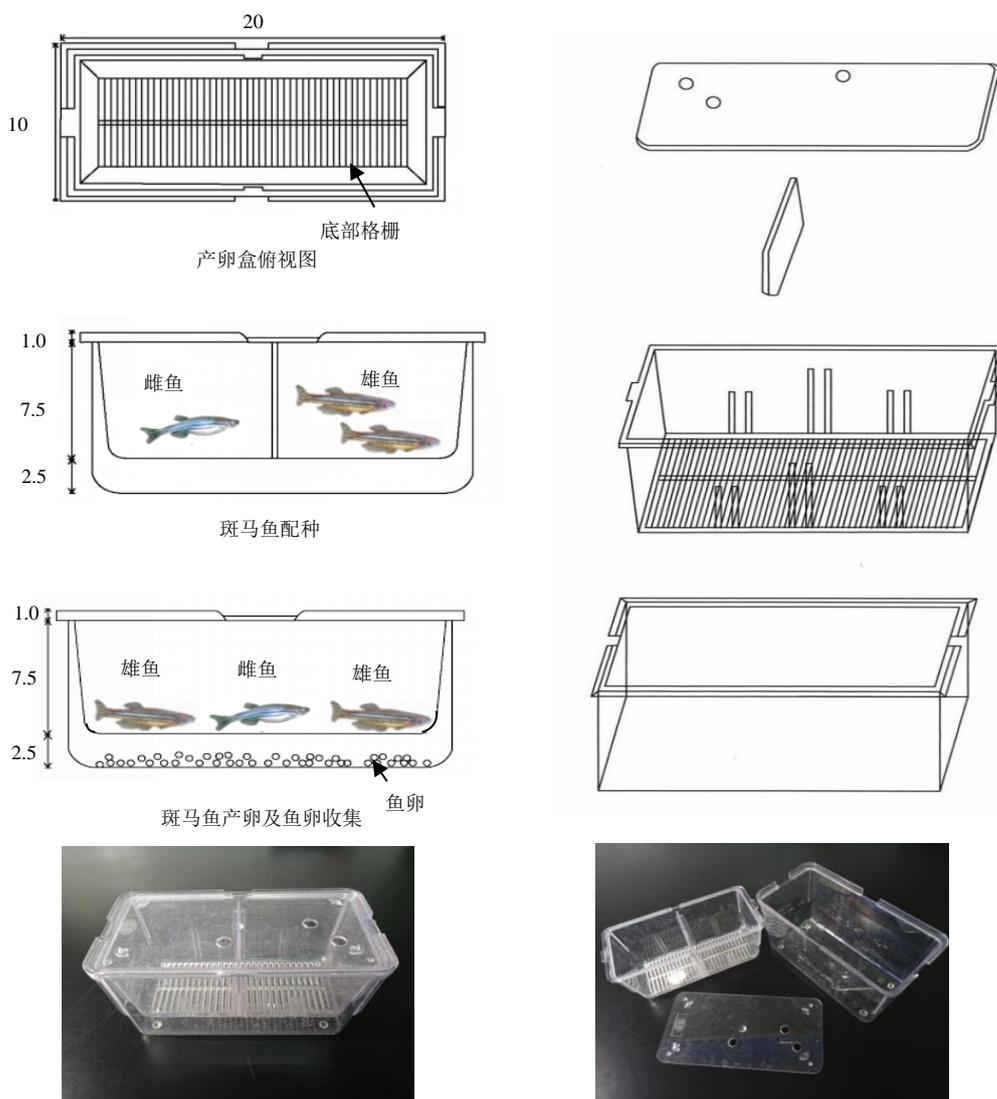


图 4 产卵盒示意图（单位：cm）

作为 2 尾雄鱼及 1 尾雌鱼配对产卵的容器，该容器规格为市售产卵盒的规格，本标准参考了该规格，是较为理想的种鱼产卵场所，为此，实验室内和实验室间验证时均获得理想的效果。

- 10) 温度计：0 °C~50 °C；
- 11) 塑料滴管：5 ml，口径大于 3 mm；
- 12) 一般实验室常用器皿和设备。

5.7 样品

5.7.1 样品的采集和保存

根据样品性质及监测需要使用 1 000 ml 及以上容量的棕色玻璃瓶（或聚丙烯、聚四氟乙烯、聚乙烯材质的容器）按照 HJ/T 91 或 HJ/T 164 的要求进行水样的采集，水样沿瓶内壁

缓慢倒入，并与瓶塞间不留空隙。

水样采集后，立即于 2~8 °C 避光运输和保存，并尽快进行试验，保存时间最长不超过 48 h。水样若需长期保存，则上述水样采集后应尽快送回实验室低于-18 °C 保存，保存前将水样充分混匀后按每 1 000 ml 容器盛装 500~700 ml 水样的量分装，保存期不超过 2 个月。

EPA-821-R-02-012 “Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms (Fifth Edition, October 2002)” 8.1.3 “Aeration during collection and transfer of effluents should be minimized to reduce the loss of volatile chemicals.”——在废水采集和转移期间，应使曝气最小化，以减少挥发性化学物质的损失。8.5.5 “To minimize the loss of toxicity due to volatilization of toxic constituents, all sample containers should be "completely" filled, leaving no air space between the contents and the lid.”——为减少由于毒性成分挥发所造成的毒性损失，所有样品容器应当充满水样，在水样和容器的盖子之间不留空隙。ISO 5667-16-2017 “Water quality—Sampling—Part 16: Guidance on biotesting of samples” 中 6.3 Filling status of sample containers 中“To minimize possible impacts on the sample during transportation it is recommended to fill the containers completely. Problems related to partial filling can include: 1) enhanced agitation during transport, leading to breakdown of aggregated particles, 2) interaction with gas phase, leading to stripping, 3) oxidation of substances, leading e.g. to precipitation of heavy metals.”——在运输过程中为尽量减少对样品的影响，建议满瓶采样。非满瓶采样所存在的问题：1) 在运输过程中样品的扰动会增强，破坏原有颗粒的形态；2) 水样与采样容器中的空气相互作用，导致样品中污染物的损失；3) 物质的氧化，导致例如重金属的沉淀。因此，我们要求采样时，“水样沿瓶壁缓慢转入采样瓶中，水样与瓶塞之间不留空隙，满瓶密封。”

ISO 5667-16-2017 “Water quality Sampling Part 16: Guidance on biotesting of samples” 中 6.6 第三段 “A cooling temperature during transport of 2 °C to 8 °C has been found suitable for many applications.”——运输期间通常采用 2~8 °C 保存水样。7.2 第三段 “Freeze down water samples to ≤ -18 °C as soon as possible after sampling if it is not possible to start performance of the test within 48 h. The time required for freezing and thawing should be minimized by reducing the sample volume, i.e. the size of the sample container. In general, it is appropriate to use one-litre containers for freezing (filled with max. 0.5 L to 0.7 L of sample). For tests requiring larger volumes, the sample should be homogenized and split into sub-samples. A storage period of up to two months is best practice as maximum storage period for most biotests.”——如果不能在 48 小时内开始试验，则应尽快将样品于-18 °C 下冻结。通过减少样品体积，即样品

容器的大小，可以将冻结和解冻所需的时间减至最小。一般来说，使用一升容器冷冻（注入最多 0.5~0.7 L 的样品）是合适的。需要更多水样测试时，样品应被均匀化并分成若干子样。对大多数生物试验来说，最长的样品贮存期以两个月为最佳。

5.7.2 样品预处理

1) 温度

低于-18 °C 保存的水样，需先在不大于 25 °C 水浴轻微振荡解冻，或在 2~8 °C 冷藏过夜解冻。受试水样在试验开始前，放置于恒温培养箱或恒温室（标准文本 7.6）中，26 °C±1 °C 恒温避光平衡至恒温后用于试验。

ISO 5667-16-2017 “Water quality Sampling Part 16: Guidance on biotesting of samples” 中 7.3 Thawing “Samples stored frozen are thawed on the day of testing shortly before use. A warm water bath at a temperature not exceeding 25 °C, together with gentle shaking, are recommended to avoid local overheating. Alternatively, the sample can be thawed in the dark at a temperature between 2 °C and 8 °C overnight.” ——冷冻储存的样品在使用前需尽快解冻，建议在不大于 25 °C 的温水浴中，轻轻摇晃，以避免局部过热。另外，样品可以在避光及 2~8 °C 的温度下过夜解冻。

2) pH 值

按照 GB/T 6920 方法测定水样 pH 值。当 pH<6.5 或 >8.5 时，使用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节水样 pH 值至 6.5~8.5，尽量少用酸碱调节液，以减少对水样浓度的影响。测定并记录调节后的水样 pH 值，按后续步骤进行水样测定。

OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” 中对 pH 值的规定 “The pH should be in a range between pH 6.5 and 8.5, and not vary within this range by more than 1.5 units during the course of the test. If the pH is not expected to remain in this range, then pH adjustment should be done prior to initiating the test. The pH adjustment should be made in such away that the stock solution concentration is not changed to any significant extent and that no chemical reaction or precipitation of the test chemical is caused.” ——pH 应在 6.5~8.5 之间，在整个测试过程中，其波动不能超过 1.5。在测试前，应调节 pH 至此范围。pH 的调节不能改变原溶液浓度，且不能引起试验化学品的化学反应或者沉淀。GB 11607-89 《渔业水质标准》要求淡水 pH 值为 6.5~8.5。ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.3 Test procedure “Make sure that the volume of the acid or base required for neutralisation is as small as possible.” ——pH 值调节时所用酸或碱的体积尽可能小。

当 pH 值的影响需要反映在试验结果中或者调节 pH 值会引起水样物理变性或化学反应

时，则不调节水样 pH 按后续步骤进行水样测定。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.3 Test procedure “Neutralization should be omitted if the effect of the pH is to be reflected in the test result or if physical modification or chemicals reactions (e.g. precipitation) are observed due to pH adjustment.”——当 pH 值的影响需要反映在试验结果中或者调节 pH 值会引起水样物理变性或化学反应（例如沉淀）时，则不调节水样 pH 按后续步骤进行水样测定。

根据水样测定的实际需求，也可对调节前、后的水样同时开展试验比较。

ISO 11348-3-2007 “Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria” 中 7.2 要求对 pH 调节前、后水样均进行相应毒性的测定。因此，本标准文本增加“根据水样测定的实际需求，也可对调节前、后的水样同时开展试验比较”的内容。

3) 溶解氧

按照 HJ 506 方法测定水样溶解氧浓度，确保用于暴露试验步骤中的每个稀释水样中初始溶解氧浓度不低于 4 mg/L（大约 50%饱和度）。若要充氧，溶解氧浓度不超过相应饱和溶解氧值。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中 8.3 “Ensure that O₂ concentration does not fall below 4 mg/L O₂ (about 50% saturation) in each dilution. If aeration is necessary, the O₂ concentration should not exceed the corresponding saturation value.” ——应确保每一个稀释后的水样中溶解氧浓度不低于 4 mg/L(大约 50%饱和度)。若要充氧，溶解氧浓度不能超过相应的饱和溶解氧值。

文献“Effects of Hypoxia on the Physiology of Zebrafish (*Danio rerio*): Initial Responses, Acclimation and Recovery (Bulletin of Environment Contamination&Toxicology, 2016, 96(1): 43-48)”报道斑马鱼可以适应 3 mg/L 的溶解氧，为此我们进行了溶解氧浓度不低于 4 mg/L 实际样品溶解氧衰减及斑马鱼卵适应性的试验，结果见表 7。在 26 °C±1 °C 的条件下，溶解氧 4 mg/L 以上的样品经 48 h 后一般衰减不会低于 3 mg/L。清潭污水处理厂来水为生活污水，一般无工业类有毒物质，鱼卵在满足上述条件的这类废水中能正常生长，成活率≥90%。标准中要求样品溶解氧不低于 4 mg/L 是可行的。

表 7 水样溶解氧衰减及斑马鱼卵适应性试验结果

样品来源	漕桥污水处理厂出水	横林镇北污水处理厂出水	清潭污水处理厂进水		
被测样品初始溶解氧含量 mg/L	5.34	5.76	4.76	4.50	4.25
24 h 溶解氧含量 mg/L	4.93	4.65	3.53	3.38	3.90
48 h 溶解氧含量 mg/L	4.37	4.28	3.30	3.16	3.44
48 h 毒性试验鱼卵存活率 (%)	未开展试验		100%	90%	100%

5.7.3 样品稀释

按试验需要选择稀释水样。

测定 LID 时，选择连续的 4~5 个稀释倍数水样（当鱼卵存活率与水样浓度的大致对应关系已知时，例如已做预实验，可选择连续的 2~3 个稀释倍数水样），保证最高稀释倍数水样鱼卵存活率≥90%、最低稀释倍数水样鱼卵存活率尽可能<90%。

测定 LC₅₀ 时，按一定的稀释比（例如 2，或者<2 并接近 2 的一个数）选择 5 个连续的稀释倍数水样，保证最高稀释倍数水样鱼卵存活率=100%或与之接近、最低稀释倍数水样鱼卵存活率=0 或与之接近。

实际测定时，鱼卵存活率与水样浓度对应的情况往往是未知的，很难达到上述理想的状况，有时甚至有很大的偏离，这就要求进行预试验，以确定鱼卵存活率与水样浓度大致的对应范围（即鱼卵存活率 100%及 0 与水样浓度间大致对应的范围），这时，取稀释比=10，选择 5 个连续稀释倍数的水样，每一浓度以 5 粒鱼卵按 9.3~9.6 部分的操作要求进行相应的预试验。

按表 8 或根据实际需要配制选择的稀释水样。

表 8 水样的稀释

稀释倍数 D	样品的体积分数 %	形成的稀释水样	稀释水样的形成 (ml)		
			所需标准稀释水	所需水样	所得稀释水体积
1	100.00	1 倍稀释水样（即原水样）	0	原水样 200	200
2	50.00	2 倍稀释水样	100	原水样 100	200
3	33.00	3 倍稀释水样	140	原水样 70	210
4	25.00	4 倍稀释水样	100	2 倍稀释水样 100	200
6	16.70	6 倍稀释水样	100	3 倍稀释水样 100	200
8	12.50	8 倍稀释水样	100	4 倍稀释水样 100	200
12	8.30	12 倍稀释水样	100	6 倍稀释水样 100	200
16	6.20	16 倍稀释水样	100	8 倍稀释水样 100	200
24	4.20	24 倍稀释水样	100	12 倍稀释水样 100	200
32	3.10	32 倍稀释水样	100	16 倍稀释水样 100	200
...

5.8 分析步骤

5.8.1 配种

在收集鱼卵进行试验的前一天傍晚，将洗净晾干后的产卵盒内缸套入外缸，插入隔板，加入约 2/3 缸标准稀释水，选取体长及鱼龄相当、性发育特征明显、健康活跃的雌雄种鱼，在左右两个隔间中分别加入 1 尾雌鱼和 2 尾雄鱼，盖上盖板，于恒温培养箱或恒温室中 $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光放置过夜。

按以上步骤至少进行 3 组种鱼的配种、产卵。

OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” 16 Egg production “To avoid genetic bias, eggs are collected from a minimum of three breeding groups, mixed and randomly selected.”——为避免遗传偏差，鱼卵应从最少 3 个育种组中收集，混合，然后随机选择。

5.8.2 产卵及鱼卵初筛

次日光照开始后，打开产卵盒盖板，提取内缸，弃去外缸内的水后再放回内缸，沿内缸壁小心加入标准稀释水，以水面没过种鱼少许为宜，避免伤害种鱼。抽开隔板，让雌雄种鱼交配产卵，30 min 后检查各缸种鱼产卵情况，分别收集已产卵各缸内相应鱼卵，用标准稀释水冲洗至结晶皿中，在恒温培养箱或恒温室中静置 45 min 后，结晶皿以黑底相衬，侧面加以灯光观察，每个结晶皿中随机选取鱼卵 20 粒按照标准文本附录 D.1 的方法识别受精鱼卵，避免伤害鱼卵。统计每尾雌鱼所产鱼卵的受精率，至少选取 3 尾受精率 $\geq 70\%$ 的鱼卵混合备用。

上述换水过程主要目的：1) 一夜过后种鱼所产粪便对水质及产卵场所已有污染，需清理更新，同时种鱼产卵也需新鲜水的刺激；2) 为增加鱼卵受精的几率，需减少种鱼产卵场所的水量，应重新换水配置。

1) 未受精鱼卵肉眼的鉴别

肉眼下，“发白、不透明、空壳”的鱼卵为未受精卵，如图 5 所示。



未受精鱼卵



正常鱼卵

图 5 未受精卵肉眼鉴别

2) 受精鱼卵显微镜的鉴别

转移至结晶皿并静置 45 min 后的鱼卵显微镜下受精情况鉴别如下图。

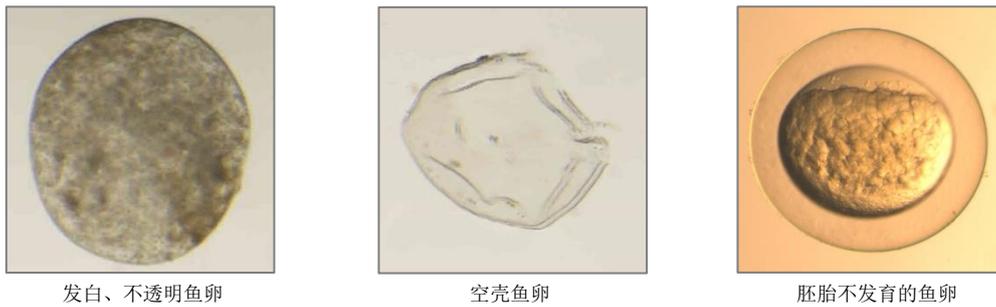
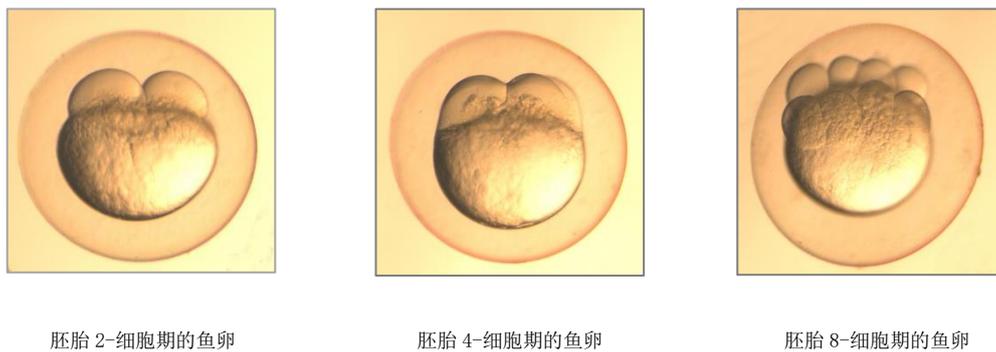


图 6 未受精卵显微镜鉴别



注：进入胚胎发育卵裂期的鱼卵为受精卵，以上为典型者。

图 7 受精卵显微镜鉴别

斑马鱼种鱼交配产卵到鱼卵静置 45 min，鱼卵产出的最长时间为 75 min，最短时间为 45 min，根据美国俄勒冈大学神经生物学院 CHARLES B. KIMMEL 等所著《斑马鱼胚胎发育的分期》，若鱼卵为受精卵，此时镜检鱼卵，应显示为胚胎发育卵裂期中的 2-细胞期~8-细胞期。

5.8.3 暴露试验

将部分配制好的不同浓度的稀释水样按图 8 设置的试验布局加至 24 孔细胞培养板，每孔 2 ml。

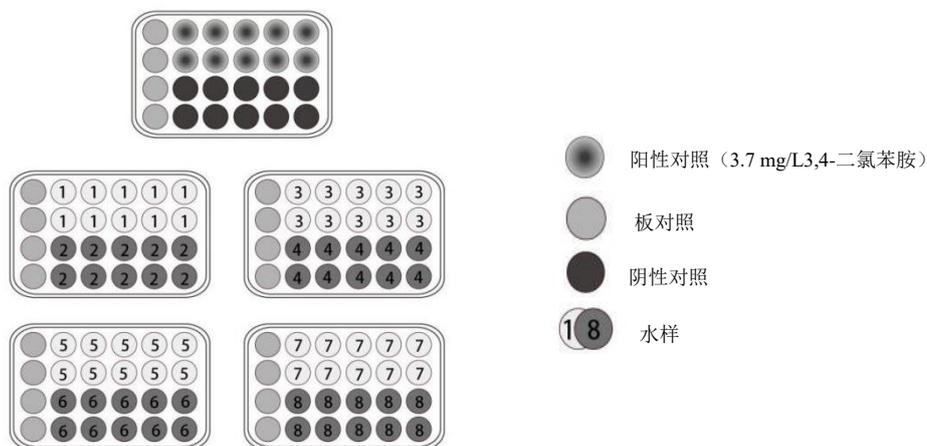


图 8 24 孔细胞培养板试验布局设置方案

上述稀释水样各取 60~70 ml 于不同的培养皿中，用塑料滴管在备用鱼卵中各取圆润、饱满、完整的 20 粒加入上述培养皿中，将各培养皿在倒置显微镜或体视显微镜下逐一进行观察，选取 4-细胞期至 128-细胞期的受精卵，去除在细胞分裂时有明显异常（不对称或有囊泡）或者卵膜损伤的鱼卵。在已加入水样的 24 孔细胞培养板对应孔中各加入 1 粒受精卵，盖上盖板。

根据 ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 8.2.2 Differentiation of eggs “Use only fertilized eggs from the 4-cell stage to the 128-cell stage for the test. Separate and reject eggs with conspicuous anomalies in cell division (asymmetries, vesicles) or damaged membranes.” ——使用 4-细胞期到 128-细胞期的受精卵进行试验。去除在细胞分裂时有明显异常（不对称或有囊泡）或者卵膜损伤的鱼卵。

以上操作过程应在标准文本 9.2 部分鱼卵静置 45 min 后 60 min 内完成。

按上述时间进程，鱼卵产出的最长时间为 135 min，最短时间不少于 60 min（鱼卵静置 45 min 后受精卵检测及统计、受精卵的挑选等过程所花时间至少为 15 min，加上鱼卵静置的 45 min 为 60 min），根据美国俄勒冈大学神经生物学院 CHARLES B. KIMMEL 等所著《斑马鱼胚胎发育的分期》，斑马鱼卵胚胎发育最快处于 128-细胞期，最慢处于 4-细胞期。时间设置符合选取 4~128-细胞期鱼卵的要求。

将上述 24 孔细胞培养板于恒温培养箱或恒温室中，按标准文本附录 B 的水温和光照条件进行 48 h 暴露试验。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 和 OECD 236 “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” 均要求暴露试验时水温和光照条件与种鱼驯养繁殖时的一致，即：水温 $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，光照每天 16 h /8 h 或 12 h /12 h 的光/暗周期，光照强度 540~1080 lux。

5.8.4 鱼卵镜检

以卵凝结、体节未形成、尾部未分离及无心跳为测试终点，将上述暴露试验的 24 孔细胞培养板置于倒置显微镜或体视显微镜下按表 9 要求进行鱼卵镜检。

鱼卵暴露 48 h 后，出现任一测试终点情况则判定鱼卵死亡，统计每一稀释水样鱼卵的存活率和死亡率。

表 9 鱼卵镜检观测要求

测试终点		卵凝结	体节未形成	尾部未分离	无心跳
观测方式		显微镜或肉眼	显微镜	显微镜	显微镜
观测时间	暴露 24 h	+	+	+	-
	暴露 48 h	+	+	+	+
备注		“+”表示观测、判断并记录，“-”表示无需此观测。			

5.8.5 测试终点判定

1) 卵凝结

凝结的鱼卵和正常鱼卵的状况见图 9。凝结的鱼卵显微镜下内含物完全不透明，质地较硬。在肉眼观察下凝结的鱼卵呈不透明及灰暗的状态。

2) 体节未形成

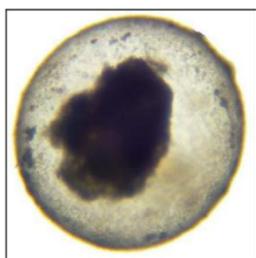
鱼卵卵黄囊外侧胚胎中后部，无体节者为体节未形成。体节未形成及体节已形成的鱼卵见图 9。

3) 尾部未分离

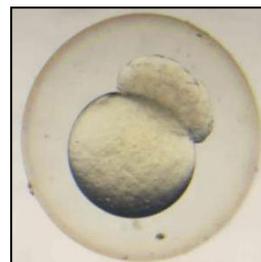
正常发育的鱼卵，胚胎的尾部会伸长，与卵黄囊相分离。若无，则表明尾部未分离。若 48 h 后，胚胎尾部分离程度与 24 h 时相比未有明显变化，同样也判定为尾部未分离。尾部未分离和尾部分离的鱼卵见图 9。

4) 无心跳

斑马鱼卵胚胎心脏位于卵黄囊与胚胎头部间(见图 9)，观察该区域是否有节律的震动，若无，则表明无心跳。



凝结的鱼卵

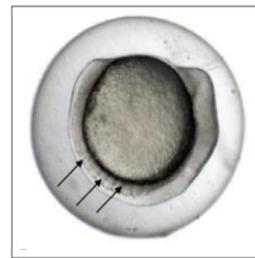


正常的鱼卵

鱼卵凝结鉴别

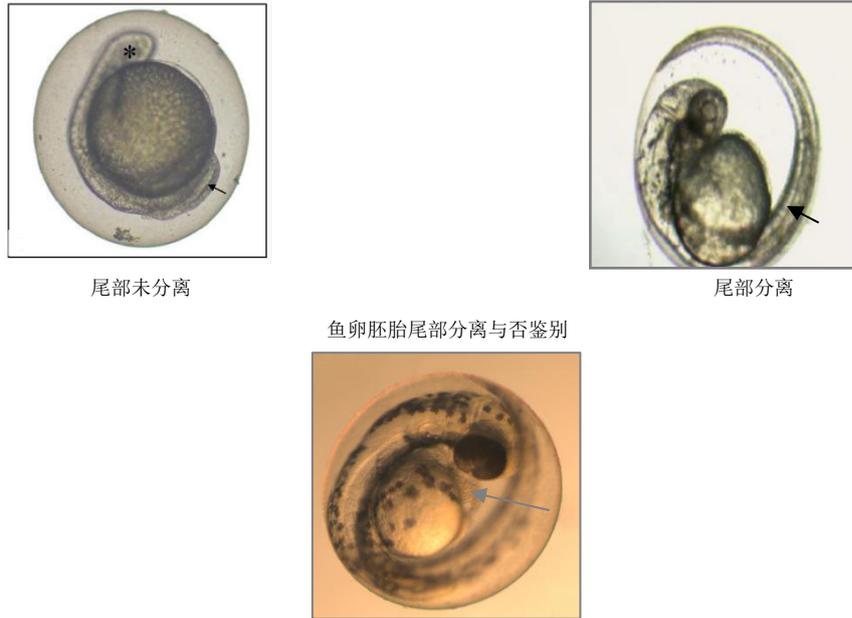


体节未形成



体节已形成

鱼卵胚胎体节形成与否鉴别



注：图中箭头所指为斑马鱼心脏所在位置，若未观察到该处有节律的震动，则表明无心跳。
鱼卵胚胎有无心跳鉴别

图9 斑马鱼卵测试终点判定

5.8.6 对照试验

1) 板对照

以标准稀释水为水样进行板对照试验。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中 8.3 Test procedure 要求 “Use the remaining four wells on this microplate for microplate control, placing one fertilized egg per well and filling with dilution water.” ——使用微孔板上剩下的四个孔做微孔板对照，每一个孔放一个受精卵并加入稀释水。

2) 阴性对照

以标准稀释水为水样进行阴性对照试验。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中 8.3 Test procedure 要求 “In the same way, prepare a negative dilution water control consisting of at least 10 fertilized eggs” ——以同样的方式，制备由至少 10 个受精卵组成的稀释水对照。

3) 阳性对照

以 3,4-二氯苯胺工作液为水样进行阳性对照试验。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 中 8.3 Test procedure 要求 “With each dilution series, measure a positive control with 3.7 mg/l of reference substance 3,4-dichloroaniline, also consisting of at least 10 fertilized eggs.” ——在每一个稀释系列中，使用 3.7 mg/L 的 3,4-二氯苯胺做一个阳性对照，同样也由至少 10 个受精卵组成。

5.9 结果计算与表示

鱼卵存活率在 90% 及以上的最低稀释倍数，即为最低无效应稀释倍数 LID。LID 的结果应为整数，如 LID=2。

水样 LC₅₀ 按保准文本附录 G 方法计算。

当水样毒性较大时，往往需要计算 LC₅₀ 及其 95% 置信限，可将水样按等比级数进行分组，每组以相同的鱼卵数进行试验，48 h 后统计各稀释浓度水样鱼卵的死亡数，参考国家环保局编制的《水生生物监测手册》第四章水生生物监测统计方法中第十节急性毒性试验统计方法平均致死量法（寇氏法）进行计算。

寇氏法计算 LC₅₀ 要满足下列条件：

- 1) 每个稀释水样浓度实验组的动物数要相同；
- 2) 各实验组稀释水样浓度要按等比级数分组；
- 3) 稀释水样最大浓度的死亡率最好为 100% 或与之接近，稀释水样最小浓度的死亡率最好为 0% 或与之接近。

5.9.1 LC₅₀ 计算

公式如下：

$$\lg LC_{50} = X_k - d \left(\sum_{i=m}^u p_i - \frac{3 - p_m - p_u}{4} \right) \quad (1)$$

式中：X_k 为参与计算的稀释水样最大浓度的对数值；

d 为稀释水样相邻浓度比值的对数或相邻两组浓度的对数差；

p_i 为参与计算各稀释水样浓度组的死亡率（以小数表示）；

p_m 为参与计算的最大稀释水样浓度组的死亡率（以小数表示），P_m ≤ 1，当试验数据中最高浓度组及其相邻的多个高浓度组的死亡率等于 1 时，仅以其中最小浓度者参与计算；

p_u 为参与计算的最小稀释水样浓度组的死亡率（以小数表示），P_u ≥ 0，当试验数据中最低浓度组及其相邻的多个低浓度组的死亡率等于 0 时，仅以其中最大浓度者参与计算。

案例：某工业废水对斑马鱼卵 48 h 急性毒性试验数据如表 10 所示，求 48 h LC₅₀。

表 10 斑马鱼卵急性毒性试验数据

废水稀释水样浓度 (体积百分比) (%)	稀释水样各浓度组 实验鱼卵数 (个)	死亡数 (个)	死亡率 (%)
10.0	10	10	100
7.5	10	10	100
5.6	10	9	90
4.2	10	4	40
3.2	10	1	10

解：

$$X_k = \lg 7.5 = 0.8751$$

$$d = \lg \frac{7.5}{5.6} = 0.1269 \quad \text{或} \quad d = \lg 7.5 - \lg 5.6 = 0.1269$$

$$\sum_{i=m}^u p_i = 1.0 + 0.9 + 0.4 + 0.1 = 2.4$$

代入公式 (1)，得

$$\begin{aligned} \lg LC_{50} &= 0.8751 - 0.1269 \times \left(2.4 - \frac{3 - 1.0 - 0.1}{4} \right) \\ &= 0.6308 \end{aligned}$$

$$48 \text{ h } LC_{50} = 4.3\%$$

5.9.2 LC₅₀ 95% 置信限

公式如下：

$$S \lg LC_{50} = d \sqrt{\sum_{i=m}^u \frac{p_i q_i}{n}} \quad (2)$$

lgLC₅₀ 的 95% 置信区间为：lgLC₅₀ ± 1.96 × S lgLC₅₀

式中除上面提到的外：

S lgLC₅₀ 为 lgLC₅₀ 的标准误；

q_i = 1 - p_i；

n 为稀释水样各浓度组实验鱼卵数，个。

案例：

$$\begin{aligned} S \lg LC_{50} &= 0.1269 \sqrt{\frac{1.0 \times 0 + 0.9 \times 0.1 + 0.4 \times 0.6 + 0.1 \times 0.9}{10}} \\ &= 0.0260 \end{aligned}$$

$$\lg LC_{50} = 0.6308 \pm 1.96 \times 0.0260$$

$$= 0.6308 \pm 0.0510$$

$$= 0.5798 \sim 0.6818$$

48 h LC₅₀ 的 95% 置信区间为 3.8%~4.8%。

5.10 质量保证和质量控制

5.10.1 对照试验

5.10.1.1 板对照

培养 48 h 后，板对照组鱼卵不得死亡，否则相应 24 孔细胞培养板所对应的数据无效。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 11 Determination of LIDegg中要求 “Normally, mortality in microplate controls does not occur (< 0.1 %). If so, plausibility has to be checked. In case of doubt, the microplate is excluded from the evaluation of the test result.” ——正常情况下，微孔板对照的死亡率不会发生 (<0.1%)。如果发生，很有可能是事先未对微孔板进行检查。如有疑问，则该微孔板应该在试验结果的评价中排除。

5.10.1.2 阴性对照及阳性对照

阴性对照及阳性对照结果符合下列要求，试验结果方为有效。否则，查明原因后重新进行试验。

1) 阴性对照

培养 48 h 后，阴性对照组鱼卵存活率 $\geq 90\%$ 。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 10 Validity criteria中的要求 “The test is valid if- at least 90% of the embryos in the negative dilution water control survive after the 48 h incubation time” ——试验在以下条件下是有效的：——阴性稀释水对照中至少90%的胚胎在48 h孵化后存活

2) 阳性对照

培养 48 h 后，阳性对照组鱼卵死亡率 $> 10\%$ 。

ISO 15088-2007 “Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)” 10 Validity criteria “The test is valid if- the results of the positive control are within the defined range (3.7 mg/l of reference substance should cause an effect > 10 %)” ——试验在以下条件下是有效的：——阳性对照结果在范围内（3.7 mg/L的对照物质导致10%以上的影响）。

5.10.2 试验报告

试验报告要求包括但不限于以下几个信息：

- 1) 样品的名称、性质、来源、保存方法及保存时间；
- 2) 试验前样品的 pH 值、溶解氧浓度及前处理方法；
- 3) 试验环境条件，试验用稀释水的性质，如水温、溶解氧等情况；
- 4) 板对照、阴性对照和阳性对照试验是否符合质量控制规定的要求；
- 5) 试验结果报告。

斑马鱼卵急性毒性试验记录和斑马鱼卵暴露试验镜检结果记录表格式见表 11 和表 12。

表 11 斑马鱼卵急性毒性试验记录表

样品类别	<input type="checkbox"/> 生活污水 <input type="checkbox"/> 工业废水 <input type="checkbox"/> 地表水 <input type="checkbox"/> 地下水					
采样时间	_____年____月____日					
试验时间	_____年____月____日____:____至_____年____月____日____:____					
仪器名称及型号			仪器编号			
分析方法名称及编号						
样品 pH 值 (无量纲)		是否需调节	<input type="checkbox"/> 是		调节后样品 pH 值 (无量纲)	
			<input type="checkbox"/> 否			
样品溶解氧浓度 (mg/L)		稀释水溶解氧浓度 (mg/L)		3,4-二氯苯胺工作液溶解氧浓度 (mg/L)		
样品温度 (°C)		稀释水温度 (°C)		3,4-二氯苯胺工作液温度 (°C)		
产卵雌鱼编号	1	2	3	...		
产卵量 (粒/尾)						
受精率 (%)						
结果表示	最低无效应稀释度 LID=_____					
	LC ₅₀ =_____, 95%置信区间=_____					
质量保证和质量控制	阴性对照存活率_____%		是否满足质控要求 (存活率≥90%)		<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否
	阳性对照死亡率_____%		是否满足质控要求 (死亡率>10%)		<input type="checkbox"/> 是	<input type="checkbox"/> 否

试验人员_____

复核人员_____

审核人员_____

表 12 斑马鱼卵暴露试验镜检结果记录表

24 孔 细胞 培养 板	水样稀释倍数/ 水样稀释浓度/ 阴、阳性对照	暴露 时间	测试效应 (○卵凝结、△体节未形成、∞尾部未分离、×无心跳)										存活率/ 死亡率 (%)		
			板对照		水样										
1	D= (或水样百分 比浓度或阴、阳 性对照)	24 h	A1		A2		A3		A4		A5		A6		/
			B1		B2		B3		B4		B5		B6		
		48 h	A1		A2		A3		A4		A5		A6		
			B1		B2		B3		B4		B5		B6		
	D= (或水样百分 比浓度或阴、阳 性对照)	24 h	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
			D1		D2		D3		D4		D5		D6		
		48 h	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
			D1		D2		D3		D4		D5		D6		
.....	24 h	A1		A2		A3		A4		A5		A6		
			B1		B2		B3		B4		B5		B6		
		48 h	A1		A2		A3		A4		A5		A6		
			B1		B2		B3		B4		B5		B6		
	24 h	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
			D1		D2		D3		D4		D5		D6		
		48 h	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
			D1		D2		D3		D4		D5		D6		
.....	24 h	A1		A2		A3		A4		A5		A6		
			B1		B2		B3		B4		B5		B6		
		48 h	A1		A2		A3		A4		A5		A6		
			B1		B2		B3		B4		B5		B6		
	24 h	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
			D1		D2		D3		D4		D5		D6		
		48 h	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
			D1		D2		D3		D4		D5		D6		
备注															

试验人员_____

复核人员_____

审核人员_____

5.11 实验室内验证

5.11.1 养殖水和稀释水验证

对养殖水和稀释水进行了实验室内验证，斑马鱼卵的存活率结果见表 13。满足阴性对照鱼卵存活率 $\geq 90\%$ 的要求。

表 13 养殖水和稀释水验证结果（鱼卵存活率）

样品类别	平行号 X						\bar{x}_i	S_i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
养殖水	90%	100%	100%	90%	100%	100%	97%	0.05	5.34%
稀释水	100%	100%	90%	100%	100%	100%	98%	0.04	4.15%

5.11.2 参比物质验证

对参比物质 3.7 mg/L 的 3,4-二氯苯胺工作液进行了实验室内的验证，鱼卵死亡率结果如表 14，满足阳性对照鱼卵死亡率 $> 10\%$ 的要求。

表 14 阳性物质验证结果（鱼卵死亡率）

样品类别	平行号 X						\bar{x}_i	S_i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺	40%	50%	40%	40%	50%	60%	47%	0.07	15.97%

5.11.3 实际水样验证

对应急水样（湟里河）、生活污水处理前和处理后水样（常州市深水城北污水处理有限公司）、工业废水处理前和处理后水样（常州市武进双惠环境工程有限公司）等实际水样进行斑马鱼鱼卵急性毒性的验证，结果见表 15。

表 15 实际水样验证结果（鱼卵存活率）

样品类别	试验次数	稀释倍数	存活率			LID
			\bar{x}_i	S_i	RSD _i	
湟里河应急水样	6	D=1	93%	0.05	5.53%	1
		D=2	92%	0.04	4.45%	
		D=3	98%	0.04	4.15%	
		D=4	100%	0	0%	
		D=5	100%	0	0%	
生活污水处理前水样	6	D=2	0%	0	0%	5
		D=3	0%	0	0%	
		D=4	20%	0.11	54.77%	
		D=5	95%	0.05	5.77%	

生活污水 处理后水样	6	D=1	78%	0.04	5.21%	2
		D=2	95%	0.05	5.77%	
		D=3	98%	0.04	4.15%	
		D=4	100%	0	0%	
工业废水 处理前水样	6	D=2	2%	0.04	244.95%	8
		D=4	25%	0.05	21.91%	
		D=6	72%	0.10	13.72%	
		D=8	93%	0.05	5.53%	
工业废水 处理后水样	6	D=1	50%	0.09	17.89%	4
		D=2	73%	0.05	7.04%	
		D=3	78%	0.04	5.21%	
		D=4	93%	0.05	5.53%	

5.11.4 食品接触材料（外卖盒）浸提液样品验证

对食品接触材料（外卖盒）浸提液样品进行斑马鱼鱼卵急性毒性的验证，结果见表 16。

表 16 食品接触材料（外卖盒）浸提液样品验证结果（鱼卵存活率）

样品类别	试验次数	稀释倍数	存活率			LID
			\bar{x}_i	S_i	RSD _i	
食品接触材料 （外卖盒）浸 提液样品	6	D=1	87%	0.05	5.96%	3
		D=2	87%	0.05	5.96%	
		D=3	95%	0.05	5.77%	
		D=4	97%	0.05	5.34%	

5.11.5 三种化学品样品验证

对三种化学品样品（重铬酸钾、3,4-二氯苯胺和七水合硫酸锌）进行斑马鱼鱼卵急性毒性的验证，结果见表 17。

表 17 三种化学品样品验证结果

样品类别	试验次数	浓度 (mg/L)	死亡率			平均 LC ₅₀ (mg/L)	95%置信区间 (mg/L)
			\bar{x}_i	S_i	RSD _i		
重铬酸钾	6	1898	100%	0	0%	561.9	418.9~733.4
		1266	88%	0.10	11.13%		
		844.8	77%	0.08	10.65%		
		562.5	45%	0.05	12.17%		
		375.0	25%	0.08	33.47%		
		250.0	12%	0.04	34.99%		
		0	2%	0.04	244.95%		
3,4-二 氯苯胺	6	6.27	100%	0.00	0%	3.06	2.60~3.61
		4.83	83%	0.05	6.20%		
		3.71	47%	0.08	17.50%		
		2.86	35%	0.05	15.65%		
		2.20	28%	0.08	26.57%		

3,4-二 氯苯胺	6	1.69	23%	0.08	34.99%		
		1.30	7%	0.05	77.46%		
		0	0%	0.00	0%		
七水合 硫酸锌	6	1207	97%	0.05	5.34%	208.6	141.5~302.5
		709.9	87%	0.05	5.96%		
		417.6	85%	0.05	6.44%		
		245.7	53%	0.05	9.68%		
		144.5	35%	0.05	15.65%		
		85.00	15%	0.05	36.51%		
		50.00	7%	0.05	77.46%		
		0	0%	0.00	0%		

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 验证单位及参加验证人员情况

共有六家单位参加了方法验证工作，验证单位及参与验证人员相关信息见表 18。

表 18 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职务或职称	从事分析工作 年限（年）	单位名称
张瑜	助理研究员	4 年	中国环境科学研究院
刘娜	助理研究员	3 年	中国环境监测总站
吴晟旻	副研究员	7 年	环境保护部南京环境科学研究所
巩杨	研究实习员	3 年	环境保护部南京环境科学研究所
周胜利	高级工程师	8 年	浙江省环境监测中心
魏铮	工程师	10 年	浙江省环境监测中心
王彦华	副研究员	10 年	浙江省农业科学院农产品质量标准研究所
谢显传	副教授	15 年	江苏国创环保科技有限公司
王伟莉	工程师	6 年	江苏国创环保科技有限公司

6.1.2 方法验证方案

按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，组织六家以上有资质的实验室进行验证。工作主要内容是方法精密度及有效性的验证试验。

实施方法验证前，编制组根据初步制订好的标准文本设计了实验作业指导书和验证方案并进行专家论证，联系并分发实验作业指导书及验证方案至参加验证的六家实验室，确定具有生物监测上岗资质的技术人员，具备检定有效期内的相关仪器设备，提前采购并配置好所需试剂，协调验证试验同步开始的时间。

精密度的验证：标准编制组分别将生活污水（常州市深水城北污水处理有限公司）处理出水、工业废水（常州市武进双惠环境工程有限公司）处理出水和高、中、低三个浓度的参比物质溶液（分别为 6.3 mg/L 3,4-二氯苯胺、3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺和 1.3 mg/L 3,4-二氯苯胺）分配到各验证实验室，各验证实验室进行最低无效应稀释倍数 LID（或 LC₅₀）的测定，同时各实验室对自制的标准稀释水进行鱼卵存活率的测定，以上样品均平行测定 6 次，分别计算不同验证样品的平均存活率（或死亡率、LC₅₀）、标准偏差、相对标准偏差。

有效性的验证：将 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺工作液分配到各验证实验室，同时各实验室自制标准稀释水，每个实验室分别对上述两种水样进行鱼卵死亡率和存活率的测定，各实验室均平行测定 6 次，分别计算两种验证样品的死亡率和存活率，检验其是否符合 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺工作液鱼卵死亡率 > 10%、标准稀释水鱼卵存活率 ≥ 90% 的质控要求。

编制组最终将《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，得出验证报告，见附件一。

6.2 方法验证过程

通过筛选确定方法验证单位。按照方法验证方案准备试验用品，与验证单位确定验证时间。在方法验证前，参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

6.2.1 方法的精密度

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证，使用阴性对照水样（标准稀释水）进行测定，测定 6 次。结果见表 19。表中 1：中国环境科学研究院环境分析测试技术中心；2：中国环境监测总站；3：生态环境部南京环境科学研究所；4：浙江省环境监测中心；5：浙江省农业科学院农产品质量标准研究所；6：江苏国创环保科技有限公司。

表 19 阴性对照水样（标准稀释水）精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	\bar{x}_i	S_i	RSD _i
1	100%	0.00	0%
2	97%	0.05	5.3%
3	97%	0.05	5.3%
4	97%	0.05	5.3%
5	98%	0.04	4.2%
6	95%	0.05	5.8%
$\bar{\bar{x}}_i$	97.2%		
S^*	0.02		
RSD [*]	1.8%		

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证，使用生活污水（常

州市深水城北污水处理有限公司) 处理出水进行测定, 测定 6 次。结果见表 20。

表 20 生活污水处理出水精密度验证数据汇总表 (鱼卵存活率)

实验室号	D=1			D=2		
	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i
1	85%	0.05	6.4%	93%	0.05	5.5%
2	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
3	85%	0.05	6.4%	93%	0.05	5.5%
4	83%	0.05	6.2%	97%	0.05	5.3%
5	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
6	87%	0.05	6.0%	93%	0.05	5.5%
$\bar{\bar{x}}_i$	85.6%			95.0%		
S'	0.01			0.02		
RSD'	1.6%			1.9%		
r	15%			15%		
R	14%			14%		
LID	六家实验室进行 6 次测定, 共获得 36 个 LID 值, 均为 2					

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证, 使用工业废水 (常州市武进双惠环境工程有限公司) 处理出水进行测定, 测定 6 次。结果见表 21。

表 21 工业废水处理出水精密度验证数据汇总表 (鱼卵存活率)

实验室号	工业废水 (D=稀释倍数)											
	D=1			D=2			D=3			D=4		
	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i
1	62%	0.08	12.2%	80%	0.06	7.9%	87%	0.05	6.0%	93%	0.05	5.5%
2	62%	0.08	12.2%	82%	0.08	9.2%	88%	0.04	4.6%	95%	0.05	5.8%
3	63%	0.05	8.2%	83%	0.05	6.2%	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
4	57%	0.05	9.1%	78%	0.08	9.6%	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
5	65%	0.05	8.4%	83%	0.05	6.2%	88%	0.08	8.5%	95%	0.05	5.8%
6	65%	0.05	8.4%	83%	0.05	6.2%	88%	0.04	4.6%	97%	0.05	5.3%
$\bar{\bar{x}}_i$	62.2%			81.7%			87.5%			95.6%		
S'	0.03			0.02			0.01			0.01		
RSD'	5.0%			2.6%			1.0%			1.4%		
r	17%			18%			15%			15%		
R	18%			17%			14%			14%		
LID	六家实验室进行 6 次测定, 共获得 36 个 LID 值, 均为 4											

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证, 使用高、中、低 3

种浓度 3,4-二氯苯胺溶液进行测定，测定 6 次。结果见表 22。

表 22 3 种 3,4-二氯苯胺样品精密度验证数据汇总表（鱼卵存活率）

实验室号	6.3 mg/L 3,4-二氯苯胺鱼卵死亡率			3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺 鱼卵存活率			1.3 mg/L 3,4-二氯苯胺鱼卵存活率			3,4-二氯苯胺 LC ₅₀ (mg/L)		
	\bar{x}_i	S _i	RSD _i	\bar{x}_i	S _i	RSD _i	\bar{x}_i	S _i	RSD _i	\bar{x}_i	S _i	RSD _i
1	100%	0	0%	47%	0.05	11.1%	92%	0.04	4.5%	3.13	0.29	0.09
2	97%	0.05	5.3%	52%	0.08	14.6%	93%	0.05	5.5%	3.38	0.40	0.12
3	98%	0.04	4.2%	37%	0.05	14.1%	87%	0.05	6.0%	2.70	0.17	0.06
4	98%	0.04	4.2%	45%	0.05	12.2%	93%	0.05	5.5%	3.20	0.33	0.10
5	97%	0.05	5.3%	42%	0.08	18.1%	88%	0.08	8.5%	2.95	0.38	0.13
6	100%	0	0%	53%	0.05	9.7%	95%	0.05	5.8%	3.48	0.34	0.10
$\bar{\bar{x}}_i$	98.3%			45.8%			91.4%			3.1		
S'	0.01			0.06			0.03			0.29		
RSD'	1.5%			13.6%			3.5%			9.12%		
r	11%			17%			16%			0.9		
R	11%			23%			17%			1.2		

六家实验室分别对阴性对照水样（6.2.16 标准稀释水）， $\rho=1.3$ mg/L（低浓度）、 $\rho=3.7$ mg/L（中浓度）自制 3,4-二氯苯胺参比物质水样，生活污水（LID=2）D=2 稀释水样和化工废水（LID=4）D=4 稀释水样进行了斑马鱼卵急性毒性鱼卵存活率的测定；对 $\rho=6.3$ mg/L（高浓度）自制 3,4-二氯苯胺参比物质水样进行了斑马鱼卵急性毒性鱼卵死亡率的测定；对阳性参比物质 3,4-二氯苯胺（LC₅₀=3.1 mg/L）进行了斑马鱼卵急性毒性鱼卵死亡 LC₅₀ 的测定。每个实验室各测定 6 次，结果见表 23。

表 23 六家实验室精密度验证结果

	阴性对照水样鱼卵存活率	1.3 mg/L 3,4-二氯苯胺鱼卵存活率	3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺鱼卵存活率	6.3 mg/L 3,4-二氯苯胺鱼卵死亡率	生活污水 D=2 稀释水样鱼卵存活率	化工废水 D=4 稀释水样鱼卵存活率	3,4-二氯苯胺 LC ₅₀
$\bar{\bar{x}}$	97.2%	91.4%	45.8%	98.3%	95.0%	95.6%	3.14 mg/L
RSD _i	0.0%~5.8%	4.5%~8.5%	9.7%~18%	0.0%~5.3%	5.3%~5.5%	5.3%~5.8%	2.9%~13%
RSD'	1.8%	3.5%	14%	1.5%	1.9%	1.4%	7.3%
r	13%	16%	17%	11%	15%	15%	0.9 mg/L
R	13%	17%	23%	11%	14%	14%	1.2 mg/L

$\bar{\bar{x}}$: 六家实验室各水样的平均值
RSD_i: 实验室内相对标准偏差
RSD': 实验室间相对标准偏差
r: 重复性限
R: 再现性限

6.2.2 方法的有效性

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的有效性进行验证,使用标准稀释水阴性对照样品和 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液阳性对照样品进行测定,测定 6 次。结果见表 24,所有阴性对照鱼卵存活率 $\geq 90\%$ 、阳性对照鱼卵死亡率 $> 10\%$,符合质控要求。

表 24 方法有效性及敏感性验证数据表

	实验室号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	范围	结论
标准稀释水 阴性对照 鱼卵存活率	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%~100%	符合 鱼卵 存活率 $\geq 90\%$ 的 要 求
	2	100%	90%	100%	90%	100%	100%	90%~100%	
	3	100%	90%	90%	100%	100%	100%	90%~100%	
	4	90%	100%	100%	90%	100%	100%	90%~100%	
	5	100%	90%	100%	100%	100%	100%	90%~100%	
	6	100%	90%	100%	100%	90%	90%	90%~100%	
3.7 mg/L 3,4-二氯苯 胺溶液阳性 对照鱼卵死 亡率	1	50%	40%	60%	40%	40%	50%	40%~60%	符合 鱼卵 死亡率 $> 10\%$ 的 要 求
	2	40%	50%	50%	60%	60%	50%	40%~60%	
	3	40%	50%	50%	40%	50%	50%	40%~60%	
	4	50%	50%	40%	40%	50%	40%	40%~50%	
	5	50%	50%	60%	40%	40%	50%	40%~60%	
	6	50%	50%	40%	40%	50%	50%	40%~50%	

7 与开题报告的差别说明

经过研究讨论,编制组落实开题论证会及征求意见稿技术审查会专家的意见,明确适用范围为生活污水、工业废水、地表水和地下水,在参考ISO 5667-16-2017的基础上依照HJ/T 91增加样品采样要求和样品前处理的方法,并利用LID作为毒性终点同时也增加LC₅₀计算方法,在实验室间的方法验证时使用3,4-二氯苯胺参比物质和统一的生活污水和工业废水进行验证。

8 标准实施建议

本方法标准对水质急性毒性效应进行测定,可应用于农药、印染、电镀、化工等特定行业的污水排放标准,对污水排放的综合毒性(急性毒性)进行监管。标准《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》的制订是为了满足当前《城镇污水处理厂污染物排放标准》修订的需求,有利于补充完善正在制订的《废水综合毒性评价技术规范》,为有效的保护我国水生态系统和评价我国水生态环境的生态风险具有重要意义。

本标准对监测硬件条件的要求不高,基层环境监测站均可开展此项工作,各级监测站在该项目能力的形成上应更注重人员的培养和管理,积累监测人员的实际操作经验,不断提高

其试验分析能力,控制受试生物的质量,强调阳性、阴性等对照试验的过程控制,确保监测质量,有效服务环境管理。

9 参考文献

- [1] Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*) [S]. ISO 15088, 2007
- [2] Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test[S]. OECD 236, 2013
- [3] 国家环境保护办公厅 关于征求国家环境保护标准《城镇污水处理厂污染物排放标准》(征求意见稿)环办函[2015]1782号
- [4] 环境监测 分析方法标准制修订技术导则 HJ 168-2010
- [5] 《环境科学大辞典》编辑委员会.环境科学大辞典[M].北京: 中国环境科学出版社.1991
- [6] 《环境空气 总烃、甲烷和非甲烷总烃的测定 直接进样-气相色谱法》(HJ 604-2017)
- [7] 环保部科技标准司 《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性致死毒性的测定 静态法》(征求意见稿), 2011.7
- [8] 环保部科技标准司 《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性致死毒性的测定 静态法》(征求意见稿)编制说明, 2011.7
- [9] 任春, 卢延娜, 张虞, 雷晶, 任宁, 周羽化. 综合毒性指标在水污染物排放标准中的应用探讨[J].工业水处理, 2014,34(12):4-7+21.
- [10] 周羽化, 武雪芳. 中国水污染物排放标准 40 余年发展与思考[J].环境污染与防治, 2016,38(09):99-104, 110.
- [11] 余若祯, 穆玉峰, 王海燕, 许秋瑾, 高俊发, 杜丽娜, 孟伟. 排水综合评价中的生物毒性测试技术[J]. 环境科学研究, 2014, 27(04):390-397.
- [12] 邹叶娜, 蔡焕兴, 薛银刚, 徐东炯. 成组生物毒性测试法综合评价典型工业废水毒性[J].生态毒理学报, 2012, 7(4): 381-388.
- [13] 薛银刚, 徐东炯, 曹志俊, 陈桥, 沈丽娟, 张小琼. 利用生物毒性在线监测系统监控和评价排水综合毒性[J]. 环境科技, 2017, 30(03):23-27.
- [14] 邹叶娜, 蔡焕兴, 薛银刚, 徐东炯. 常州市典型工业废水综合急性毒性评估[J].环境科学与管理, 2012, 37(7):167-169.
- [15] 薛银刚. 某化工污水处理厂排水综合生物毒性测试和评价研究[A]. 中国环境科学学会.2014 中国环境科学学会学术年会(第四章)[C].中国环境科学学会., 2014:6.
- [16] 杨帆. 某制药厂废水的生物毒性评价研究[D]. 长安大学, 2013.
- [17] 王佳佳, 徐超, 屠云杰,等. 斑马鱼及其胚胎在毒理学中的实验研究与应用进展[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(2):123-135.
- [18] 郑新梅, 丁亮, 刘红玲,等. 对硝基酚对大型蚤和斑马鱼胚胎的毒性[J]. 生态毒理学报, 46

2010, 05(5):692-697.

附

方法验证报告

方法名称：水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

项目主编单位：常州市环境监测中心

验证单位：中国环境科学研究院环境分析测试技术中心；中国环境监测总站；环境保护部南京环境科学研究所；浙江省环境监测中心；浙江省农业科学院农产品质量标准研究所；江苏国创环保科技有限公司

项目负责人及职称：薛银刚 高级工程师

通讯地址：常州市浦前张家村 149 号 电话：0519-86691381

报告编写人及职称：王倩 工程师

报告日期：2017 年 8 月 26 日

本方法的六家验证实验室分别为：1) 中国环境科学研究院环境分析测试技术中心；2) 中国环境监测总站；3) 环境保护部南京环境科学研究所；4) 浙江省环境监测中心；5) 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所；6) 江苏国创环保科技有限公司。

按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)的规定，组织六家以上有资质的实验室进行验证。工作主要内容是方法精密度及有效性的验证试验。

实施方法验证前，编制组根据初步制订好的标准文本设计了实验作业指导书和验证方案并进行专家论证，联系并分发实验作业指导书及验证方案至参加验证的六家实验室，确定具有生物监测上岗资质的技术人员，具备检定有效期内的相关仪器设备，提前采购并配置好所需试剂，协调验证试验同步开始的时间。

精密度的验证：标准编制组分别将生活污水（常州市深水城北污水处理有限公司）处理出水、工业废水（常州市武进双惠环境工程有限公司）处理出水和高、中、低三个浓度的参比物质溶液（分别为 6.3 mg/L 3,4-二氯苯胺、3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺和 1.3 mg/L 3,4-二氯苯胺）分配到各验证实验室，各验证实验室进行最低无效应稀释倍数 LID（或 LC₅₀）的测定，同时各实验室对自制的标准稀释水进行鱼卵存活率的测定，以上样品均平行测定 6 次，分别计算不同验证样品的平均存活率（或死亡率、LC₅₀）、标准偏差、相对标准偏差。

有效性及敏感性的验证：标准编制组将 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺工作液分配到各验证实验室，同时各实验室自制标准稀释水，每个实验室分别对上述两种水样进行鱼卵死亡率和存活率的测定，各实验室均平行测定 6 次，分别计算两种验证样品的死亡率和存活率，检验其是否符合 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺工作液鱼卵死亡率 > 10%、标准稀释水鱼卵存活率 ≥ 90% 的质控要求。

编制组最终将《水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，得出验证报告。

A.1 原始测试数据

A.1.1 实验室基本情况

附表 1 参加验证的人员情况登记表

姓名	职务或职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
张瑜	助理研究员	4 年	中国环境科学研究院
刘娜	助理研究员	3 年	中国环境监测总站
吴晟旻	副研究员	7 年	环境保护部南京环境科学研究所
巩杨	研究实习员	3 年	环境保护部南京环境科学研究所
周胜利	高级工程师	8 年	浙江省环境监测中心
魏铮	工程师	10 年	浙江省环境监测中心
王彦华	副研究员	10 年	浙江省农业科学院农产品质量标准研究所
谢显传	副教授	15 年	江苏国创环保科技有限公司
王伟莉	工程师	6 年	江苏国创环保科技有限公司

附表 2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	性能状况	备注
显微镜	XTZ-D	正常	中国环境科学研究院环境 分析测试技术中心
分析天平	MS-TS	正常	
培养箱	WMZK-1	正常	
显微镜	BH-2	正常	浙江省农业科学院农产品 质量标准研究所
分析天平	ML-T	正常	
培养箱	DHP9162	正常	
显微镜	BX50	正常	中国环境监测总站
分析天平	MS	正常	
培养箱	LRH-250	正常	
体式显微镜	M205FA	正常	环境保护部南京环境 科学研究所
分析天平	MU105DU	正常	
培养箱	RXE-300B	正常	
徕卡体视显微镜	M205C	正常	浙江省环境监测中心
电子天平	AB204-S	正常	
德国 3M 光照培养箱	FC-B2V-M/FC404	正常	
显微镜	Eclipse E200	正常	江苏国创环保科技 有限公司
分析天平	AUW220D	正常	
培养箱	BSP-250	正常	

附表 3 使用试剂及溶剂登记表

名称	来源、规格	备注
3,4-二氯苯胺	德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH	
氯化钙	国药集团化学试剂有限公司	
碳酸氢钠	上海安谱实验科技股份有限公司	
氯化钾	国药集团化学试剂有限公司	
七水合硫酸镁	国药集团化学试剂有限公司	

A. 1.2 精密度

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证,使用阴性对照水样(标准稀释水)进行测定,测定6次。结果见附表4。

附表中:1)中国环境科学研究院环境分析测试技术中心;2)中国环境监测总站;3)环境保护部南京环境科学研究所;4)浙江省环境监测中心;5)浙江省农业科学院农产品质量标准研究所;6)江苏国创环保科技有限公司,下同。

附表4 阴性对照水样精密度验证数据表(鱼卵存活率)

实验室号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	
1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0.00	0.0%	
2	100%	90%	100%	90%	100%	100%	97%	0.05	5.3%	
3	100%	90%	90%	100%	100%	100%	97%	0.05	5.3%	
4	90%	100%	100%	90%	100%	100%	97%	0.05	5.3%	
5	100%	90%	100%	100%	100%	100%	98%	0.04	4.2%	
6	100%	90%	100%	100%	90%	90%	95%	0.05	5.8%	
\bar{x}_i	97.2%									
S'	0.02									
RSD'	1.8%									
r	13%									
R	13%									

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证,使用生活污水(常州市深水城北污水处理有限公司)处理出水进行测定,测定6次。见附表5~6。

附表5 生活污水处理出水(D=1)精密度验证数据表(鱼卵存活率)

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S_i	RSD_i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	80%	90%	80%	80%	90%	90%	85%	0.05	6.4%
2	90%	90%	90%	80%	80%	90%	87%	0.05	6.0%
3	80%	90%	90%	80%	80%	90%	85%	0.05	6.4%
4	80%	80%	80%	90%	80%	90%	83%	0.05	6.2%
5	90%	90%	80%	90%	80%	90%	87%	0.05	6.0%
6	90%	80%	90%	90%	80%	90%	87%	0.05	6.0%

附表6 生活污水处理出水(D=2即LID时)精密度验证数据表(鱼卵存活率)

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S_i	RSD_i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	100%	90%	100%	90%	90%	90%	93%	0.05	5.5%
2	100%	100%	100%	90%	90%	100%	97%	0.05	5.3%
3	90%	90%	100%	90%	90%	100%	93%	0.05	5.5%
4	100%	90%	90%	100%	100%	100%	97%	0.05	5.3%
5	100%	90%	100%	100%	90%	100%	97%	0.05	5.3%
6	90%	90%	100%	90%	90%	100%	93%	0.05	5.5%

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证，使用工业废水（常州市武进双惠环境工程有限公司）处理出水进行测定，测定6次。见附表7~10。

附表7 工业废水处理出水（D=1）精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S _i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	60%	60%	50%	60%	70%	70%	62%	0.08	12.2%
2	60%	50%	60%	70%	70%	60%	62%	0.08	12.2%
3	60%	60%	70%	60%	70%	60%	63%	0.05	8.2%
4	60%	50%	60%	60%	50%	60%	57%	0.05	9.1%
5	60%	70%	70%	60%	60%	70%	65%	0.05	8.4%
6	70%	60%	70%	70%	60%	60%	65%	0.05	8.4%

附表8 工业废水处理出水（D=2）精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S _i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	80%	80%	70%	80%	80%	90%	80%	0.06	7.9%
2	70%	80%	80%	90%	90%	80%	82%	0.08	9.2%
3	80%	90%	80%	80%	90%	80%	83%	0.05	6.2%
4	70%	80%	80%	70%	90%	80%	78%	0.08	9.6%
5	80%	90%	90%	80%	80%	80%	83%	0.05	6.2%
6	80%	80%	90%	80%	90%	80%	83%	0.05	6.2%

附表9 工业废水处理出水（D=3）精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S _i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	90%	90%	80%	90%	80%	90%	87%	0.05	6.0%
2	90%	90%	90%	80%	90%	90%	88%	0.04	4.6%
3	90%	80%	90%	80%	90%	90%	87%	0.05	6.0%
4	90%	80%	90%	90%	90%	80%	87%	0.05	6.0%
5	90%	100%	90%	80%	80%	90%	88%	0.08	8.5%
6	90%	90%	90%	90%	80%	90%	88%	0.04	4.6%

附表10 工业废水处理出水（D=4 即 LID）精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S _i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	100%	90%	90%	100%	90%	90%	93%	0.05	5.5%
2	100%	100%	90%	100%	90%	90%	95%	0.05	5.8%
3	100%	90%	100%	100%	100%	90%	97%	0.05	5.3%
4	100%	90%	100%	100%	100%	90%	97%	0.05	5.3%
5	100%	100%	90%	100%	90%	90%	95%	0.05	5.8%
6	100%	90%	100%	100%	100%	90%	97%	0.05	5.3%

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证，使用高、中、低3种浓度3,4-二氯苯胺溶液进行测定，测定6次。结果见附表11~13。

附表 11 6.3 mg/L 3,4-二氯苯胺样品精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S _i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	0%	0%	10%	10%	3%	5%	154.9%
3	0%	0%	10%	0%	0%	0%	2%	4%	245.0%
4	0%	10%	0%	0%	0%	0%	2%	4%	245.0%
5	0%	10%	0%	0%	0%	10%	3%	5%	167.0%
6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.0%

附表 12 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺样品精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S _i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	50%	40%	50%	40%	50%	50%	47%	5%	11%
2	50%	60%	50%	50%	60%	40%	52%	8%	14.6%
3	40%	30%	40%	40%	30%	40%	37%	5%	14.1%
4	50%	40%	50%	40%	40%	50%	45%	5%	12.2%
5	40%	30%	50%	40%	50%	40%	42%	8%	18%
6	60%	50%	50%	60%	50%	50%	53%	5%	9.7%

附表 13 1.3 mg/L 3,4-二氯苯胺样品精密度验证数据表（鱼卵存活率）

实验室号	平行号 X						\bar{x}_i	S _i	RSD _i
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
1	90%	90%	90%	90%	90%	100%	92%	4%	4.5%
2	90%	90%	100%	90%	100%	90%	93%	5%	5.5%
3	90%	90%	80%	90%	90%	80%	87%	5%	6.0%
4	90%	100%	90%	90%	90%	100%	93%	5%	5.5%
5	90%	90%	80%	90%	100%	80%	88%	8%	8.5%
6	90%	100%	90%	100%	100%	90%	95%	5%	5.8%

A. 1.3 有效性

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的有效性进行验证，使用标准稀释水阴性对照样品和 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液阳性对照样品进行测定，测定6次。结果见附表14和表15，所有阴性对照鱼卵存活率≥90%、阳性对照鱼卵死亡率>10%，符合质控要求。

附表 14 阴性对照水样方法有效性及敏感性验证数据表

标准稀释水阴性对照鱼卵存活率	实验室号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	范围	结论
	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%~100%	符合鱼卵存活率≥90%的要求
	2	100%	90%	100%	90%	100%	100%	90%~100%	
	3	100%	90%	90%	100%	100%	100%	90%~100%	
	4	90%	100%	100%	90%	100%	100%	90%~100%	
	5	100%	90%	100%	100%	100%	100%	90%~100%	
	6	100%	90%	100%	100%	90%	90%	90%~100%	

附表 15 阳性对照水样方法有效性及敏感性验证数据表

3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液阳性对照鱼卵死亡率	实验室号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	范围	结论
	1	50%	40%	60%	40%	40%	50%	40%~60%	符合鱼卵死亡率>10%的要求
	2	40%	50%	50%	60%	60%	50%	40%~60%	
	3	40%	50%	50%	40%	50%	50%	40%~60%	
	4	50%	50%	40%	40%	50%	40%	40%~50%	
	5	50%	50%	60%	40%	40%	50%	40%~60%	
	6	50%	50%	40%	40%	50%	50%	40%~50%	

A. 2 方法验证数据汇总

A. 2.1 方法精密度数据汇总

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证,使用阴性对照水样(标准稀释水)进行测定,测定6次。结果见附表16。

附表 16 阴性对照水样(标准稀释水)精密度验证数据表(鱼卵存活率)

实验室号	\bar{x}_i	S_i	RSD_i
1	100%	0.00	0.0%
2	97%	0.05	5.3%
3	97%	0.05	5.3%
4	97%	0.05	5.3%
5	98%	0.04	4.2%
6	95%	0.05	5.8%
$\bar{\bar{x}}_i$	97%		
S'	0.02		
RSD'	1.8%		

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证,使用生活污水(常

州市深水城北污水处理有限公司) 处理出水进行测定, 测定 6 次。结果见附表 17。

附表 17 生活污水处理出水精密度验证数据汇总表 (鱼卵存活率)

实验室号	D=1			D=2		
	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i
1	85%	0.05	6.4%	93%	0.05	5.5%
2	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
3	85%	0.05	6.4%	93%	0.05	5.5%
4	83%	0.05	6.2%	97%	0.05	5.3%
5	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
6	87%	0.05	6.0%	93%	0.05	5.5%
$\bar{\bar{x}}_i$	86%			95%		
S'	0.01			0.02		
RSD'	1.6%			1.9%		
r	15%			15%		
R	14%			14%		
LID	六家实验室进行 6 次测定, 共获得 36 个 LID 值, 均为 2					

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证, 使用工业废水 (常州市武进双惠环境工程有限公司) 处理出水进行测定, 测定 6 次。结果见附表 18。

附表 18 工业废水处理出水精密度验证数据汇总表 (鱼卵存活率)

实验室号	工业废水 (D=稀释倍数)											
	D=1			D=2			D=3			D=4		
	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i	\bar{x}_i	S_i	RSD_i
1	62%	0.08	12.2%	80%	0.06	7.9%	87%	0.05	6.0%	93%	0.05	5.5%
2	62%	0.08	12.2%	82%	0.08	9.2%	88%	0.04	4.6%	95%	0.05	5.8%
3	63%	0.05	8.2%	83%	0.05	6.2%	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
4	57%	0.05	9.1%	78%	0.08	9.6%	87%	0.05	6.0%	97%	0.05	5.3%
5	65%	0.05	8.4%	83%	0.05	6.2%	88%	0.08	8.5%	95%	0.05	5.8%
6	65%	0.05	8.4%	83%	0.05	6.2%	88%	0.04	4.6%	97%	0.05	5.3%
$\bar{\bar{x}}_i$	62%			82%			88%			96%		
S'	0.03			0.02			0.01			0.01		
RSD'	5.0%			2.6%			1.0%			1.4%		
r	17%			18%			15%			15%		
R	18%			17%			14%			14%		
LID	六家实验室进行 6 次测定, 共获得 36 个 LID 值, 均为 4											

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的精密度进行验证, 使用高、中、低 3 种浓度 3,4-二氯苯胺溶液进行测定, 测定 6 次。结果见表 19。

表 19 3 种 3,4-二氯苯胺样品精密度验证数据汇总表（鱼卵存活率）

实验 室号	6.3 mg/L 3,4-二氯苯胺鱼卵死 亡率			3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺 鱼卵存活率			1.3 mg/L 3,4-二氯苯胺鱼卵存 活率			3,4-二氯苯胺 LC ₅₀ (mg/L)		
	\bar{x}_i	S _i	RSD _i	\bar{x}_i	S _i	RSD _i	\bar{x}_i	S _i	RSD _i	\bar{x}_i	S _i	RSD _i
1	100%	0	0.0%	47%	0.05	11.1%	92%	0.04	4.5%	3.13	0.29	0.09
2	97%	0.05	5.3%	52%	0.08	14.6%	93%	0.05	5.5%	3.38	0.40	0.12
3	98%	0.04	4.2%	37%	0.05	14.1%	87%	0.05	6.0%	2.70	0.17	0.06
4	98%	0.04	4.2%	45%	0.05	12.2%	93%	0.05	5.5%	3.20	0.33	0.10
5	97%	0.05	5.3%	42%	0.08	18.1%	88%	0.08	8.5%	2.95	0.38	0.13
6	100%	0	0.0%	53%	0.05	9.7%	95%	0.05	5.8%	3.48	0.34	0.10
$\bar{\bar{x}}_i$	98%			46%			91%			3.14		
S'	0.01			0.06			0.03			0.29		
RSD'	1.5%			13.6%			3.5%			9.12%		
r	11%			17%			16%			0.9		
R	11%			23%			17%			1.2		

A. 2. 2 方法有效性数据汇总

六家验证单位对水质急性毒性的测定斑马鱼卵法的有效性进行验证,使用标准稀释水阴性对照样品和 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液阳性对照样品进行测定,测定 6 次。结果见表 20,所有阴性对照鱼卵存活率≥90%、阳性对照鱼卵死亡率>10%,符合质控要求。

表 20 方法有效性及敏感性验证数据表

	实验室号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	范围	结论
标准稀释水 阴性对照 鱼卵存活率	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%~ 100%	符合鱼卵 存活率≥ 90%的要 求
	2	100%	90%	100%	90%	100%	100%	90%~100%	
	3	100%	90%	90%	100%	100%	100%	90%~100%	
	4	90%	100%	100%	90%	100%	100%	90%~100%	
	5	100%	90%	100%	100%	100%	100%	90%~100%	
	6	100%	90%	100%	100%	90%	90%	90%~100%	
3.7mg/L 3,4-二氯苯 胺溶液阳性 对照鱼卵死 亡率	1	50%	40%	60%	40%	40%	50%	40%~60%	符合鱼卵 死亡率> 10%的要 求
	2	40%	50%	50%	60%	60%	50%	40%~60%	
	3	40%	50%	50%	40%	50%	50%	40%~60%	
	4	50%	50%	40%	40%	50%	40%	40%~50%	
	5	50%	50%	60%	40%	40%	50%	40%~60%	
	6	50%	50%	40%	40%	50%	50%	40%~50%	

A. 3 方法验证结论

A. 3. 1 精密度

六家实验室分别对阴性对照水样(标准文本 6.2.16 标准稀释水), $\rho=1.3$ mg/L、 $\rho=3.7$ mg/L、 $\rho=6.3$ mg/L 的自制 3,4-二氯苯胺参比物质水样进行了斑马鱼卵急性毒性的测定,每个水样平均测定 6 次,前三者鱼卵存活率实验室内相对标准偏差分别为 0.0%~5.8%、4.5%~8.5%、9.7%~18%,实验室间相对标准偏差分别为 1.8%、3.5%、14%,重复性限为 13%、16%、17%,再现性限为 13%、17%、23%;后者鱼卵死亡率实验室内相对标准偏差为 0.0%~5.3%,实验室间相对标准偏差分别为 1.5%,重复性限为 11%,再现性限为 11%。

六家实验室分别对生活污水(LID=2)、工业废水(化工废水,LID=4)进行了斑马鱼卵急性毒性的测定,每个水样平均测定 6 次,当生活污水和工业废水水样均处于最低无效应稀释倍数 LID 时,鱼卵存活率实验室内相对标准偏差分别为 5.3%~5.5%、5.3~5.8%,实验室间相对标准偏差分别为 1.9%、1.4%,再现性限为 15%、15%,重复性限为 14%、14%。

六家实验室对阳性参比物质 3,4-二氯苯胺工作液进行了斑马鱼卵急性毒性的测定,3,4-二氯苯胺工作液 LC_{50} 实验室内相对标准偏差为 2.9%~13%,实验室间相对标准偏差为 7.3%,再现性限为 0.9 mg/L,重复性限为 1.2 mg/L。

A. 3. 2 有效性及敏感性

六家实验室对阴性对照水样(标准文本 6.2.16 标准稀释水)进行了 6 次重复测定:存活率介于 90%~100%,满足 $\geq 90\%$ 的要求。

六家实验室对 3.7 mg/L 3,4-二氯苯胺进行了 6 次重复测定:死亡率介于 40%~60%,满足 $> 10\%$ 的要求。