

中华人民共和国国家环境保护标准

HJ □□□-20□□

水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

Water quality — Determination of the acute toxicity

— Zebrafish (*Danio rerio*) eggs method

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	2
5 干扰和消除.....	2
6 试剂和材料.....	2
7 仪器和设备.....	4
8 样品.....	4
9 分析步骤.....	6
10 结果计算与表示.....	8
11 精密度和准确度.....	8
12 质量保证和质量控制.....	8
13 试验报告.....	9
14 废弃物处置.....	9
附录 A（资料性附录） 斑马鱼卵相关发育阶段	10
附录 B（资料性附录） 斑马鱼种鱼驯养及维持	11
附录 C（资料性附录） 产卵盒示意图	12
附录 D（资料性附录） 斑马鱼卵鉴别	12
附录 E（资料性附录） 24 孔细胞培养板试验布局设置方案.....	15
附录 F（资料性附录） 推荐的数据记录表	16
附录 G（资料性附录） 寇式法计算 LC50.....	18

前 言

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，规范水质急性毒性测定的斑马鱼卵方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水、地下水、生活污水和工业废水中急性毒性的斑马鱼卵法。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F 和附录 G 为资料性附录。

本标准首次发布。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位：常州市环境监测中心、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。

本标准验证单位：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和江苏国创环保科技有限公司。

本标准生态环境部20□□年□□月□□日批准。

本标准自20□□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

1 适用范围

本标准规定了测定水质急性毒性的斑马鱼卵法。

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测定。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 6920 水质 pH 值的测定 玻璃电极法

GB/T 13267 水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法

HJ 506 水质 溶解氧的测定 电化学探头法

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

HJ/T 164 地下水环境监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

鱼卵 fish egg

指处于卵膜破裂前整个发育阶段的卵细胞，斑马鱼卵相关发育阶段见附录 A。

3.2

稀释倍数 dilution level

原水样占稀释后水样总体积分数的倒数，一般用 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 $D=4$ 。

3.3

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，本标准指不少于 90% 鱼卵存活时水样的最低稀释倍数，用 LID 表示。

3.4

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。

3.5

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。

4 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 LC_{50} 值，表征水样的急性毒性。

5 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(7.11)缓慢从 24 孔细胞培养板(7.8)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(7.11)将原水样移回，恢复原有暴露体积。

6 试剂和材料

6.1 受试生物

6.1.1 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 6~24 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。种鱼驯养及维持具体条件及方法见附录 B。

6.1.2 鱼卵

受精率 $\geq 70\%$ ，处于 4~128-细胞期（见附录 A）。

6.2 试剂

除非另有说明，分析时使用符合国家标准和分析纯试剂。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 $< 10\text{ }\mu\text{S/cm}$ 的要求。

6.2.1 浓盐酸： $\rho(\text{HCl}) = 1.18\text{ g/ml}$ 。

6.2.2 氢氧化钠 (NaOH)。

6.2.3 氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

6.2.4 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。

6.2.5 碳酸氢钠 (NaHCO_3)。

6.2.6 氯化钾 (KCl)。

6.2.7 3,4-二氯苯胺 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N}$)，优级纯。

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

量取 8.3 ml 浓盐酸 (6.2.1)，用水定容至 1 000 ml。

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

称取 4 g 氢氧化钠 (6.2.2)，溶于少量水中，用水定容至 1 000 ml。

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

称取 0.05 g 3,4-二氯苯胺(6.2.7)，溶于少量标准稀释水(6.2.16)中，用标准稀释水(6.2.11)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。

6.2.11 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 (6.2.10)，用标准稀释水 (6.2.16) 定容至 100 ml，使用前按 8.2.1 步骤平衡至 $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。该溶液作为阳性对照 (9.6) 水样，临用前现配。

6.2.12 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 (6.2.3)，溶于少量水中，用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

6.2.13 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 (6.2.4)，溶于少量水中，用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

6.2.14 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 (6.2.5)，溶于少量水中，用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

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

称取 0.22 g 氯化钾 (6.2.6)，溶于少量水中，用水定容至 1 000 ml。可储存 6 个月。

6.2.16 标准稀释水。

将氯化钙储备液 (6.2.12)、硫酸镁储备液 (6.2.13)、碳酸氢钠储备液 (6.2.14) 和氯化钾储备液 (6.2.15) 四种储备液各 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 (6.2.11) 配制以及样品稀释 (8.3)，稀释前应按 8.2.1 步骤平衡水温至 $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 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 (9.1)、产卵及鱼卵初筛 (9.2)、板对照和阴性对照试验 (9.6) 时，应按 8.2.1 步骤平衡水温至 $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 并用空气曝气至溶解氧浓度至少达到空气饱和值的 80%。

7 仪器和设备

7.1 冷藏采样箱：2~8 °C；

7.2 pH 计：测量范围 0~14，最小分度为 0.1pH 单位；

7.3 溶解氧测定仪：测量范围 0~20 mg/L，最小分度为 0.1 mg/L；

7.4 倒置显微镜或体视显微镜：最小放大倍数为 30×；

7.5 冰箱：冷藏室 2~8 °C；冷冻室 ≤-18 °C；

7.6 恒温培养箱或恒温室：26 °C±1 °C；

7.7 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；

7.8 市售 24 孔细胞培养板：每孔容积 2.5~5 ml；

7.9 产卵盒：惰性材料，20 cm×10 cm×11 cm（见附录 C），可选择市售；

7.10 温度计：0~50 °C；

7.11 塑料滴管：5 ml，口径大于 3 mm；

7.12 一般实验室常用器皿和设备。

8 样品

8.1 样品采集和保存

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。

8.2 样品预处理

8.2.1 温度

低于 -18 °C 保存的水样，需在不超过 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（7.6）中，26 °C±1 °C 避光平衡至恒温后用于试验。

8.2.2 pH 值

按照 GB/T 6920 方法测定水样 pH 值。当 pH 值 <6.5 或 >8.5 时，使用盐酸溶液（6.2.8）

或氢氧化钠溶液（6.2.9）调节水样 pH 值至 6.5~8.5，尽量减少酸碱调节液的用量，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。

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 值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 pH 值调节前、后的水样同时开展试验比较。

8.2.3 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（9.3）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。

8.3 样品稀释

按表 1 或根据实际需要配制稀释水样。

测定 LID 时，选择连续的 4~5 个（或 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，按一定稀释比（一般≤2）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为 100%或与之接近、最低稀释倍数水样鱼卵存活率尽可能为 0 或与之接近。

当上述要求不能保证时，进行预试验，以稀释比为 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 部分进行试验，以确定鱼卵存活率 100%及 0 与水样浓度间大致对应的范围。

表 1 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	所需水样体积	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
...

9 分析步骤

9.1 配种

收集鱼卵前 12 h 开始斑马鱼种鱼配种，将洗净晾干后的产卵盒（7.9）内缸套入外缸，插入隔板，加入约 2/3 缸标准稀释水（6.2.16），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（7.6）中避光放置过夜。

按以上步骤至少进行 3 组种鱼的配种、产卵。

9.2 产卵及鱼卵初筛

次日光照开始后，打开产卵盒（7.9）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（6.2.16），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（6.2.16）冲洗至结晶皿中，在恒温培养箱或恒温室（7.6）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。

9.3 暴露试验

将已配制好的不同浓度的稀释水样按附录 E 设置的试验布局加至 24 孔细胞培养板（7.8），每孔 2 ml。

上述稀释水样各取 60~70 ml 于不同的培养皿中，用塑料滴管（7.11）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（7.4）下逐一进行观察，选取 4-至 128-细胞期（见附录 A）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（7.8）对应孔中各加入 1 粒受精卵，盖上盖板。

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

将上述 24 孔细胞培养板（7.8）于恒温培养箱或恒温室（7.6）中，按附录 B 的水温和光照条件进行 48 h 暴露试验。

9.4 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（7.8）置于倒置显微镜或体视显微镜（7.4）下按表 2 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 2 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。			

9.5 测试终点判定

测试终点按下列标准判定（参见附录 D.2）。

a) 卵凝结

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。

b) 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。

c) 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。

d) 无心跳

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

9.6 对照试验

每批水样试验时，按附录 E 试验布局及 9 步骤进行对照试验。

a) 板对照

以标准稀释水（6.2.16）为水样进行板对照试验。

b) 阴性对照

以标准稀释水（6.2.16）为水样进行阴性对照试验。

c) 阳性对照

以 3,4-二氯苯胺工作液（6.2.11）为水样进行阳性对照试验。

以上 9 分析步骤中所涉实验室温度控制在 26 °C 左右，恒温培养箱或恒温室（7.6）温度控制在 26 °C±1 °C。

10 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 按附录 G 方法计算。

11 精密度和准确度

11.1 精密度

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、 $\rho=3.7$ mg/L、 $\rho=6.3$ mg/L 的高、中、低三个浓度自制 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%，重复性限为 15%、15%，再现性限为 14%、14%。

六家实验室对阳性参比物质 3,4-二氯苯胺（LC₅₀=3.1 mg/L）进行了斑马鱼卵急性毒性 LC₅₀ 的测定，每个实验室各测定 6 次，3,4-二氯苯胺 LC₅₀ 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。

11.2 有效性及敏感性

六家实验室对阴性对照水样（6.2.16 标准稀释水）进行了 6 次重复测定：存活率介于 90%~100%。

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%。

12 质量保证和质量控制

12.1 板对照试验

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。

12.2 阴性对照和阳性对照试验

阴性对照和阳性对照试验结果符合下列要求，结果方为有效。否则，查明原因后重新进

行试验。

a) 阴性对照

培养 48 h 后，阴性对照组鱼卵存活率 $\geq 90\%$ ；

b) 阳性对照

培养 48 h 后，阳性对照组鱼卵死亡率 $> 10\%$ 。

13 试验报告

试验报告要求包括但不限于以下几个信息：

a) 样品的名称、性质、来源、保存方法及保存时间；

b) 试验前样品的 pH 值、溶解氧浓度及前处理方法；

c) 试验环境条件，试验用稀释水的性质，如水温、溶解氧等情况；

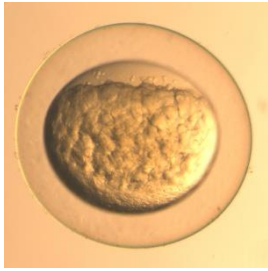
d) 板对照、阴性对照和阳性对照试验是否符合质量控制规定的要求；

e) 试验结果报告。

14 废弃物处置

染毒的斑马鱼卵放入冰水混合液（冰的体积不少于 50%）中 30 min 以上进行灭活处理后按一般废弃物处置。具有急性毒性的水样、含有 3,4-二氯苯胺的废液按危险废物处置。

附录 A
(资料性附录)
斑马鱼卵相关发育阶段



合子期 新产鱼卵



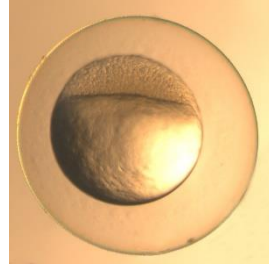
卵裂期 4-细胞期



卵裂期 8-细胞期



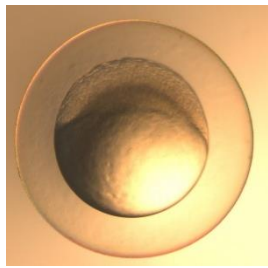
囊胚期 128-细胞期



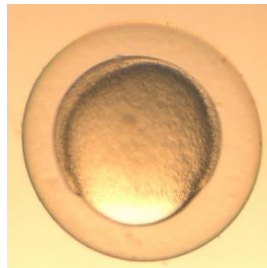
囊胚期 球形



囊胚期 穹顶



原肠期 30%外包



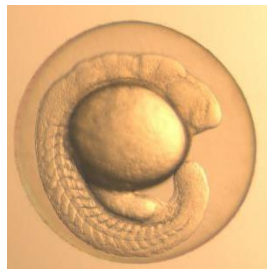
原肠期 75%外包



原肠期 尾芽



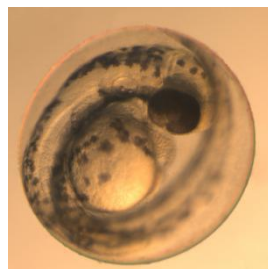
体节期 6 体节



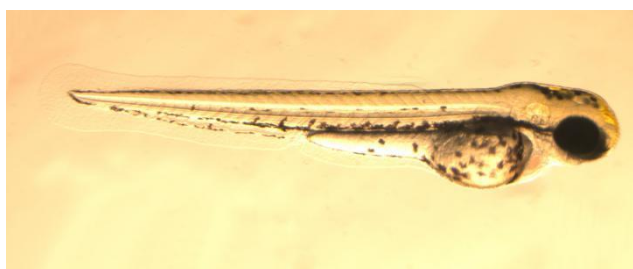
体节期 18 体节



原基期



孵化期



幼鱼

附录 B
(资料性附录)
斑马鱼种鱼驯养及维持

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(可参考 GB/T 13267)。

B.1 用水

使用标准稀释水(6.2.16)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。

B.2 水质

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

B.3 水温

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

B.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。

B.5 负荷

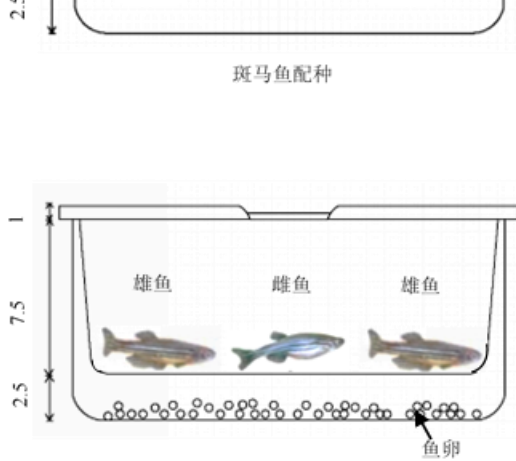
保证每尾种鱼 1~1.5 g/L 水的活动空间。

B.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。

B.7 产卵周期

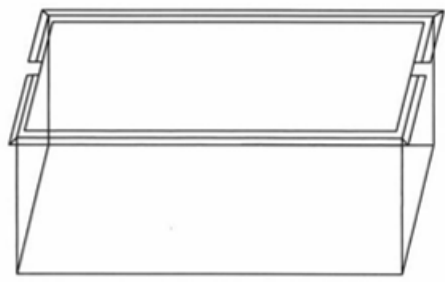
三个月龄的斑马鱼可达到性成熟,选择鱼龄 6~24 月的雌雄种鱼配对,产卵后应分开饲养恢复 1.5~2 周才能重新配对产卵。为保证鱼卵的获取,应维持足够数量的种鱼。



斑马鱼配种

斑马鱼产卵及鱼卵收集

录)
图
cm



附录 D
(资料性附录)
斑马鱼卵鉴别

D.1 受精卵鉴别参考图

D.1.1 未受精鱼卵肉眼的鉴别

肉眼观察下“发白、不透明、空壳”的鱼卵为未受精卵。



未受精鱼卵

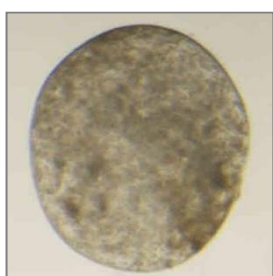


正常鱼卵

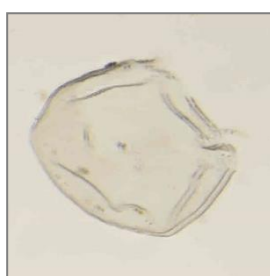
图 D.1.1 未受精卵肉眼鉴别

D.1.2 受精鱼卵显微镜的鉴别

9.2 部分转移至结晶皿并静置 45 min 后的鱼卵显微镜下受精情况的鉴别如下图。



发白、不透明鱼卵

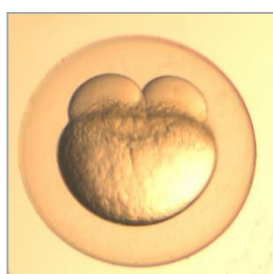


空壳鱼卵



胚胎不发育的鱼卵

图 D.1.2 未受精卵显微镜鉴别



胚胎 2-细胞期的鱼卵



胚胎 4-细胞期的鱼卵



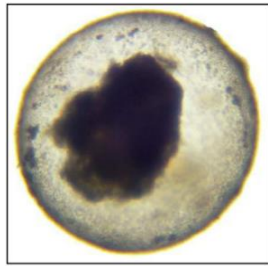
胚胎 8-细胞期的鱼卵

注：进入胚胎发育卵裂期的鱼卵为受精卵，以上为典型者。

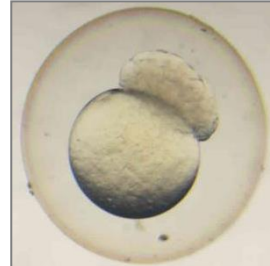
图 D.1.3 受精卵显微镜鉴别

D. 2 鱼卵镜检测终点鉴别参考图

D. 2. 1 卵凝结



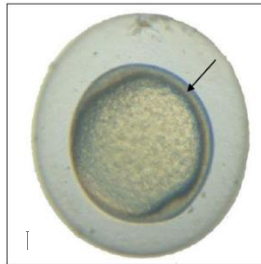
凝结的鱼卵



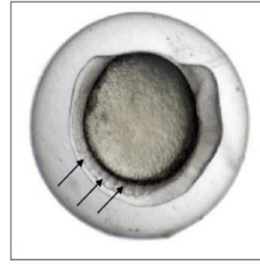
正常的鱼卵

图 D.2.1 卵凝结鉴别

D. 2. 2 体节未形成



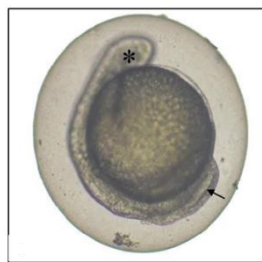
体节未形成



体节已形成

图 D.2.2 体节未形成鉴别

D. 2. 3 尾部未分离



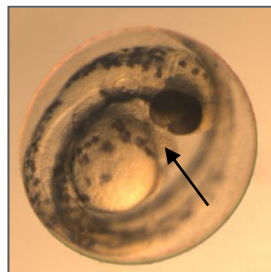
尾部未分离



尾部分离

图 D.2.3 尾部未分离鉴别

D. 2. 4 无心跳



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。

图 D.2.4 鱼卵无心跳鉴别

附录 E

(资料性附录)

24 孔细胞培养板试验布局设置方案

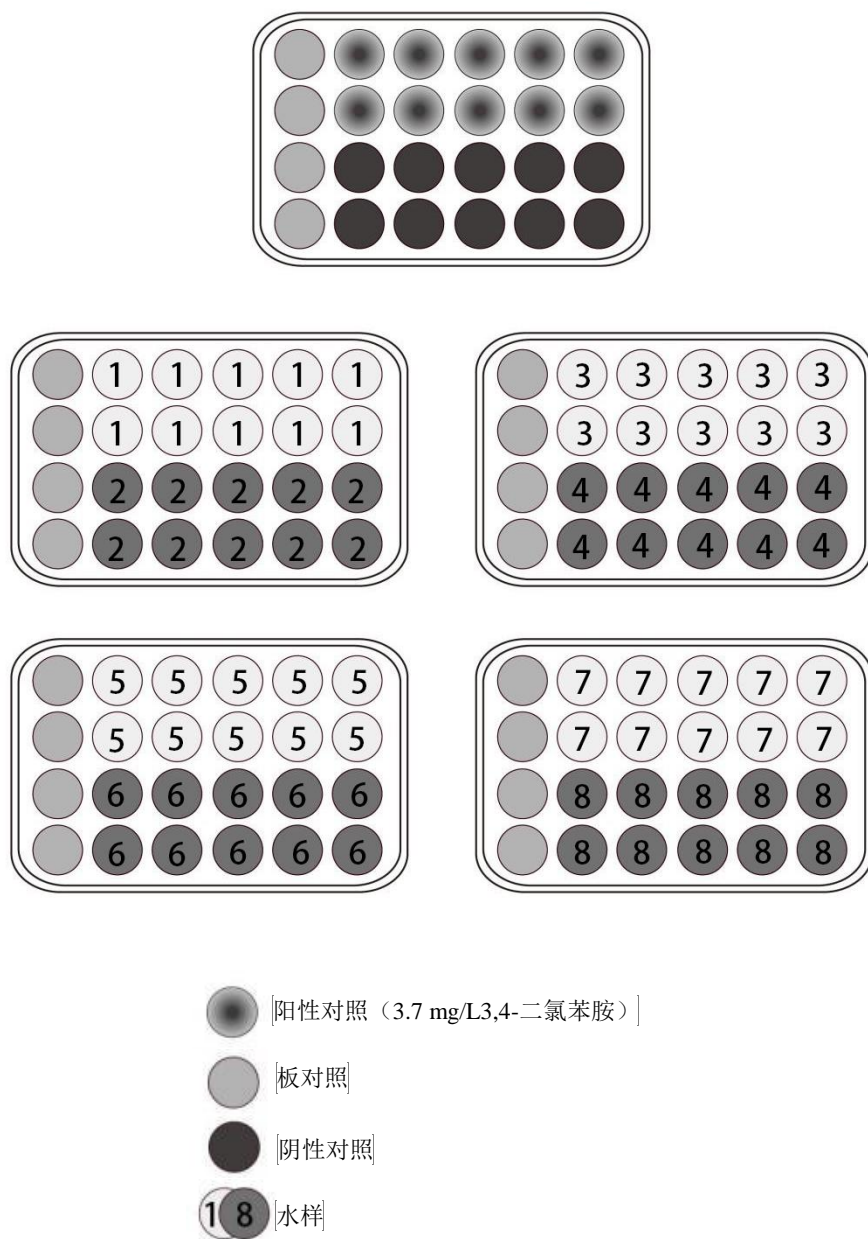


图 E.1 24 孔细胞培养板试验布局设置方案

附录 F
(资料性附录)
推荐的数据记录表

F.1 斑马鱼卵急性毒性试验记录表

样品类别	<input type="checkbox"/> 地表水 <input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 生活污水 <input type="checkbox"/> 工业废水					
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_____

F.2 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_____

附录 G
(资料性附录)
寇式法计算 LC50

G.1 LC₅₀ 计算

寇式法计算 LC₅₀ 要满足下列条件:

- a) 每个稀释水样浓度实验组的动物数要相同;
- b) 各实验组稀释水样浓度要按等比级数分组;
- c) 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。

计算公式如下:

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

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), $P_m \leq 1$, 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), $P_u \geq 0$, 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 G.1 所示, 求 48 h LC₅₀。

表 G.1 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 (G.1), 得

$$\begin{aligned}\lg LC_{50} &= 0.8751 - 0.1269 \times \left(2.4 - \frac{3 - 1.0 - 0.1}{4} \right) \\ &= 0.6308 \\ 48 \text{ h } LC_{50} &= 4.3\%\end{aligned}$$

G. 2 LC_{50} 95% 置信限

公式如下:

$$SlgLC_{50} = d \sqrt{\sum_{i=m}^u \frac{p_i q_i}{n}} \quad (G.2)$$

$\lg LC_{50}$ 的 95% 置信区间为: $\lg LC_{50} \pm 1.96 \times SlgLC_{50}$

式中除上面提到的外:

$SlgLC_{50}$ 为 $\lg LC_{50}$ 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:

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

$$\begin{aligned}\lg LC_{50} &= 0.6308 \pm 1.96 \times 0.0260 \\ &= 0.6308 \pm 0.0510 \\ &= 0.5798 \sim 0.6818\end{aligned}$$

48 h LC_{50} 的 95% 置信区间为 3.8%~4.8%。
