

中华人民共和国国家标准

水质 物质对淡水鱼(斑马鱼) 急性毒性测定方法

GB/T 13267—91

Water quality—Determination of the
acute toxicity of substance to a freshwater fish
(*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan)

本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》。

本标准可根据被测物质的性质确定采用静水式、换水式或流水式试验。

推荐采用斑马鱼并不排除使用其他鱼种,但对试验条件需做相应的改变,例如稀释水质及温度。

除斑马鱼(*Brachydanio rerio*)外,在不改变本标准的试验条件下,青鳉鱼(*Oryzias latipes*) (真骨鱼总目 青鳉科)亦可供使用。

本标准使用重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)为参考毒物。在 24 h 试验期间重铬酸钾的 LC_{50} 值必须处于 200~400 mg/L 之间。

1 主题内容与适用范围

本标准规定了在确定的试验条件下测定水溶性物质引起斑马鱼急性致死毒性大致范围的方法——静水法、换水法和流水法。

本标准适用于水中单一化学物质的毒性测定。工业废水的毒性测定也可使用此方法。(废水样品的采集、保存、干扰的处理见附录 A。)

2 原理

在确定的试验条件下用斑马鱼为试验生物测定毒物在 48 h 或 96 h 后引起受试斑马鱼群体中 50% 鱼致死的浓度。这个浓度以 24 h, 48 h, 72 h 或 96 h LC_{50} 表示。

3 定义

3.1 静水式试验

试验期间不需更换试验液,限于研究那些化学性质比较稳定的物质。

3.2 换水式试验

每 24 h 或更短的时间内更新一次试验液。可用于试验这类物质;它们的浓度在更换试验液的时间内相对稳定(亦即波动在初始值的 20% 之内)。

3.3 流水式试验

试验液连续更新,可用于大多数物质,包括水中不稳定的物质。

4 试验生物和试验溶液的制备

4.1 试验生物

国家环境保护局 1991-09-14 批准

1992-08-01 实施

GB/T 13267—91

试验鱼种应是斑马担尼鱼(真骨鱼总目,鲤科)[*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei Cyprinidae)]。试验鱼体长 30 ± 5 mm, 体重 0.3 ± 0.1 g, 选自同一驯养池中规格大小一致的幼鱼。试验前该鱼群应在与试验时相同的环境条件下, 在连续曝气的水中至少驯养两周。试验前 24 h 停止喂饲, 每天清除粪便及食物残渣。驯养期间死亡率不得超过 10%, 如果超过 10%, 则该批鱼不得用作试验。

试验鱼应无明显的疾病和肉眼可见的畸形。试验前两周内不应对其做疾病处理。斑马鱼驯养、繁殖的环境参数见附录 B。

4.2 标准稀释水

新配制的标准稀释水 pH 为 7.8 ± 0.2 , 硬度为 250 mg/L 左右(以 CaCO_3 计), 用蒸馏水或去离子水由下面 4 种溶液制备。

a. 氯化钙溶液

将 11.76 g 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于水并稀释至 1 L。

b. 硫酸镁溶液

将 4.93 g 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)溶于水并稀释至 1 L。

c. 碳酸氢钠溶液

将 2.59 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶于水并稀释至 1 L。

d. 氯化钾溶液

将 0.23 g 氯化钾(KCl)溶于水并稀释至 1 L。

将以上四种溶液各取 25 mL 加以混合并用蒸馏水稀释至 1 L。将制备好的稀释水曝气至溶解氧浓度达到空气饱和值(ASV), 并将 pH 稳定在 7.8 ± 0.2 。如果需要, 用氢氧化钠溶液或盐酸调节 pH, 这样制备的稀释水试验前不需强制曝气。

4.3 制备试验物质储备液

配制试验物质储备液所用试剂至少为分析纯。将已知量的试验物质溶于一定体积稀释水、去离子水或蒸馏水中。储备液应当天配制。对于化学性质较稳定的物质, 可配制供两天以上使用的溶液, 配好后低温保存。溶解低溶解度的物质时, 可使用超声波装置, 也可加入对鱼低毒的有机溶剂。有机溶剂在试验溶液中的浓度不应超过 0.1 mg/L。并应同时进行两组对照试验, 一组含有的溶剂为全部试验溶液中的最高浓度, 另一组则不含溶剂或试验物质。

4.4 试验溶液的配制及浓度的选择

向稀释水中加入适当的试验物质储备液, 使达到所需要的浓度。

配制试验溶液时, 按几何级数间距选择浓度。如 8、4、2、1、0.5 等。在测定废水样品时, 可以百分比体积浓度按几何级数间距选择浓度。

5 仪器设备

试验容器用玻璃或其他化学惰性物质制成, 应不明显吸附试验物质。

常用设备、尼龙或其他软惰性材料制成的抄网, 应专网专用。

5.1 试验容器

静水式、换水式试验所用的容器应有足够大的容积, 水量一般以鱼的负荷 1 克鱼/升水计算。试验介质与空气间有足够大的界面(每 10 L 介质要有大约 800 cm² 的介面积), 并备有牢固的密封盖。流水式试验的容器, 可用多颈的圆底玻璃烧瓶(容积 2 L), 带有磨口的玻璃接口(见图 1), 或用类似的玻璃仪器。使用多颈圆底烧瓶时, 一个颈上安有标准进口管, 第二个安出口管的颈上应装一个粗孔过滤器。

初次使用的试验容器用前应仔细清洗。试验后, 倒空容器, 以适当的手段清洗, 用水冲去痕量试验物质及清洗剂, 干燥后备用。试验容器临用前用稀释水冲洗。

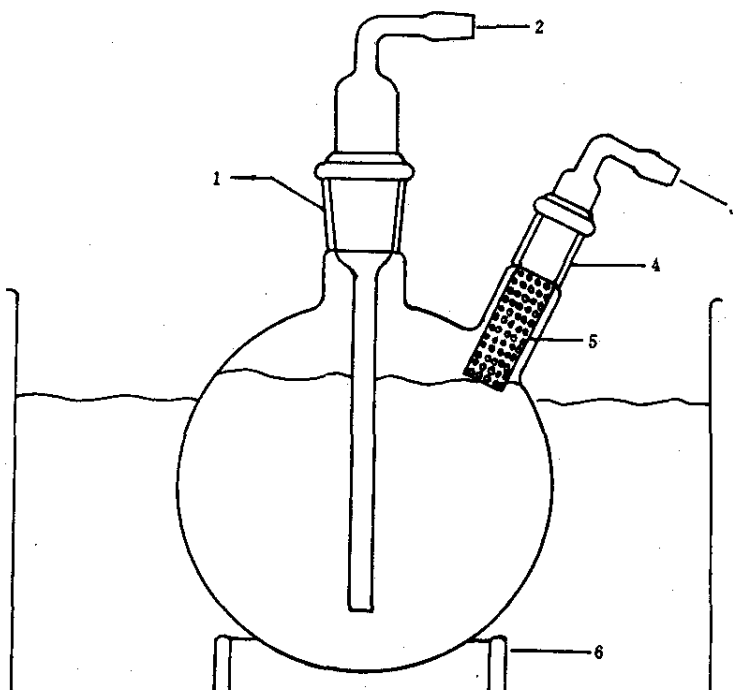


图 1 流水法所用仪器举例

1—磨口玻璃接口；2—试验液入口；3—试验液出口；
4—磨口玻璃接口；5—粗孔过滤；6—塑料支撑环

5.2 控温设备

用适宜的方法将试验溶液和蓄养池中的水温调节在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

6 试验条件

6.1 采用标准稀释水为试验用水。试验溶液的配备与储存、鱼的管理及全部操作和试验都应在空气污染物未达到有害浓度的大气中进行。

6.2 为避免对试验鱼不必要的扰动，试验液中溶解氧不少于 4 mg/L 。每天光照保持 $12 \sim 16 \text{ h}$ 。试验期间水温恒定在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 。试验前 24 h 停止给试验鱼喂食，整个试验期间亦不喂食。

6.3 可酌情选择纯化学化合物如重铬酸钾为参考毒物。可根据需要进行多次参考毒物的毒性试验，以得到参考毒物试验数据重现性的资料。每当蓄养种群发生变化都应按本方法规定的条件重复进行试验。这些试验结果应与同一实验室早先测得的结果一致。

7 试验步骤

7.1 预备试验

7.1.1 预备试验用于确定试验浓度的大致范围。这一范围一般可以以 10 为公比做间隔。例如： $1\ 000$ ， 100 ， 10 ， 1 和 0.1 mg/L 。

向六个容器中均加入标准稀释水(4.2)，如果需要，进行曝气使溶解氧浓度恢复到空气饱和值。向其中五个容器中加入适量的试验物质储备液(4.3)，配制一组适宜的浓度系列，第六个容器用做对照。如果数据不充分，无法确定正式试验所需要的浓度范围，则另选一个浓度范围进行试验。

7.1.2 将溶液在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温。试验时间为 $24 \sim 48 \text{ h}$ 。向每个容器放五尾鱼，每天至少记录两次每个容

GB/T 13267—91

器中的死鱼数目及溶解氧浓度,并及时将死鱼取出。

7.1.3 如果采用流水式试验,则应用流水法做预备试验。

7.1.4 测定废水样品时,应当首先测定废水样品的溶解氧含量并了解废水的大致性质。只有废水含有适量的溶解氧时,才能不经稀释进行毒性试验。

7.2 正式试验

7.2.1 从 24 h 预备试验中杀死全部鱼的最低浓度与未毒死鱼的最高浓度之间,以几何级数做间距,至少选择 5 个浓度为正式实验的浓度。其浓度范围在三个依次的几何系列浓度中最好能够测得 20% 到 80% 的死亡率以估计 LC_{50} 值。

7.2.2 至少取 6 个容器(流水式试验用 6 个 2 L 的烧瓶与辅助设备连好),均加入标准稀释水。其中一个为空白试验即对照试验,其余容器中加入不同量的储备溶液,以得到所要求的浓度范围。如果用有机溶剂溶解物质,则需配制第二个“对照”溶液,使标准稀释水中有有机溶剂的浓度与试验液中有有机溶剂的最高浓度相当。将试验液温度恒定在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,按下述方法向每个容器中加入 10 尾或更多的试验鱼。

用尼龙或其他软惰性材料编织的小孔抄网从驯养鱼群中随机选取鱼放入试验容器中。取要迅速,在鱼转移过程中因操作不慎掉下的鱼或其他操作不善的鱼弃去不用。所有的鱼需在 30 min 内转移完毕。

7.2.3 使用换水式试验时,8~24 h 更新一次试验液(视试验物质的性质、溶解氧等具体情况而定),立即将试验鱼转移到其中去。转移时从最低浓度开始依次向高浓度过渡,避免因使用抄网造成的各容器间试验物质的明显转移。

7.2.4 流水式试验时,启动流水装置,更新溶液的速率至少为 25 L/d。如果出口溶液的溶解氧浓度能维持大于 60%ASV,则更新速率可以低到 12 L/d。可连续更新,也可在短时间内间歇更新。用于更新的试液的温度需控制在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 。鱼转移的方法同 7.2.2。

7.2.5 随时观察并记录试验鱼的平衡、游动、呼吸、体色变化等中毒症状。试验开始后 3~6 h 内要特别注意观察。每天至少记录两次每个容器中的死鱼数目(用玻璃棒轻触鱼的尾部,没有反应即认为已死亡),及时清出死鱼。对照组的死亡率不得超过 10%,对照组试验期间鱼的外表及行为不正常或病态鱼也不得超过 10%,否则要重新进行试验。

试验开始和试验结束时测定试验液及储备液中被测物质的浓度。

每天至少测定一次各试验液的溶解氧、pH 和温度。试验开始和结束时亦要测定。斑马鱼急性毒性观察记录表格见附录 C。

8 结果的表述

8.1 直线内插法估算 LC_{50}

用简单的图示法估算 LC_{50} 时,可绘制死亡百分率对试验物质浓度的曲线。采用线性刻度的坐标轴时是一条 S 形的关系曲线,从引起 50% 死亡率的内插浓度值得到 LC_{50} 值(见图 2)。

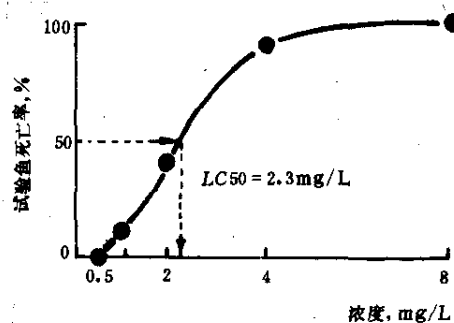


图 2 直线内插法估算 LC_{50}

8.2 概率单位图解法估算 LC_{50}

将试验浓度下观察到的鱼的死亡数列表。要计算 24、48、72 和 96 hLC50 值。但一般以 48 hLC50 或 96 hLC50 表示结果。

以浓度对数作为横坐标，死亡概率为纵坐标，在算术坐标纸上绘图。百分率与概率单位换算表见附录 D。由于概率单位尺度达不到 0 和 100，作图时，若是需要这样的数值，可使用箭头以表示这些点的真正位置。

其次，用目测法画一条直线，使它拟合图中的数据点。要特别考虑 16% 和 84% 死亡率之间的数据点，即：死亡概率 4 和 6 之间的点。力求减少这些点与直线间垂直偏离的总和，如果无法确定如何安排这条直线，可以尽量将它画向水平方向。因为这样便承认了数据中较大的变异性。从定出的直线读出致死 50% 的浓度对数，从而估算出 LC50。

例如：图 2 中的浓度及百分死亡率可换算成如下数后，在算术坐标上绘图（见图 3）。

浓度	浓度对数	死亡百分比	死亡概率
0.5 ppm	-0.30	0	—
1 ppm	0	10%	3.72
2 ppm	0.30	40%	4.75
4 ppm	0.60	90%	6.28
8 ppm	0.90	100%	—

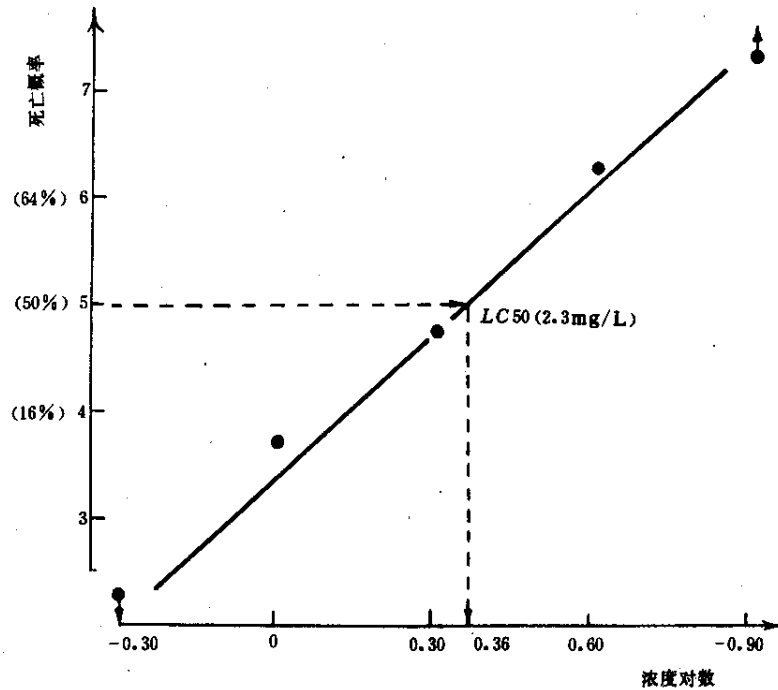


图 3 概率单位图解估算 LC50

8.3 如果需要估算曲线斜率、LC50 及其 95% 置信限可用图解法对试验结果进行分析（例如 Litchfield-Wilcoxon 图解法），也可以使用计算机，采用概率单位分析（Probit analysis）。如果没有足够的数据用于估算 24、48、72 和 96 h 下的 LC 值，则应记录在 24、48、72 和 96 h 下试验鱼全部死亡的最低浓度和全部存

活的最高浓度。这些浓度会指明 LC_{50} 的大致范围。

9 试验报告

在试验报告中要求列出下列资料及数据。

- a. 试验条件,静水式、换水式或流水式。控温及曝气情况。
- b. 与试验有关的化学、生物和物理数据,包括驯养鱼的详细情况,及每升水中的载鱼克数。
- c. 配制稀释水、储备液和试验液的方法、试验用水特性、pH、硬度、溶解氧等。
- d. 列表绘出试验液的浓度(或化学分析值)以及试验开始后24、48、72和96 h下的 LC_{50} 值(若可能,列出其95%置信限),给出参照采用的计算方法及所用的化学分析方法。
- e. 对照鱼的死亡率、行为反应异常的比例。
- f. 参比物质的 LC_{50} 值。
- g. 鱼的中毒反应症状。

附录 A
废水样品的采集和处理
(补充件)

A1 样品的采集

A1.1 应对水样的代表性有充分的估计。在了解了生产流程及废水排放的情况下采集有代表性的样品。

A1.2 工业或其他废水样品成分如不稳定,应在不同时间采集,不应合并水样。如果废水的组成和毒性变化很大,必须测定可能是最毒时间所采集的样品,求其最大毒性。

A2 样品的保存

工业或其他废水样品应取满瓶,塞紧贮存在不超过原水样温度、同时温度又比较稳定的地点。如果水样中含有易被细菌分解的物质,则应将水样贮于冰箱中(0~4℃),并尽量缩短水样在试验前的保存时间。

A3 水样缺氧的处理办法

应区别鱼类在污染水体中由于缺乏溶解氧引起的死亡与中毒而引起的死亡。许多工业废水具有较高的化学需氧量或生化需氧量,造成水样缺氧。在这种情况下,可用三种方法以保持水样有足够的溶解氧。

A3.1 试验溶液的人工曝气

采用适当的装置使试验液人工氧化而又避免失散挥发性物质。例如,可采用密闭的容器将玻璃导管从容器的顶部一直插到接近容器的底部。用适当的压力控制设备以恒定的速度引入压缩空气或氧气,保持适当的样品含量,避免过饱和。

此外,也可采用部分充满溶液的较大容器内静表面保持一个富氧气压的办法。切忌用压缩空气剧烈曝气。

A3.2 稀释水的最初充氧

工业废水可能不含氧,也可能有较大的瞬时耗氧,需使每一水样在试验前有足够的溶解氧。在稀释水与废水混合前,将稀释水充氧。可事先测定废水的含氧量和瞬时耗氧量。对于许多具有高耗氧量的工业废水用这种方法不能得到足够的溶解氧,可采用 A3.1 所叙述的方法,试验报告中要说明 LC_{50} 是在水样充氧的情况下取得的。

A3.3 及时更换试验液的办法也可使水样维持适量的溶解氧。使用恒流装置流水式试验可以保持水样中含有适量的溶解氧。鉴于目前一般的实验室还不能普遍使用恒流系统设备,每24 h、12 h 或8 h 周期性更换试验溶液也常可得到满意的结果。

A4 干扰

如果被测定物质的废水具有很大的挥发性、不稳定性,会造成试验结果的偏差。对于这种情况可采用流水式试验以取得更可靠的试验结果。此外,要充分重视废水水样 pH 的变化引起的毒性变化。可先对原水进行试验取得一定数据后再把水样的 pH 调解到正常范围内进行正式试验。

GB/T 13267—91

附录 B

斑马鱼(*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan)

驯养繁殖的环境参数

(补充件)

B1 引言

斑马鱼起源于印度的科罗曼德尔(Coromandel)海岸,生活在急流中。Laale 最近考察了斑马鱼的生态学,有关它们管理和养殖资料可从热带鱼养殖的标准参考书中查出。

斑马鱼体长很少超过45 mm,鱼体呈圆柱形,在银白色的鱼体上有7~9条深蓝色水平条纹。这些条纹延伸至尾鳍和臀鳍。背部呈橄榄绿色,雄性较雌性少,带有金黄色光泽。雌性更偏呈银白色,产卵前腹部特别膨胀。

B2 环境参数

斑马鱼可以忍受较宽的温度、酸碱度及水的硬度,驯养时 pH 通常为中性。水温维持在20~25℃,诱导产卵时控制在23~26℃。水温在15~40℃、pH6.0~8.0、总硬度高达300 mg/L(以 CaCO₃计),斑马鱼仍能正常生活。

B3 材料和方法

容积2 L 以上的玻璃容器均可作产卵箱。由于成鱼贪吃鱼卵,故需要有保护鱼卵和幼鱼的方法。一种行之有效的办法是,在距产卵箱底部2 cm 处设一挡板,板上开孔(孔眼直径约3~5 mm),将成鱼限制在挡板上。当雌鱼产卵时,卵通过板孔落入箱底,而成鱼不能到达此区。

B4 产卵时的处理方法

成熟后的雌雄鱼应分开饲养。产前12 h 停止喂养。将新鲜自来水放置48 h 或经曝气1 h 后的蒸馏水注入产卵箱内,于晚间将雌雄鱼各放入产卵箱中。产卵箱内温度控制在20~26℃,一般于次日产卵,大约3 h 产卵完毕。雌鱼每次产卵约300粒,个体大者可达千粒,此时将成鱼取走,留下卵待孵化。

B5 鱼苗的发育

鱼卵4~5天孵化完,鱼苗附着在箱壁上在24~48 h 内不动。当鱼苗能自由游动时,用原生动植物或特制的小颗粒鱼食喂饲。3周后,用新孵化的丰年虫无节幼体喂鱼苗,一个月后转移到容积两百升的水族箱内,喂以活的或特制的饲料,三个月后,鱼性成熟,体长达3.5 cm 左右。

B6 文献目录

- [B1] AXELROD, H. p. Breeding Aquarium Fishes Book 1. T. F. H. publication. 1967.
- [B2] LAAIE, H. W. The biology and use of zebra fish (*Brachydanio rerio*) in fisheries research. A literature review J. Fish Biol. 10(2)1977:121-173.
- [B3] MERTENS, J. Year-round controlled mass reproduction of the zebra fish. A Aquaculture 2 1973:245-249.
- [B4] NEWSOME, C. S. and PIRON, R. D.
Aetiology of skeletal deformities in the zebra Danio fish (*Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan). J. Fish Biol. 21 1982:231-237.

〔B5〕 NIIMI, A. J. and LAHAM, Q. N. influence of breeding time interval on egg number, mortality and hatching of the zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Can. J. Zool.* 52 1974:515-517.

〔B6〕 PIRON, R. D. Spontaneous skeletal deformities in the zebra fish (*Brachydanio rerio*) bred for fish toxicity tests. *J. Fish Biol.* 13 1978:79-84.

GB/T 13267—91

附录 C
斑马鱼急性毒性观察记录
(补充件)

实验室		操作者	
样品编号		试验开始日期	
试验物质分子式	纯度	其他资料	
储备液配制方法		储备液浓度(mg/L) 试验容器中最大溶剂浓度(mg/L)	

本试验采取的分析方法

时 间	项 目	对 照	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5
24 h	死亡数						
	水温						
	pH						
	溶解氧						
	中毒症状						
48 h	死亡数						
	水温						
	pH						
	溶解氧						
	中毒症状						
72 h	死亡数						
	水温						
	pH						
	溶解氧						
	中毒症状						
96 h	死亡数						
	水温						
	pH						
	溶解氧						
	中毒症状						

附录 D
百分率与概率单位换算表
(附录 D 为本标准附件)

百分率, %	概率(机率)	百分率, %	概率(机率)
0	—	31	4.504 1
1	2.673 7	32	4.532 3
2	2.946 3	33	4.560 1
3	3.119 2	34	4.587 5
4	3.249 3	35	4.614 7
5	3.355 1	36	4.641 5
6	3.445 2	37	4.668 1
7	3.524 2	38	4.694 5
8	3.594 9	39	4.720 7
9	3.659 2	40	4.746 7
10	3.718 4	41	4.772 5
11	3.773 5	42	4.798 1
12	3.825 0	43	4.823 6
13	3.873 6	44	4.849 0
14	3.919 7	45	4.874 3
15	3.963 6	46	4.899 6
16	4.005 5	47	4.924 7
17	4.045 8	48	4.949 8
18	4.084 6	49	4.974 9
19	0.122 1	50	5.000 0
20	4.158 4	51	5.025 1
21	4.193 6	52	5.050 2
22	4.227 8	53	5.075 3
23	4.261 2	54	5.100 4
24	4.293 7	55	5.125 7
25	4.325 5	56	5.151 0
26	4.356 7	57	5.176 4
27	4.387 2	58	5.201 9
28	4.417 2	59	5.227 5
29	4.446 6	60	5.253 3
30	4.475 6	61	5.279 3

GB/T 13267—91

续表

百分率, %	概率(机率)	百分率, %	概率(机率)
62	5.305 5	81	5.877 9
63	5.331 9	82	5.915 4
64	5.358 5	83	5.954 2
65	5.385 3	84	5.994 5
66	5.412 5	85	6.036 4
67	5.439 9	86	6.080 3
68	5.467 7	87	6.126 4
69	5.495 9	88	6.175 0
70	5.524 4	89	6.226 5
71	5.553 4	90	6.281 6
72	5.582 8	91	6.340 8
73	5.612 8	92	6.405 1
74	5.643 3	93	6.475 8
75	5.674 5	94	6.554 8
76	5.706 3	95	6.644 9
77	5.738 8	96	6.750 7
78	5.772 2	97	6.880 8
79	5.806 4	98	7.053 7
80	5.841 6	99	7.326 3

附加说明:

本标准由国家环境保护局科技标准司提出。

本标准由北京市环境保护监测中心负责起草。

本标准主要起草人谢凤君、陈惠志、赵幼一。

本标准由国家环境保护局负责解释。