

上海市环境科学学会

关于《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法（征求意见稿）》团体标准公开征求意见的函

各相关单位：

由上海市环境科学学会、江苏省环境监测协会、浙江省环境监测协会联合组织编制的团体标准《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》已形成征求意见稿。按照《上海市环境科学学会团体标准管理办法》、《江苏省环境监测协会团体标准管理办法（试行）》、《浙江省环境监测协会团体标准管理办法（试行）》的有关要求，现公开征求意见。请于**2022年12月20日**前将《征求意见回复表》反馈至上海市环境科学学会。

联系人：戚芳方

电 话：15121033961

邮 箱：shsseshjjc@126.com

附件：1.征求意见稿文本

2.编制说明

3.征求意见回复表



团 体 标 准

T/SSESB□□□□—202□
T/JSEMA□□□□—202□
T/ZJEMA□□□□—202□

水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法

Water quality - High throughput acute toxicity test method for luminescent bacteria

(征求意见稿)

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

上海市环境科学学会
江苏省环境监测协会
浙江省环境监测协会

目 次

前 言	3
1 范围	4
2 规范性引用文件	4
3 术语和定义	4
4 方法原理	5
5 干扰	5
6 试剂和材料	6
7 仪器和设备	6
8 样品	7
9 分析步骤	8
10 结果计算与表示	9
11 精密度和准确度	12
12 质量保证和质量控制	12
13 废物处置	13
附 录 A 盐水样品测定的校正	14
附 录 B 稀释系列	16
附 录 C 96 孔板布局图	18
附 录 D 测试报告	19

T/SSESB□□□□—202□

T/JSEMA□□□□—202□

T/ZJEMA□□□□—202□

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市检测中心提出。

本文件由上海市环境科学学会、江苏省环境监测协会、浙江省环境监测协会归口。

本文件起草单位：上海市检测中心、上海市环境监测中心、上海勘测设计研究院有限公司

参与验证单位：上海市环境监测中心；上海化工研究院；上海市检测中心；东华大学；上海锐浦环境技术发展有限公司；复旦大学

本文件主要起草人：陈晓倩、汤琳、张瑛、刘亚楠、吴阿娜、朱梦杰、龚海燕、陆松柳、刘海臣

本文件首批承诺执行单位：XXXXXXXXX。

水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法

1 范围

本标准规定了高通量测定水质急性毒性的发光细菌法。

本标准适用于测定地表水，地下水，饮用水、生活污水，工业废水及海水的发光细菌急性毒性。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 5750.2 生活饮用水标准检验方法水样的采集与保存

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 17378.3 海洋监测规范 第3部分：样品采集、贮存与运输

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

HJ 91.1 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文件。

3.1 空白对照 Blank control

在实验室中用于检查或监控仪器或测量性能，或监控研究过程中样品的变化。

3.2 参比样品 Reference substance

当从以前的试验中已知一种物质的效应或特性时，并且当这种物质作为试验样品在试验体系内进行测试时，这种物质被称为参比样品。

3.3 测试样品 Test substance

通过各种样品预处理方法制备的测试样品，例如溶解、均质化、沉淀、过滤、中和或曝气。

3.4 接触时间 Contact time

空白对照、参比样品或测试样品与测试细菌接触的时间。

3.5 校正因子 Correction factor

校正因子 f_{kt} 用于校正样品的初始发光强度。

3.6 相对发光单位 Relative light unit (RLU)

发光细菌在体内合成细菌荧光酶，催化还原型的黄素单核苷酸及长链脂肪醛发生氧化反应而释放的光量子数的测量单位。

3.7 相对发光强度 Relative light intensity

发光细菌与样品经过一定反应时间后的发光强度与反应前的发光强度的百分比值。

3.8 相对抑制率 Relative inhibition rate of light intensity

发光细菌与样品经过一定反应时间后的发光强度相对于反应前的发光强度所减少的百分比值。

3.9 效应浓度 Effective concentration (EC)

引起受试发光细菌发光强度相对抑制率达到一定程度所对应的样品浓度。比如相对抑制率达到50%所对应的为半数效应浓度，即 EC_{50} 。

3.10 最低无效应稀释度 Lowest ineffective dilution (LID)

平均相对抑制率小于20%时的稀释度。

3.11 毒性当量 Toxicity equivalent (TEQ)

与样品急性毒性相当的参比样品浓度。

3.12 毒性单位 Toxic unit (TU)

样品实际浓度与该样品的效应浓度的比值。

4 方法原理

发光细菌暴露在无毒性的水体中可以正常发光，当水体中含有环境毒物时，发光便会受到抑制，受抑制程度与毒物浓度之间有良好的正相关关系。本标准使用高通量的96孔板作为反应载体，通过生物发光检测仪测定系列稀释的环境水样（如地表水，地下水，饮用水、生活污水，工业废水及海水）与发光细菌接触一定时间后的发光强度变化，可以利用发光细菌的相对发光强度 (T_r)、相对抑制率 (H_r) 与稀释系列浓度的曲线关系获得效应浓度 (EC)、毒性当量 (TEQ)、毒性单位 (TU) 或最低无效应稀释度 (LID) 来表征水样的急性毒性水平并评价毒性程度。

5 干扰

5.1 浊度较高的样品会引起由于光吸收或者光散射导致的光损失，这类样品在分析之前需要通过静置、离心、过滤等方法进行处理。

5.2 pH 值过高或过低均会对发光细菌的发光产生影响。当样品 pH 值超出 6.0~8.5 的范围，若须测定包括 pH 值影响在内的急性毒性，则不需要调节样品 pH 值；若须测定排除 pH 值影响的急性毒性，则需要对样品 pH 值进行调节。

5.3 样品的盐度不宜太高，防止发光细菌发生高渗反应，测试样品终点盐度不应超过 3.5%。

6 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合GB/T 6682要求的实验用水，以及分析纯试剂。

6.1 菌种及配套试剂

发光细菌菌种及配套试剂包括：

- a) 费氏弧菌 (*Aliivibrio fischeri* NRRL B-11177) 冻干粉, -20 °C 冷冻保存;
- b) 复苏液及渗透压调节液, 与菌种冻干粉配套使用, 4 °C 以下冷藏保存。

6.2 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$

用于调节样品pH值。称取氢氧化钠40 g, 用水完全溶解后, 定容至1 L。加入量不超过样品体积的5%。

6.3 盐酸溶液: $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$

用于调节样品pH值。称取盐酸36.5 g, 用水定容至1 L。加入量不超过样品体积的5%。

6.4 重铬酸钾标准贮备液: $\rho(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 211.6 \text{ mg/L}$

精密称取重铬酸钾21.16 mg, 用水完全溶解后, 定容至100 mL。贮存于玻璃瓶内, 密封, 4 °C 冷藏可保存6个月。

6.5 七水合硫酸锌标准贮备液: $\rho(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 29 \text{ mg/L}$

精密称取七水合硫酸锌14.5mg, 用水完全溶解后, 定容至500 mL。贮存于玻璃瓶内, 密封, 4 °C 冷藏可保存6个月。

6.6 3,5-二氯苯酚标准贮备液: $\rho(\text{DCP}, \text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2) = 20.4 \text{ mg/L}$

精密称取3,5-二氯苯酚20.4mg, 用水完全溶解后, 定容至1000 mL。贮存于棕色玻璃瓶内, 密封, 4 °C 冷藏可保存6个月。

6.7 氯化钠溶液: $\rho(\text{NaCl}) = 20 \text{ g/L} (2\%)$

一般使用2 % 氯化钠 (NaCl) 溶液作为使用费氏弧菌进行测试的样品的渗透压调节液及样品稀释液。

称取氯化钠20 g, 用水完全溶解后, 定容至1 L。贮存于玻璃瓶内, 密封, 4 °C 冷藏可保存6个月。

6.8 不透光的带盖 96 孔板 (工作体积 $\geq 200 \mu\text{L}$)。

7 仪器和设备

7.1 适用于 96 孔板的、具有顶读及生物发光检测功能的仪器。

7.2 pH 计: 精确到 0.1 pH 单位, 测量范围从 0 到 14。

7.3 溶解氧测定仪: 精确到 0.1 mg/L。

7.4 盐度计: 精确到 0.1 mg/L 或 0.1%。

- 7.5 电子分析天平：精度为 0.0001 g。
- 7.6 培养箱：15℃，在一次测试中，温度偏差不超过±1℃。
- 7.7 冰箱：冷藏温度 2~8℃，冷冻温度-18℃以下。
- 7.8 涡旋混合器。
- 7.9 平板振荡器。
- 7.10 单通道移液器：200 μL、1 mL、5 mL、10 mL。
- 7.11 多通道移液器：200 μL。

8 样品

8.1 样品的采集

- 8.1.1 地表水、生活污水和工业废水的采集须符合HJ/T 91以及HJ 91.1要求的技术规范。
- 8.1.2 地下水的采集须符合HJ/T 164要求的技术规范。
- 8.1.3 饮用水的采集须符合GB/T 5750.2要求的技术规范。
- 8.1.4 海水样品的采集须符合GB 17378.3要求的技术规范。

8.2 样品的保存

采样瓶使用惰性材料制成（如聚四氟乙烯），务必清洁、干燥。采样时，水样应该充满容器，不留空气，密封。样品保存在放有冰袋的保温箱内运送回实验室，6小时内分析。若样品不能及时分析，应在 2~8℃ 的黑暗环境下冷藏保存，但不得超过 48 小时。可在-18℃ 以下保存长达两个月。样品的保存不添加任何化学试剂。

8.3 样品预处理

8.3.1 浊度调节

浊度较高的样品应采用静置沉淀 1 小时、离心（5000 g）10 分钟或过滤等方式进行处理。使用悬浮液、上清液或滤液进行测试。

8.3.2 溶解氧调节

测定样品的溶解氧，溶解氧浓度应高于 3 mg/L，如果低于 3 mg/L，使用曝气或搅拌等合适的方法提高溶解氧浓度。

8.3.3 pH 调节

测定样品的 pH 值，如在 6.0~8.5 范围内，无需调节 pH 值，如需要调节 pH 值，选择加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液或盐酸溶液，但加入酸碱的体积不得超过总体积的 5%。

经过 pH 值调节的样品，建议分别测定调节前后样品的发光细菌急性毒性，对结果进行对比分析。

8.3.4 盐度调节

用 20 g/L 氯化钠溶液进行盐度调节,测试样品终点盐度不应超过 3.5%。

样品盐度调节以后的体积增加量不得超过总体积的 10%。盐水样品测定的校正见附录 A。

9 分析步骤

9.1 测试温度

使用费氏弧菌测试时,控制测试温度在 14~16 °C,在一次测试中,温度偏差不超过±1 °C。

9.2 测试溶液的准备

根据 6.4~6.6 准备参比样品的标准贮备液,根据样品种类选择 1~3 种参比样品类型。

根据 6.7,准备样品和参比样品稀释液、空白对照组。

根据 8.3 预处理样品。

按附录 B,用稀释液逐级稀释经预处理的样品和参比样品标准贮备液,制备样品和参比样品的稀释系列。

将空白对照、样品和参比样品的稀释系列置于规定的测试温度下(见 9.1)。

9.3 发光细菌悬液的准备

从冰箱中取出冻干粉小瓶和复苏液,将菌体复苏液快速倒入冻干粉小瓶,并使用涡旋混合器(7.8)充分混匀,作为发光细菌母液,并置于 2~8 °C 下复苏至少 10 分钟后,再用稀释液(6.7)将发光细菌母液稀释到合适的发光强度,并使用涡旋混合器(7.8)充分混匀,作为发光细菌悬液,并保存在测试温度(9.1)下待用。

9.4 样品测试

每次试验设置空白对照、参比样品对照和样品组,每个组至少两个平行。

可测试的最小稀释度为 1→1.25 (80%样品, D=1),作为几乎未稀释的样品,可以通过将 4 体积的样品与 1 体积的细菌悬液(例如 160 μL 样品和 40 μL 细菌悬液)混合而制备,同时需要设置一个空白对照(D=1),通过 40 μL 细菌悬液和 160 μL 稀释液进行配制。其他稀释系列是由样品试验溶液和细菌悬浮液等体积混合的,空白对照(D=2)每孔加入 100 μL 细菌悬液和 100 μL 的稀释液,参比样品对照每孔加入 100 μL 细菌悬液和 100 μL 的参比样品溶液,样品组每孔加入 100 μL 细菌悬液和 100 μL 的样品溶液(见附录 B)。

参比样品对照和样品组 96 孔板排列方式参见附录 C。在 96 孔板(6.10)中,使用多通道移液器(7.11),每孔加入细菌悬液后,立刻置于测试温度下,等待 30 分钟后,用发光检测仪(7.1)测定发光强度,记录为 I_0 ;然后将样品或稀释后的样品迅速加入到细菌悬液中,使用平板振荡器轻轻振荡摇匀(7.9),并置于规定的测试温度下,在接触 5 分钟、15 分钟或 30 分钟时测定发光强度,分别记录为 I_5 、 I_{15} 、 I_{30} ,不同微孔板的测定间隔宜在 30 秒以内。

测试报告格式参见附录 D。

10 结果计算与表示

测试结果可以使用相对发光强度 (T_t)、相对抑制率 (H_t)，也可以计算得到效应浓度 (EC)、毒性当量 (TEQ)、毒性单位 (TU) 或最低无效应稀释度 (LID) 表示。

10.1 发光菌的抑制影响

根据空白对照的发光强度变化，使用公式 (1) 计算校正因子 f_{kt} 。

$$f_{kt} = I_{kt}/I_{k0} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

t ——反应时间，5分钟,15分钟,30分钟可选；

f_{kt} ——反应时间为 t 时的校正因子；

I_{kt} ——经过反应时间 t 后，空白对照的发光强度，单位为相对发光单位 (RLU)；

I_{k0} ——空白对照的初始发光强度，单位为相对发光单位 (RLU)。

使用公式 (2) 计算校正因子的相对偏差：

$$(\bar{f}_{kt} \pm f_{kti})/\bar{f}_{kt} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中：

\bar{f}_{kt} —— f_{kt} 的平均值；

f_{kti} ——为两个平行的校正因子的任何一个。

使用公式 (3) 计算样品初始发光强度 I_0 的校正值 I_{ct} ：

$$I_{ct}=I_0 \times \bar{f}_{kt} \dots\dots\dots(3)$$

式中：

I_{ct} ——添加样品前的校正值，单位为相对发光单位 (RLU)；

I_0 ——是添加样品或稀释样品前的发光强度，单位为相对发光单位 (RLU)；

\bar{f}_{kt} —— f_{kt} 的平均值。

使用公式 (4) 计算样品的相对发光强度 T_t 以及公式 (5) 计算相对抑制率 H_t ：

$$T_t = \frac{I_t}{I_{ct}} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

式中：

T_t ——测试样品的相对发光强度，单位为百分比 (%)；

I_t ——反应 t 时间后，样品的发光强度，单位为相对发光单位 (RLU)；

I_{ct} ——添加样品前的校正值，单位为相对发光单位 (RLU)。

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} \times 100\% \dots\dots\dots(5)$$

式中：

- H_t ——测试样品的相对抑制率，单位为百分比（%）；
 - I_{ct} ——添加样品前的校正值，单位为相对发光单位（RLU）；
 - I_t ——反应 t 时间后，样品的发光强度，单位为相对发光单位（RLU）。
- 使用公式（6）计算相对抑制率的相对偏差：

$$\bar{H}_t(\%) - H_{ti}(\%) \dots\dots\dots(6)$$

式中：

- \bar{H}_t —— H_t 的平均值，单位为百分比（%）；
- H_{ti} ——为两个平行的相对抑制率的任何一个，单位为百分比（%）。

10.2 计算 EC 值

使用合适标准线性或非线性回归分析计算浓度-效应曲线关系。

为计算浓度-效应关系，使用公式（7）计算稀释系列的 Γ_t （ t 时刻的发光损失率）：

$$\Gamma_t = [\bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t)] \dots\dots\dots(7)$$

式中：

- Γ_t ——经过反应时间 t 后的发光损失率；
- \bar{H}_t —— H_t 的平均值，单位为百分比（%）。

注：当某一浓度的相对抑制率为0%或100%时，发光损失率不能计算，因此通常计算浓度效应关系的 H_t 值在10%到90%之间。

使用公式（8）计算特定时间下的浓度效应关系：

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \dots\dots\dots(8)$$

式中：

- c_t ——样品浓度，单位为百分比（%）；
- b ——回归方程的斜率；
- Γ_t ——经过反应时间 t 后的发光损失率；
- $\lg a$ ——回归方程的截距。

通过最小二乘法计算 EC_{20} 和 EC_{50} 值的置信限：

$$\Gamma_t = 0.25 \text{ 时, } c_t = EC_{20,t};$$

$\Gamma_t=1.00$ 时, $c_t=EC_{50,t}$ 。

对于非线性回归分析, 各种模型可从统计软件中获得。计算得到的抑制效应 (H_t) 可直接用于估计非线性的浓度-效应关系的参数, 由此可推导出任何水平的EC值。

如果不能用曲线拟合, 则可以使用双对数坐标作图法估计EC值。

10.3 毒性当量 (TEQ)

建立并检验参比样品浓度 (C) 与其相对发光强度 (T_t) 均值的相关方程, 也可以绘制关系曲线。

a) 使用公式 (9) 求出一元一次线性回归方程的 a (截距)、 b (斜率、回归系数) 和 r (相关系数)

$$T_t = a + bC \dots\dots\dots (9)$$

式中:

T_t ——相对发光强度, 单位为百分比 (%) ;

a ——回归方程的截距;

b ——回归方程的斜率;

C ——参比样品浓度, 单位为毫克每升 (mg/L) 。

b) 也可以根据建立的上述方程绘制关系曲线。即指定相对发光强度为 10%和 90%, 代入上式, 求出相应的参比样品浓度, 在常数坐标纸上, 定出二点, 画一条直线, 即为符合该方程的参比样品浓度与相对发光强度的关系曲线。

将测得的样品相对发光强度, 代入上述方程, 求出与样品急性毒性相当的参比样品浓度 (一般用 mg/L) 。

10.4 毒性单位 (TU)

使用公式 (10) 计算毒性单位 (TU) 。

$$TU = 100/EC_{50} \dots\dots\dots (10)$$

式中:

TU——毒性单位;

EC_{50} ——相对抑制率达到 50%所对应的半数效应浓度, 单位为百分比 (%) 。

10.5 最低无效应稀释度 (LID)

当测试废水时, 逐级稀释, 平均相对抑制率小于20%时的稀释度用最低无效应稀释度 (LID) 表示, 稀释度由浓度比例表示 (如废水含量1:4 (25%体积比), 稀释度为D=4) 。

10.6 结果评价

对于排放到自然水体中的任何废水 (如生活污水、工业废水), 采用 EC_{50} 值或 TU 值评价样品的急性毒性, EC_{50} 值越小, 测试样品毒性越强 (见表 1); TU 值越大, 测试样品毒性越强 (见表 2) 。

表1 排入水环境中的废水水质急性毒性分级 (EC₅₀ 值)

毒性等级	EC ₅₀	毒性级别
I	<25%	强毒
II	25%~75%	毒
III	75%~100%	微毒
IV	>100%或求不出 EC ₅₀	无毒

表2 排入水环境中的废水水质急性毒性分级 (TU 值)

毒性等级	TU 值	毒性级别
I	TU<0.4	无毒
II	0.4≤TU<1	低毒
III	1≤TU<10	中毒
IV	10≤TU<100	重毒
V	TU≥100	高毒

11 精密度和准确度

以 EC₂₀ 和 EC₅₀ 表征发光细菌急性毒性测定结果，方法精密度如下：

实验室内对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的重复性进行验证，使用参比样品 3,5-二氯苯酚 (ρ=20.4 mg/L)、七水硫酸锌 (ρ=29 mg/L)、重铬酸钾 (ρ=211.6 mg/L) 及高毒、中毒、低毒三个环境样品进行测试，重复测定 5 次。参比样品 EC₂₀ 的实验室内相对标准偏差分别为 4.5%、28.0%、12.3%，EC₅₀ 的实验室内相对标准偏差分别为 8.3%、9.7%、11.3%。高毒环境样品的 EC₂₀ 均<3.13%，中毒环境样品的 EC₂₀ 的实验室内相对标准偏差为 17.3%，低毒环境样品的 EC₂₀ 均>80%；高毒环境样品的 EC₅₀ 均<3.13%，中毒环境样品的 EC₅₀ 的实验室内相对标准偏差为 8.8%，低毒环境样品的 EC₅₀ 均>80%。

五家验证单位对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的再现性进行验证，使用参比样品 3,5-二氯苯酚 (ρ 氯苯酚 (位对水质发光)、七水硫酸锌 (ρ、七水硫酸锌 (质)、重铬酸钾 (ρ、重铬酸钾 ((质发光细) 及高毒、中毒、低毒三个环境样品进行测试。参比样品 EC₂₀ 的实验室内相对标准偏差分别为 28.4%、24.4%、21.5%，EC₅₀ 的实验室内相对标准偏差分别为 27.2%、21.1%、13.0%。高毒环境样品的 EC₂₀ 均<3.13%，中毒环境样品的 EC₂₀ 的实验室内相对标准偏差为 26.3%，低毒环境样品的 EC₂₀ 大多>80%；高毒环境样品的 EC₅₀ 均<3.13%，中毒环境样品的 EC₅₀ 的实验室内相对标准偏差为 15.0%，低毒环境样品的 EC₅₀ 均>80%。

12 质量保证和质量控制

12.1 15 分钟或 30 分钟的 \bar{f}_{kt} 应介于 0.6~1.8 之间。

12.2 空白对照平均 \bar{f}_{kt} 值与各平行的相对偏差不应大于 10%。

12.3 平行样品的相对抑制率的相对偏差不应大于 10%。

12.4 经过 30 分钟的接触时间后, 3.4 mg/L 的 3,5-二氯苯酚、0.55 mg/L 的 Zn (II) (相当于 2.42 mg/L 的七水硫酸锌) 以及 18.7 mg/L 的 Cr (VI) (相当于 52.9 mg/L 的重铬酸钾) 的参比样品溶液应分别导致 20~80% 的相对抑制率。

12.5 若测试结果不符合 12.1~12.4 的要求, 需重新测定。

13 废物处置

实验中产生的废液和废物不可随意倾倒, 应置于密闭容器中保存, 委托有资质的单位进行处置。

附录 A

(规范性)

盐水样品测定的校正

A.1 背景信息

费氏弧菌是海洋菌，按照9中的标准过程测试海水样品的急性毒性，可能产生刺激发光作用。因此，需要对标准过程进行适当的修正，需要使用人工海水或人工咸水作为空白对照和稀释水。这种修正适用于海水和咸水样品。

A.2 定义

A.2.1 盐度 (S)

为了检查水质，可以用浓度表示可溶盐在海水中的量，单位g/kg，即样品在15 °C，1 atm下的电导率 (K_{15})，也可以用相同温度和压力的氯化钠溶液表示。

A.2.2 盐水样品

咸水或海水样品，盐度在5和35之间。

A.3 试剂与材料

A.3.1 参比样品

3,5-二氯苯酚；

七水硫酸锌 ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$)。

A.3.2 人工海水 (ASW) 和人工咸水 (ABW)

用去离子水配制人工海水 (ASW) 和人工咸水 (ABW)，按下表配制。所有试剂均为分析纯。

表A.1 人工海水和人工咸水

组分	人工海水 (g/L)	人工咸水 (g/L)
NaCl	22.0	14.19
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	9.7	6.26
Na ₂ SO ₄	3.7	2.39
CaCl ₂	1.0	0.65
KCl	0.65	0.42
NaHCO ₃	0.20	0.13
H ₃ BO ₃	0.023	0.015
水质参数		
电导率 (μS/cm) (20 °C)	47000 ± 1000	31000 ± 1000
盐度 (20 °C)	31 ± 1	20 ± 1
pH	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.2

A.4 操作

A. 4. 1 概述

按照标准程序准备细菌悬液，根据样品的盐度，使用人工海水（ASW）或人工咸水（ABW）作为空白对照和样品稀释水、参比样品稀释水。

表A. 2 标准程序与海水样品的发光细菌测试方法的比较

	标准程序	人工咸水	人工海水
样品的盐度	$x < 5$	$5 \leq x \leq 20$	$20 < x \leq 35$
参比样品稀释水	2%氯化钠溶液 (盐度为 20)	ABW (盐度为 20)	ASW (盐度为 31)
空白对照	2%氯化钠溶液 (盐度为 20)	ABW (盐度为 20)	ASW (盐度为 31)
稀释水	2%氯化钠溶液 (盐度为 20)	ABW (盐度为 20)	ASW (盐度为 31)

A. 4. 2 样品盐度在 $5 \leq x \leq 20$ 之间（咸水）

测样品的盐度，盐度 < 20 ，需要将盐度调整到20。测pH值，如果pH在7.0到8.5之间，不必调整，如果有必要调整，用氢氧化钠或盐酸调整到 7.5 ± 0.5 ，调整的体积不能超过总体积的5%。

使用人工咸水（ABW）（A.3.2）用于空白对照、样品稀释和参比样品稀释。

A. 4. 3 样品盐度在 $20 < x \leq 35$ （海水）

测样品的盐度和pH值，如果pH在7.0到8.5之间，不必调整，如果有必要调整，用氢氧化钠或盐酸调整到 7.5 ± 0.5 ，调整的体积不能超过总体积的5%。

使用人工海水（ASW）（A.3.2）用于空白对照、样品稀释和参比样品稀释。

附录 B

(资料性)

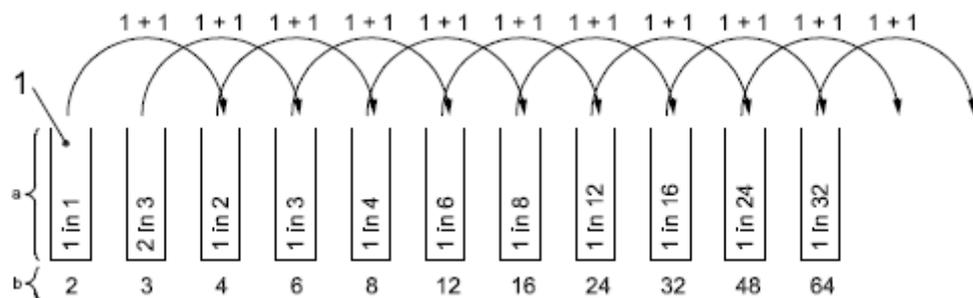
稀释系列

根据表B.1准备稀释系列。

表B.1 稀释系列的制备

稀释方法	稀释度 D	样品或稀释后的样品体积 μL	细菌悬液体积 μL
1→1.25	1	160	40
1→2	2	100	100
1→3	3	100	100
1→4	4	100	100
1→6	6	100	100
1→8	8	100	100
1→12	12	100	100
1→16	16	100	100
1→24	26	100	100
1→32	32	100	100
空白对照			
D=1		160	40
D \geq 2		100	100
注：准备这个稀释系列的最简单的方法是首先准备两个稀释的母液： a) 1→1稀释，即未稀释样品（与等体积的细菌悬液混合后，最终稀释为1→2）； b) 2→3稀释，例如：2000 μL 样品+1000 μL 稀释液（6.7）（与等体积的细菌悬液混合后，最终稀释为1→3）。			

准备稀释系列的方法见图B.1：



注：

1——样品

a——样品稀释

b——在96孔板中添加样品溶液后的稀释度D

图B.1 稀释系列

参比样品稀释系列分别见表B.2和B.3。

表B.2 参比样品稀释系列（费氏弧菌）

参比样品	配制浓度（逐级稀释）	暴露浓度
3,5-二氯苯酚	1.28、1.70、2.55、3.40、5.10、6.80、10.20、13.60、20.40、mg/L （贮备液浓度20.4 mg/L）	0.638、0.850、1.28、1.70、2.55、3.40、5.10、6.80、10.2、16.3 mg/L
七水硫酸锌	1.81、2.42、3.63、4.83、7.25、9.67、14.50、19.33、29.00mg/L （贮备液浓度29.00mg/L）	0.906、1.21、1.81、2.42、3.63、4.83、7.25、9.67、14.5、23.2 mg/L
重铬酸钾	13.23、17.63、26.45、35.27、52.90、70.53、105.80、141.07、211.60 mg/L （贮备液浓度211.60 mg/L）	6.61、8.82、13.23、17.63、26.45、35.27、52.90、70.53、105.80、169.28 mg/L

附录 C

(资料性)

96 孔板布局图

空白对照组、参比样品对照组和样品组的96孔板试验排列方式参见表C.1，样品组96孔板试验排列方式参见表C.2。

表C.1 96 孔板排列方式

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	B2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
B	B1	B2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
C			R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
D			R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
E												
F												
G												
H												

注：空白对照 1 (B1) 和空白对照 2 (B2) 分别为 $D=1$ 和 $D \geq 2$ 的空白对照，R1~R10 浓度由低到高分别对应参比样品浓度（见附录 B）。C1~C10 对应样品的稀释度 D 分别为 32、24、16、12、8、6、4、3、2、1（见附录 B）。

附 录 D
(资料性)
测试报告

测试报告要求包括但不限于以下信息：

- a) 水样的标识，包括取样、保存时间和条件；
 - b) 原始水样的 pH 值和溶解氧浓度（mg/L 或%）；
 - c) 进行试验的日期；
 - d) 试验数据；
 - e) 样品预处理（如有），如调整后的 pH 值；
 - f) 发光细菌的制备；
 - g) 发光细菌来源、批号、接收日期和有效期；
 - h) 发光细菌的储存温度；
 - i) 结果表示；
 - j) 与本方法的任何偏离和可能影响结果的所有情况；
 - k) 参比样品测试结果。
-

《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》编制说明

（征求意见稿）

《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》编制组

2022年11月

项目名称：水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法

归口管理单位：上海市环境科学学会、江苏省环境监测协会、浙江省环境监测协会

起草单位：上海市检测中心、上海市环境监测中心、上海勘测设计研究院有限公司

参与验证单位：上海市环境监测中心；上海化工研究院；上海市检测中心；东华大学；上海锐浦环境科技发展有限公司；复旦大学

本文件主要起草人：陈晓倩、汤琳、张瑛、刘亚楠、吴阿娜、朱梦杰、龚海燕、陆松柳、刘海臣

目 录

1 项目背景.....	6
2 标准制订的必要性分析.....	6
3 国内外相关分析方法研究.....	11
4 标准制订的基本原则和技术路线.....	20
5 方法研究报告.....	21
6 质量保证和质量控制.....	44
7 方法验证.....	45
8 与开题报告的差异说明.....	51
9 标准征求意见稿技术审查情况.....	51
10 标准实施建议.....	51
11 标准征求意见情况（送审稿增加内容）.....	51
12 参考文献.....	52

《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

根据《上海市环境科学学会团体标准管理办法》的相关规定，学会团体标准领导小组和团体标准审查委员会对上海市检测中心申报的《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》团体标准立项申请进行了审查，于2020年3月4日组织专家论证，符合立项条件，批准立项。团体标准《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》由上海市检测中心、上海市环境监测中心和上海勘测设计研究院有限公司负责起草，标准归口管理单位为上海市环境科学学会、江苏省环境监测协会、浙江省环境监测协会。

1.2 工作过程

1) 成立标准编制组

2021年3月10日，上海市环境科学学会确定由上海市检测中心、上海市环境监测中心和上海勘测设计研究院有限公司共同承担编制《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》标准的任务。根据上海市环境科学学会的要求，标准编制组进而对《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》编制及相关问题进行了深入的讨论和工作计划安排，并对标准编制组的人员进行了责任和工作内容划分。

2) 查询国内外相关标准和文献资料

2021年3月至4月，标准编制组根据HJ 168-2020《环境监测分析方法标准制订技术导则》的相关规定，检索、查询和收集国内外相关标准和文献资料；标准编制组与江苏省苏州环境监测中心、复旦大学环境学院、广东省深圳生态监测中心站、上海化工院检测有限公司等验证实验室人员进行交流、调研，收集仪器相关性能指标、现场运行情况及技术水平。

2 标准制订的必要性分析

2.1 水质毒性的来源及环境危害

随着工农业生产的不断发展，进入环境中的毒性污染物呈现种类多样、数量剧增的趋势，对环境的危害趋于复杂化和综合化，由此引起的环境污染问题不断扩大、日益加剧，其中之重点问题即为水体污染。水体污染源主要包括点源、面源和内源三类。

点污染源是由于人类活动所排放的各类污水、废水多由管道收集后，集中排入水中，可分以下几类：

(1) 城镇生活污染源，主要来自家庭、学校、商业、旅游、城市公用设施等及其它排放的污水，其主要含有氮、磷、硫、悬浮物、溶解的有机物等。

(2) 工业污染源，主要来自工业生产过程中排放的废水，分为有机废水、无机废水、重金属废水、电镀废水等。

面污染源又称非点污染源，主要指农村无组织排放的废水、地表径流等，主要包括城镇地表径流污染、农田径流污染、农村生活污水及生活垃圾污染、水土流失及其污染、分散式畜禽养殖污染等五大类，主要污染物为有机物、化肥、农药等，其中氮、磷在农村地表径流中浓度很高。我国由于空气污染比较严重，通过沉降作用或者降水也会产生面源污染。

内污染源主要是溶解和沉积污染物质长期滞留在水体中或者水底累积形成内部污染源，城市附近湖泊由于长期接受废污水，都出现程度不同的内源污染。

水体为水生生物的繁衍生息提供了基本的场所，各种生物通过物质流和能量流相互联系并维持生命，形成了水生生态系统。其构成要素有非生物类物质、生产者、消费者和分解者四类。非生物类物质是指水、氧气、二氧化碳、氮和磷营养物质等作为生物生长原料的无机物质以及生物排泄物和死体等有机物质。生产者是指利用光能或无机物，合成有机细胞物质的生物，称为一级生产者。水环境中具有代表性的生产者是光合自养型的藻类及部分水生植物。另外，利用氧化能的化学合成自养型硝化细菌也属于生产者范畴。消费者是以生产者产生的有机物为食料的异养型生物，称为捕食者。浮游生物、鱼类、哺乳类动物等是典型的消费者，其中直接捕食生产者的称为一级消费者，捕食一级消费者的称为二级消费者，依此类推。分解者都是异养型生物，如细菌、真菌、放线菌及原生动物和一些小型无脊椎动物。它们分解生物死体和排泄物，使之成为简单的无机物质，供生产者再利用。

在正常的水生生态系统中，维持生命所必需的物质是在生态系统中循环往复利用的，各种水生生物各自组成水生生态系统十分重要的生命单元，各种群之间相互依存、相互制约、环环相扣，形成错综复杂的食物链，种群的数量和数量相对稳定，物种之间的相互关系都维持着一定动态平衡，也就是生态平衡。天然水体对排入其中的某些物质具有一定限度的自然净化能力，使污染的水质得到改善。但是如果污染物过量排放，超过水体自身的环境容量，这种功能就会丧失，从而导致水质恶化。水体受到严重污染后，首当其冲受害的是水生生物，主要有以下三个方面：

(一) 直接毒害

被污染的水体中的农药、多氯联苯、多环芳烃、酚、汞、铬、铅、镉、砷、氰、放射性元素、致病细菌等有害物质，它们具有很强的毒性，在水中达到一定浓度时，便可引起鱼类和其它水生生物急性中毒，有些还会蓄积在生物体内。

(二) 减少水体的溶氧量

生活污水和某些工业废水中常含有大量耗氧污染物。这些污染物在微生物作用下进行分解，消耗掉大量氧气。另外，当含有大量氮、磷等植物营养物质的生活污水、农田排水连续排入湖泊、水库、河水等处的缓流水体时，会造成水中营养物质过剩，便发生富营养化现象，导致藻类大量繁殖，水的透明度降低，失去观赏价值。同时，由于藻类繁殖迅速，生长周期

短，不断死亡，并被微生物分解，水中的溶解氧也要被大量消耗。

在正常大气压下，气温 20℃时，水中溶解氧为 9.17 mg/L，水中氧的这一含量完全能满足水生动物呼吸的需要，如果水中耗氧污染物和植物营养素数量过多，势必造成溶解氧缺乏，使水生动物呼吸困难，甚至窒息死亡。一些鱼类对水中溶解氧的要求很严格，如河流鱼要求氧含量为 8~127 mg/L，鲤鱼 6~87 mg/L，家养青鱼、草鱼等要求 5 mg/L 以上，当水体中的溶解氧不能满足鱼类要求时，鱼类便纷纷逃离，当下降到 1 mg/L 时，大部分鱼类窒息死亡。

（三）改变水生生物群落类型

由于不同的水生生物对环境的要求和适应能力不同，产生不同的反应，将导致种群发生变化，破坏水环境的生态平衡。许多敏感的种类可能消失，而一些忍耐型种类的个体大量繁殖起来。如果污染程度继续发展和加剧，不仅导致水生生物多样性的持续衰减，最终还会使水生生态系统的结构和功能遭到破坏。

水体污染不但对水生生态系统会产生一系列危害，加剧水资源紧缺，许多有害物质还可以通过饮用水和食物链等途径进入人体，并在人体内积累，危害人体健康与生命，其影响十分深远。

2.2 相关生态环境标准和生态环境管理工作的需要

1) 环境监管的迫切需求

环境监测,是指环境监测机构对环境质量状况进行监视和测定的活动。环境监测是通过对反映环境质量的指标进行监视和测定,以确定环境污染状况和环境质量的高低。环境监测的内容主要包括物理指标的监测、化学指标的监测和生态系统的监测。理化分析技术常用于单一理化指标的测试,能定量分析污染物中主要成分的浓度,但因水中有毒物质的多样性,实际应用中不可能对全部物质都分别实施检测;生态系统的监测主要是对生态环境中的各个要素、生物与环境之间的相互关系、生态系统结构和功能进行监控和测试,但不能直接、全面地反映各种有毒物质对环境的综合影响。而通过生物毒性检测技术,能够综合多种有毒物质的相互作用,判定水质的生物毒性,能够很好地弥补环境监测方法中存在的不足。水质生物毒性分为急性毒性、慢性毒性和遗传毒性等,其中急性毒性可以表明污染水体与生物短时间接触后对生物造成的损害,通过建立污染水体作用剂量与毒性效应关系,可以将损害程度量化,直观地反映污染水体对生物种群的影响,从而为水质的监测和综合评价提供科学依据,提供环境污染预警,更好地指导环境污染防治。因此,水质急性毒性检测已经逐步成为评价水质污染的重要手段之一。

水质急性毒性检测可以测定污染水体对生态系统中的生产者、消费者和分解者这 3 个层级的毒性效应,根据选取受试生物的不同,包括鱼类急性毒性测试法、藻类急性毒性测试法、大型溞急性毒性测试法和发光细菌急性毒性测试法等,这些方法可以灵敏而准确地反映水体急性毒性水平,然而前 3 种测试方法实验过程繁琐、工作量大、既昂贵、测试时间又长,不

适用于大批量水样的快速检测；而发光细菌生物机体小、种群数量大、生长繁殖快、保存简单方便、试验费用低、对环境变化的反应快、生长条件便利，在无毒性水体中可以正常发光，在受到环境毒物的影响时，发光便会受到抑制，受抑制程度与毒物浓度之间有良好的正相关关系，因此，可以利用发光细菌发光强度的变化来表征水质的急性毒性水平，也可选用参比毒物浓度、EC₅₀值(半数效应浓度)等来表征，而且当天即可得到结果。发光细菌急性毒性测试方法具有反应快、检测灵敏、操作简便、成本较低等优点，被广泛应用于饮用水^[1]、地表水^[2]、海水^[3]、工业废水^[4]、河流水体^[5]、污水处理厂进出水^[6]等水质生物毒性监测及化学品的急性毒性测试，在水质安全评价和水生生态保护中将起到重大的作用，其灵敏程度可与鱼类 96h 急性毒性试验相媲美^[7]，并与其他水生生物测定的毒性数据有一定的相关性。

中国国家标准 GB/T 15441-1995 《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》^[8]中采用氯化汞作为参比毒物，在检测样品的同时，制作一系列浓度的氯化汞与发光强度关系曲线。以样品的相对发光强度从标准曲线上查得对应的氯化汞浓度，则该样品的毒性即相当于该浓度氯化汞的毒性。所谓的 EC₅₀ 值是从毒理学的半数致死剂量引申而来的，在此是指使一组受试菌体相对发光强度为 50%时的样品的百分比浓度。显然，此值越小，毒性越大。这两种表征方法客观上均对污染水体的毒性大小给出了判断标准。为了更加直观地反映水质的毒性水平，可将毒性进行分级^[9-10]，水质急性毒性(发光细菌法)分级见表 1。

表 1 水质急性毒性（发光细菌法）分级

毒性等级	EC ₅₀ 值/%	HgCl ₂ 毒性当量/(mg · L ⁻¹)	毒性级别
I	>70	<0.07	低毒
II	50~70	0.07~0.09	中毒
III	30~50	0.09~0.12	重毒
IV	5~30	0.12~0.17	高毒
V	0~5	>0.17	剧毒

中国 2008 年颁布的《发酵类制药工业水污染物排放标准》(GB 21903-2008)^[11]、《化学合成类制药工业水污染物排放标准》(GB 21904-2008)^[12]、《提取类制药工业水污染物排放标准》(GB 21905-2008)^[13]、《中药类制药工业水污染物排放标准》(GB 21906-2008)^[14]、《生物工程类制药工业水污染物排放标准》(GB 21907-2008)^[15]、《混装制剂类制药工业水污染物排放标准》(GB 21908-2008)^[16]等 6 项制药废水排放标准中也首次提出水质的急性毒性 (HgCl₂ 毒性当量) 限值为 0.07mg/L，其推荐检测方法为 GB/T 15441-1995 《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》，可见该方法已经成为评价水环境质量的重要环节。黑龙江省地方标准 DB23/T 2750-2020 《水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法》^[17]中也规定了用氯化汞表达样品毒性，见表 2。

表 2 氯化汞表达样品毒性

相对发光强度 (RLI)	抑制率 (IR%)	等当的HgCl ₂ 溶液浓度C _{Hg} (mg/L)	毒性级别
90% < RLI ≤ 110%	-10 < IR ≤ 10	C _{Hg} < 0.03	无毒
80% ≤ RLI < 90%	10 ≤ IR < 20	0.03 ≤ C _{Hg} < 0.05	低毒
50% ≤ RLI < 80%	20 ≤ IR < 50	0.05 ≤ C _{Hg} < 0.09	中毒
30% ≤ RLI < 50%	50 ≤ IR < 70	0.09 ≤ C _{Hg} < 0.12	重毒
0% ≤ RLI < 30%	70 ≤ IR < 100	0.12 ≤ C _{Hg} < 0.16	高毒
RLI=0	IR=100	C _{Hg} ≥ 0.16	剧毒

但在实际应用过程中,由于传统的发光细菌毒性测试方法^[8]是根据孔式化学发光检测仪设计的,每次只能测试1个样品管,造成同批样品管间的测试存在一定的时间间隔,无法同时进行测定,使各测试样品与发光细菌的接触时间存在较大的差异,而且通量较低,将耗费大量的时间和人力;使用剧毒物质氯化汞作为毒性参照物,不仅在实验过程中对实验人员的健康不利,在进入环境后将进一步危害人类健康及生态环境,而且由于该物质管控严格,实验室很难获得,以至于环境监管部门很难以氯化汞作为毒性参照物进行试验,并对水质毒性进行评价,已难以满足管理部门的需要。

在水质环境的监测中,水体质量监测的及时性、有效性和检测方法灵敏度及准确度的保证至关重要。因此,建立新的高通量、快速、检测灵敏、操作简便、准确评价各类水质毒性的发光细菌毒性测定方法显得非常迫切、必要,不仅可以获得工业废水对水生生物的安全浓度,为合理的水质标准和废水排放标准提供科学依据,也可用于测试水体的污染程度,检查废水处理的有效程度。

2) 环境保护重点工作的要求

在《中共中央关于制定国民经济和社会发展第十四个五年规划和二〇三五年远景目标的建议》中提到要推动绿色发展,促进人与自然和谐共生,要持续改善环境质量,要增强全社会生态环保意识,深入打好污染防治攻坚战。继续开展污染防治行动,建立地上地下、陆海统筹的生态环境治理制度。强化多污染物协同控制和区域协同治理,加强细颗粒物和臭氧协同控制,基本消除重污染天气。治理城乡生活环境,推进城镇污水管网全覆盖,基本消除城市黑臭水体。推进化肥农药减量化和土壤污染治理,加强白色污染治理。加强危险废物医疗废物收集处理。完成重点地区危险化学品生产企业搬迁改造。重视新污染物治理。全面实行排污许可制,推进排污权、用能权、用水权、碳排放权市场化交易。完善环境保护、节能减排约束性指标管理。完善中央生态环境保护督察制度。积极参与和引领应对气候变化等生态环保国际合作。

在《中共上海市委关于制定上海市国民经济和社会发展第十四个五年规划和二〇三五年远景目标的建议》中提到要持续改善生态环境质量,加快建设生态宜居城市,将持续加大生态环境整治力度,系统推进水生态治理与修复,加快补齐污水污泥收集和处理处置等短板,启动生态清洁小流域建设,加大水源地建设保护力度,加强海洋生态修复与保护,以“生态

环境质量更为优良，大气、水、土壤、绿化等生态环境质量稳定向好，主要污染物排放总量持续减少”作为十四五”时期经济社会发展主要目标之一。

随着中国经济的持续快速发展，城市进程和工业化进程的不断加，环境污染日益严重，国家对环保的重视程度也越来越高。在开展环境保护工作的过程中，环境监测是必不可少的一环。环境监测是科学管理环境和环境执法监督的基础，其目的是准确、及时、全面地反映环境质量现状及发展趋势，根据环境质量标准评价环境质量；根据污染分布情况，追踪寻找污染源，为实现监督管理、控制污染提供依据；收集本底数据，积累长期监测资料，为研究环境容量、实施总量控制和目标管理、预测预报环境质量提供数据；为保护人类健康、保护环境，合理使用自然资源，制订环境法规、标准、规划等服务。

总而言之，环境监测是环境保护工作的重要组成部分，是人们认识环境、评价环境、掌握环境质量的重要手段，更是实现环境监管科学化的基础。要想改善城市环境质量，必须加强环境质量监测工作，使其为环境质量的有效管理提供全面、及时、准确的信息，推动环境保护工作的顺利开展。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

国际标准化组织（ISO）在 1998 年颁布了第一版发光细菌检测水质急性毒性的标准，即《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》（ISO 11348-3-1998）。随后，欧盟、法国、德国、英国等标准学会组织相继颁布等同采用了 ISO 11348-3-1998 的版本。随着研究的深入，ISO 在 2007 年发布了第二版，替代第一版，在 2018 年修订了标准中的 1 项条款^[18]。该方法中推荐采用费氏弧菌作为急性生物毒性的测试菌种，在 15℃ 温度下，以不含毒性物质的溶液作为对照，测试体系总体积约 1000μL，化学品或环境样品溶液与测试菌液接触 5 分钟、15 分钟或 30 分钟后，利用孔式发光检测仪测定化学品对发光细菌的抑制率。待测样品的毒性结果以 LID 值(达到 20% 平均抑制率时样品的稀释倍数)、EC 值(导致一定抑制率时样品的浓度)表示。该方法适用于废水、浸提液、淡水（表层水和地表水），海水和咸水、沉积物洗出液（淡水，咸水和海水）、间隙水或单一化学品。

国际标准化组织（ISO）又在 2010 年颁布了《水质.沉积物,其它固体和有色样品对费氏弧菌发光抑制作用的动力学测定(发光细菌动力学试验)》标准，即《Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)》（ISO 21338-2010）^[19]。该方法中推荐采用费氏弧菌作为急性生物毒性的测试菌种，在 15℃ 温度下，以不含毒性物质的溶液作为对照，测试体系总体积要求在 400~1000 μL 范围内，化学品或环境样品溶液与测试菌液接触 5 分钟、15 分钟或 30 分钟后，利用与测试管、比色皿或测试板等所选用的试验容器配套的光度计测定化学品对发光细菌的抑制率。待测样品的毒性结果以 LID 值(达到 20% 平均

抑制率时样品的稀释倍数)、EC 值(导致一定抑制率时样品的浓度)表示。该方法适用于沉积物及其悬浮液(淡水、半咸水和海水沉积物)、废水(尤其是混浊和有色的)、土壤、固体废物和其他固体物质的水提取物(例如沥滤液、洗脱液、淘析液)(尤其是混浊和有色的)。

国外科学家 Bolich 根据采用发光细菌法测定工业废水的急性毒性的试验结果,提出了按发光细菌百分数等级划分毒性级别^[20],如表 3 所示,国内也有很多科研人员采用此等级划分方法进行毒性判别。

表 3 发光细菌试验百分数法等级划分

EC ₅₀ 或 LC ₅₀	毒性级别	等级
< 25%	强毒	I
25% ~ 75%	毒	II
75% ~ 100%	微毒	III
> 100% 或求不出 EC ₅₀	无毒	IV

美国在水污染物排放管理中,采用毒性单位“TU”对废水综合毒性进行表达,毒性单位“TU”可以理解为废水导致产生急性毒性效应或慢性毒性效应的稀释倍数^[21],TU 值越大,测试样品毒性越强,如表 4 所示^[22]。

表 4 排入水环境中的废水水质急性毒性分级

毒性等级	TU 值	毒性级别
I	TU < 0.4	无毒
II	0.4 ≤ TU < 1	低毒
III	1 ≤ TU < 10	中毒
IV	10 ≤ TU < 100	重毒
V	TU ≥ 100	高毒

德国的水污染物排放标准直接使用了综合毒性指标,包括鱼卵毒性(T_{egg})、溞类毒性(T_D)、藻类毒性(T_A)、发光细菌毒性(T_L)和致突变性(基因毒性测试,umu 测试),以量化废水、饮用水等的毒性程度,并设定其排放限值,其中规定化工行业、废油预处理及吸附剂再生等行业和饮用水、冷凝水等处理行业的发光细菌毒性(T_L,以稀释倍数表达)限值分别为 32、4 和 12,具体涉及行业、指标及限值如表 5 所示^[23]。

表 5 德国水污染物排放标准中综合毒性指标及限值

行业	项目	限值	行业	项目	限值
涂层材料和树脂漆制造	T_{tox}	2	橡胶制造	T_{tox}	2
纤维板制造	T_{tox}	2	垃圾焚烧废气湿法处理	T_{tox}	2
纸浆制造	T_{tox}	2	无机颜料制造	T_{tox}	2
化学工业	T_{tox}	2	纺织染整工业	T_{tox}	2
	T_D	8	有色金属工业	T_{tox}	4
	T_A	16	金属处理和加工	T_{tox}	2~6
	T_L	32	氯碱工业	T_{tox}	2
	umu 测试	1.5	化纤工业	T_{tox}	2
废物生物处理设施	T_{tox}	2	炼焦工业	T_{tox}	2
铸造工业	T_{tox}	2	燃烧系统废气湿法处理	T_{tox}	2
制革工业	T_{tox}	2	固体废物地面贮存	T_{tox}	2
废油预处理及吸附剂再生等行业	T_{tox}	2	半导体生产	T_{tox}	2
	T_L	4	印刷出版业	T_{tox}	2
	T_D	4	洗毛工业	T_{tox}	2
钢铁工业	T_{tox}	2~6		T_D	2
饮用水、冷凝水等处理	T_L	12			

注：根据生物毒性测试方法，表中 T_{tox} 、 T_D 、 T_A 、 T_L 限值、umu 测试值均用稀释倍数表达。

3.2 国内相关分析方法研究

目前，国内测定水质的发光细菌急性毒性的标准方法有：

国家标准 GB/T 15441-1995 《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》^[8]；

山东省地方标准 DB37/T 4298-2020 《绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法》^[24]；

黑龙江省地方标准 DB23/T 2750-2020 《水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法》^[17]；

出入境检验检疫行业标准 SN/T 5103-2019 《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》^[25]。

以上标准都详细描述了实验室内对水样中急性毒性的检测过程和原理，这些标准方法的原理大致相同，都是利用发光细菌发光强度的变化检测水样的毒性，而且均是根据孔式化学发光检测仪设计的。当然，这些标准方法并不是完全一致的，其采用的测试菌种、毒性参考物质、测试体系、反应时间等略有不同，见表 6。

表 6 国内相关标准试验方法比较

指标	国家标准 GB/T 15441-1995 《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》	山东省地方标准 DB37/T 4298-2020 《绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法》	黑龙江省地方标准 DB23/T 2750-2020 《水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法》	出入境检验检疫行业标准 SN/T 5103-2019 《国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法》。
受试菌株	明亮发光杆菌 T3 小种 (Photobacterium phosphoreum T3 spp.)	费氏弧菌 (<i>Vibrio fischeri</i> NRRL B-11177)	青海弧菌 Q67	明亮发光杆菌 T3 小种 (Photobacterium phosphoreum T3 spp.)
参比物质及浓度	氯化汞 (HgCl ₂) (测试浓度 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.18、0.20、0.22、0.24 mg/L)	七水合硫酸锌 (ZnSO ₄ ·7H ₂ O) (测试浓度 6 mg/L、4 mg/L、2 mg/L、1 mg/L、0.5 mg/L 和 0.25 mg/L)	氯化汞 (HgCl ₂)	/
对照试验	3%氯化钠溶液	2%氯化钠溶液	0.85%氯化钠溶液	3%氯化钠溶液
测试体系	细菌悬液: 样品=10 μL: 2 mL 或 5 mL (总体积约 2 mL 或 5 mL)	细菌悬液: 样品=100 μL: 900 μL (总体积 1 mL)	细菌悬液: 样品=50 μL: 2 mL (总体积约 2 mL)	细菌悬液: 样品=50 μL: 1000 μL (总体积约 1 mL)
反应时间	15 分钟	5 分钟	15 分钟	5 分钟
温度	20-25 °C	调节室内温度与采样地温度接近	20-25 °C	15-25 °C
结果表达	EC ₅₀ 值 (稀释百分浓度) 或相对发光度 (%) 及相当的氯化汞浓度 (mg/L)	发光抑制率、EC ₅₀	相对发光度 (%) 及相当的氯化汞浓度 (mg/L)	相对发光度 (%)

3.3 文献资料研究

1672 年 BOYLE 观察到发光细菌所发出的光易被化学物质抑制, 引起科学界对细菌发光效应的大量研究。BULLICH 于 20 世纪 70 年代提出了水环境急性毒性检测的发光细菌法, 率先推出“Microtox Test”进行水环境急性毒性的测定。20 世纪 90 年代, 国际标准化组织 (ISO) 在 1998 年颁布了第一版发光细菌检测水质急性毒性的标准, 即《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》(ISO 11348-3-1998)。随后, 欧盟、法国、德国、英国等标准学会组织相继颁布等同采用了 ISO 11348-3-1998 的版本。我国于 1995 年颁布实施了《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441-1995)^[8]。

我国国家标准《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB / T 15441-1995) 的建立距今已二十多年, 随着科学的进步与技术的飞速发展, 人们对环境保护、人体健康安全等要求逐渐提高, 对微生物学的认知更加深入, 仪器设备更新换代的速度也越来越快, 使得国标中存在的一些不足之处日渐明显, 例如:

- (1) 使用剧毒物质氯化汞作为毒性参照物, 不仅在实验过程中对实验人员的健康不利,

在进入环境后将进一步危害人类健康及生态环境，而且由于该物质管控严格，实验室很难获得，以至于环境监管部门难以以氯化汞作为毒性参照物进行试验，并对水质毒性进行评价，已难以满足管理部门的需要；

(2) 所选菌种为明亮发光杆菌 T3 小种 (*Photobacterium phosphoreum* T3 spp.)，不是国际上通用的菌种，且该菌种为杆菌，与弧菌相比，杆菌本身活动性较弱，容易发生沉淀，造成光路上发光量下降，并且不同批次细菌发光强度差异较大，导致试验重现性降低；

(3) 要求发光细菌原始发光光强在 600mV~1900mV 范围内，以此来认定该批菌种有效。但是不同来源的发光细菌，其原始发光光强可能不同；不同类型的仪器，检测量程和灵敏度不同，结果输出形式不同，如果限定了发光细菌原始发光光强，大大缩小了该测试方法的应用范围；

(4) 没有排除溶解氧对综合毒性的影响，里面也没有涉及到要求调节溶解氧的问题；国标方法在测定排除 pH 影响在内的急性毒性时，忽略了待测样品本身的性质，主要含 Cu 的水样一律调节至 4.5，主要含其他金属的水样一律调节至 5.4，主要含有机化合物的水样一律调节至 7.0，为消除 pH 的影响，在忽略毒物性质的情况下，调节待测样品的 pH 值，这样很有可能会改变毒物的形态和性质。

除此之外，我国国家标准 GB/T 15441 (1995)^[8]和 ISO 标准 11348-3 (2007)^[18]等传统的发光细菌毒性测试方法均是根据孔式化学发光检测仪设计的，每次只能测试 1 个样品管，造成同批样品管间的测试存在一定的时间间隔，无法同时进行测定，虽然可以等间隔测试，但实际操作中很难将时间控制得非常精确，各测试样品与发光细菌的接触时间将存在一定的差异，而且将耗费大量的时间和人力，导致通量较低，每次可以测试的样品数量有限，不利于对大量样品的毒性筛查。

ISO 标准 21338 (2010)^[19]方法虽然可以应用于测试管、比色皿及测试板等多种试验容器，但其测试体系总体积要求在 400~1000 μ L 范围内，不适用于高通量的 96 孔板。

因此，为了降低人力、时间及经济成本，为了进一步提高测试通量、提高方法的科学性、实用性和规范性，为了满足企业和管理部门的需要，需进一步优化国内现行发光细菌检测方法，建立新的高通量、快速、检测灵敏、操作简便、准确评价各类水质毒性的发光细菌毒性测定方法。

针对国内现行发光细菌检测方法存在的不足，在综合考虑我国环境监测的实际情况的基础上，充分借鉴了国际标准化组织的标准《水质.水样对弧菌类光发射抑制影响的测定（发光细菌试验）.第 3 部分:使用冻干细菌法》(ISO 11348-3 : 2007) 和《水质.沉积物,其它固体和有色样品对费氏弧菌发光抑制作用的动力学测定（发光细菌动力学试验）》(ISO 21338 : 2010)，本项目将对国标方法中的毒性参照物、发光细菌菌种、发光细菌的有效性、溶解氧及 pH 等测试条件、测试方法、结果表达等内容进行优化改良，国内外相关试验方法与本标准的关系如表 7 所示。

本项目将选用 ISO 11348-3 (2007) 标准中推荐的重铬酸钾、硫酸锌、3,5-二氯苯酚作为毒性参照物,这 3 种物质毒性大小适中,既能保证对发光细菌的敏感性,又可减少对人体和环境的影响。而且在一定浓度范围内,能使发光细菌发光光强产生敏感而又缓和的梯度变化,使样品毒性既能用样品的稀释浓度表达,也能用毒性参照物的浓度(毒性当量)表达。

对于测试菌种,费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)是一种海洋细菌,自身活动性较强,目前在国际中使用及研究得比较多,是 ISO 11348-3 (2007) 标准中所推荐的菌种。因此本项目将选择费氏弧菌作为测试菌种,以便更加适用于毒性监测的应用。

对于发光细菌的有效性将参考 ISO 11348-3 (2007) 标准,只要在整个检测周期内发光光强自然变化能满足 $0.6 \leq f_k \leq 1.8$,即可认定该批菌种有效。而对于发光细菌原始发光光强则无需特定要求,只需稀释到仪器检测量程范围内,这样即可满足不同类型仪器的使用,扩大了适用范围。

对于溶解氧及 pH 等测试条件将参考 ISO 11348-3 (2007) 标准,通过搅拌或曝气等方式提高测试样品的溶解氧,以满足发光细菌的正常生长;同时在发光细菌可正常生长的情况下,将尽量避免调节 pH,从而避免改变测试样品的原始形态和性质。如果确实需要调节 pH,在不改变样品酸碱性的情况下,可调节测试样品的 pH 至发光细菌正常生长的 pH 范围的上限或下限。

相对于孔式的测试方法,采用带盖白色平底灭菌不透光 96 孔板作为测试容器,测试体系总体积缩小为 200 μ L,使用与 96 孔板适配的具有顶读及化学发光检测功能的仪器检测发光强度,每块板的 96 个孔可以同时测定,还可以进行动力学测定、绘制动力学曲线,进一步了解发光细菌与测试样品接触后发光强度的变化,根据 ISO 21338 (2010) 中所述,该方法可以克服样品中强烈颜色和混浊所带来的问题,不需要沉淀或离心混浊样品,也不需要进行 ISO 11348-3 (2007) 中所述的颜色校正,更具有自动化程度高、人为干扰少、简便、快速、高通量、准确、发光菌用量少等特点。

表 7 国内外相关试验方法与本标准的关系

指标	ISO 11348-3 (2007)	GB/T 15441 (1995)	本标准方法
适用范围	废水、浸提液、淡水(表层水和地表水),海水和咸水、沉积物洗出液(淡水,咸水和海水)、间隙水或单一化学品	工业废水、纳污水体及实验室条件下可溶性化学物质的水质急性毒性监测	地表水,地下水,饮用水、生活污水,工业废水及海水
受试菌株	费氏弧菌(<i>Vibrio fischeri</i>)	明亮发光杆菌 T3 小种(<i>Photobacterium phosphoreum</i> T3 spp.)	费氏弧菌(<i>Aliivibrio fischeri</i>)
参比物质及浓度	3.4 mg/L 3,5-二氯苯酚 2.2 mg/L Zn(II) (相当于 9.67 mg/L 的七水硫酸锌) 18.7 mg/L Cr (相当	氯化汞 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20、0.22、0.24 mg/L	3,5-二氯苯酚: 0.638、0.850、1.28、1.70、2.55、3.40、5.10、6.80、10.2、16.3 mg/L 七水硫酸锌: 2.42、3.22、4.83、6.45、9.67、12.89、19.34、25.78、38.68、61.88 mg/L

指标	ISO 11348-3 (2007)	GB/T 15441 (1995)	本标准方法
	于 52.9 mg/L 的重铬酸钾)		重铬酸钾 : 6.61、8.82、13.23、17.63、26.45、35.27、52.90、70.53、105.80、169.28 mg/L
样品采集	使用带盖的惰性清洁容器, 装满水样, 不留顶空(完全装满有助于挥发性物质留在溶液中)。	采样瓶使用带有聚四氟乙烯衬垫的玻璃瓶, 务必清洁、干燥。采集水样时, 瓶内应充满水样不留空气。采样后, 用塑胶带将瓶口密封。	地表水、生活污水和工业废水的采集须符合 HJ/T 91 以及 HJ 91.1 要求的技术规范。 地下水的采集须符合 HJ/T 164 要求的技术规范。 饮用水的采集须符合 GB/T 5750.2 要求的技术规范。 海水样品的采集须符合 GB 17378.3 要求的技术规范。
样品运输与保存	样品采集后尽快试验。如需保存, 一般黑暗保存于 2-5 °C, 保存时间应不超过 48 小时。如需保存 2 个月, 应保存在小于 -18 °C 以下, 不能使用化学保存方法。	毒性测试应在采样后 6 h 内进行。否则应在 2~5 °C 下保存样品, 但不得超过 24 h。	采样瓶使用惰性材料制成(如聚四氟乙烯), 务必清洁、干燥。采样时, 水样应该充满容器, 不留空气, 密封。样品保存在放有冰袋的保温箱内运送回实验室, 6 小时内分析。若样品不能及时分析, 应在 2~8 °C 的黑暗环境下冷藏保存, 但不得超过 48 小时。可在 -18 °C 以下保存长达两个月。样品的保存不添加任何化学试剂。
样品准备	1) 溶解氧调节 由于生物发光需要氧, 高耗氧或氧浓度较低的样品会导致发光细菌因氧缺乏产生抑制。因此样品的氧浓度应高于 3 mg/L, 如果低于 3 mg/L, 使用合适的方法提高氧浓度, 如曝气或搅拌。 2) pH 调节 酸碱度在 6.0 和 8.5 范围之外的样品会影响细菌的发光, 因此样品的 pH 值应在 6.0-8.5, 必要时, 可加入 1 mol/L 盐酸或 1mol/L 氢氧化钠溶液调节样品的 pH 值, 但调节样品 pH 很可能改变样品性质。根据测试的目的, pH 值可以调节到 7.0±0.2 或上限 (8.5±0.2) 或下限 (6.0±0.2)。盐酸或氢氧化钠溶液加入的体积不超过总体积的 5%。如调节了样品的 pH 值, 可能有必要对 pH 值调节过的和未调节过的样品都进行测试。 对于海水样品 (20<	对于含固体悬浮物的样品须离心或过滤去除, 以免干扰测定。 取事先加氯化钠至 3 g/100 mL 浓度的样品母液 2 mL 装入样品管。	1) 浊度调节 浊度较高的样品应采用静置沉淀 1 小时、离心 (5000 g) 10 分钟或过滤等方式进行处理。使用悬浮液、上清液或滤液进行测试。 2) 溶解氧调节 测定样品的溶解氧, 溶解氧浓度应高于 3 mg/L, 如果低于 3 mg/L, 使用曝气或搅拌等合适的方法提高溶解氧浓度。 3) pH 调节 测定样品的 pH 值, 如在 6.0~8.5 范围内, 无需调节 pH 值, 如需要调节 pH 值, 选择加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液或盐酸溶液, 但加入酸碱的体积不得超过总体积的 5%。 经过 pH 值调节的样品, 建议分别测定调节前后样品的发光细菌急性毒性, 对结果进行对比分析。 4) 盐度调节 用 20 g/L 氯化钠溶液进行盐度调节, 测试样品终点盐度不应超过 3.5%。 样品盐度调节以后的体积增加量不得超过总体积的 10%。盐水样品测定的校正见附录 A。

指标	ISO 11348-3 (2007)	GB/T 15441 (1995)	本标准方法
	<p>盐度≤ 35), 测样品的盐度和 pH 值, 如果 pH 在 7.0 到 8.5 之间, 不必调整, 如果有必要调整, 用 HCl 或 NaOH 调整到 7.5 ± 0.5, 调整的体积不能超过总体积的 5%。</p> <p>对于咸水样品 ($5\leq$ 盐度≤ 20), 测 pH 值, 如果 pH 在 7.0 到 8.5 之间, 不必调整, 如果有必要调整, 用 HCl 或 NaOH 调整到 7.5 ± 0.5, 调整的体积不能超过总体积的 5%。</p> <p>3) 盐度调节</p> <p>由于试验生物费氏弧菌是一种海洋细菌, 海洋发光细菌的最主要特征就是需要高渗透压、高盐度的环境以及对 Na 离子的依赖, 必需有一定浓度的 Na 离子存在的外界条件下才能生长和发光, 因此需要在水样或中性水样中加入每升 20 克氯化钠, 对盐度进行调节。</p> <p>如果样品中有等渗成分, 相当于 20g/L 至 50 g/L NaCl 的渗透性, 则不加盐。</p> <p>对于咸水样品 ($5\leq$ 盐度≤ 20), 测样品的盐度, 盐度< 20, 需要将盐度调整到 20。</p> <p>对于高盐浓度的样品, 测量盐度, 调整至 20g/L NaCl 的渗透压。最终样品中盐的浓度不应超过 35g/L 氯化钠溶液的渗透性。</p> <p>4) 非常浑浊的样品应静置 1 小时或离心 (如 5000 g 离心 10 分钟), 或过滤。使用上清液或滤液进行试验。</p>		
菌种复苏	从冷冻冰箱中取出	从冰箱冷藏室 2-5 °C 取出含有	从冰箱中取出冻干粉小瓶和复苏

指标	ISO 11348-3 (2007)	GB/T 15441 (1995)	本标准方法
	<p>冻干粉小瓶,快速倒入 1 mL 冷却 (4±3 °C)的去离子水,从而在再水化过程中最大限度地减少细胞损伤。重要的是要迅速加入菌体复苏液,不要用移液枪,不要求精确的体积,让细菌立即与菌体复苏液接触,从而避免重聚和活性损失。细菌悬液母液中含细菌 10⁸ 个/mL 以上,保存在 4±3 °C 下,至少等待 10 分钟后使用。再冷冻,再水化的细菌只能用于预试验。</p> <p>在 4 °C±3 °C 的条件下,将 1 体积的细菌悬液母液加入 50 体积冷却 (4±3 °C) 的冻干细菌培养基中,并充分混合,作为细菌悬液,保存在 4±3 °C 下,至少等待 15 分钟后使用。</p>	<p>0.5 g 发光细菌冻干粉的安瓿瓶和氯化钠溶液,投入置有冰块 1-1.5 L 保温瓶,用 1 mL 注射器吸取 0.5 ml 冷的氯化钠 2 g/100 mL(适用于 5mL 测试管)或 1 mL 冷的 2.5%氯化钠(适用于 2 mL 测试管)注入已开口的冻干粉安瓿瓶,务必充分混匀。2 分钟后菌即复苏发光(可在暗室内检验,肉眼应见微光)。备用。</p>	<p>液,将菌体复苏液快速倒入冻干粉小瓶,作为发光细菌母液,并置于 2~8 °C 下复苏至少 10 分钟后,再用稀释液(标准文本 6.7)将发光细菌母液稀释到合适的发光强度,并充分混匀,作为发光细菌悬液,并保存在测试温度(标准文本 9.1)下待用。</p>
试验条件(温度、pH、溶解氧)	<p>温度: 14~16 °C±0.3 °C</p> <p>样品的 pH 值应在 6.0-8.5,必要时,可加入 1 mol/L 盐酸或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节样品的 pH 值,但调节样品 pH 很可能改变样品性质。根据测试的目的,pH 值可以调节到 7.0±0.2 或上限 (8.5±0.2) 或下限 (6.0±0.2)。盐酸或氢氧化钠溶液加入的体积不超过总体积的 5%。如调节了样品的 pH 值,可能有必要对 pH 值调节过的和未调节过的样品都进行测试。</p> <p>溶解氧: 高于 3 mg/L</p>	<p>温度: 20~25 °C±1 °C</p> <p>测定排除 pH 影响在内的急性毒性时,主要含 Cu 的水样调节至 4.5,主要含其他金属的水样调节至 5.4,主要含有机化合物的水样调节至 7.0。</p>	<p>费氏弧菌:</p> <p>温度: 14~16 °C±1 °C</p> <p>样品的 pH 值应在 6.0-8.5</p> <p>溶解氧: 高于 3 mg/L</p>
预实验	/	100%、10%、1%、0.1%、0.01%	/
正式试验	<p>根据试验目的和试验结果的统计要求设置浓度系列,如获得 EC₂₀、EC₅₀、最</p>	<p>在 1%~100% 相对发光度所落在的浓度范围内再增配 6~9 个浓度,每个浓度 3 个重复。</p>	<p>根据试验目的和试验结果的统计要求设置浓度系列,如获得 EC₂₀、EC₅₀、毒性当量、最低无效应稀释水平等,每个浓度至少 2 个平行</p>

指标	ISO 11348-3 (2007)	GB/T 15441 (1995)	本标准方法
	低无效应稀释水平等,每个浓度 2 个平行		
对照试验	2%氯化钠溶液	3%氯化钠溶液	费氏弧菌: 2%氯化钠溶液/人工海水/人工咸水
结果表达	EC ₂₀ 、EC ₅₀ 、最低无效应稀释水平	EC ₅₀ 、毒性当量	EC ₂₀ 、EC ₅₀ 、毒性当量、最低无效应稀释水平
精密度	/	样品 3 次重复测定结果的相对偏差应不大于 15%	/
质量控制	<p>阴性对照: 在 15 分钟或 30 分钟时, 值应该为 0.6 到 1.8 之间; 空白平行与平均值之间的偏差不能超过 3%; 样品的 LID 值(最低无效应浓度, 平均发光抑制率小于 20% 时的稀释水平 D 被认为 LID) 与平均值的偏差不能超过 3%;</p> <p>阳性对照: 用 3 种参比样品检测 30 分钟后的抑制率是否在 20-80% 之间: 3.4 mg/L 3,5-二氯苯酚 2.2 mg/L Zn(II) (相当于 9.67 mg/L 的七水硫酸锌) 18.7 mg/L Cr (相当于 52.9 mg/L 的重铬酸钾)</p>	/	<p>空白对照 15 分钟或 30 分钟的 \bar{f}_{kt} 应介于 0.6~1.8 之间。</p> <p>空白对照平均 \bar{f}_{kt} 值与各平行的相对偏差不应大于 10%。</p> <p>平行样品的相对抑制率的相对偏差不应大于 10%。</p> <p>经过 30 分钟的接触时间后, 3.4 mg/L 的 3,5-二氯苯酚、0.55 mg/L 的 Zn (II) (相当于 2.42 mg/L 的七水硫酸锌) 以及 18.7 mg/L 的 Cr (VI) (相当于 52.9 mg/L 的重铬酸钾) 的参比样品溶液应分别导致 20~80% 的相对抑制率。</p>

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, 测定结果以发光细菌的相对发光强度 (T_t)、相对抑制率 (H_t) 与稀释系列浓度的曲线关系获得效应浓度 (EC)、毒性当量 (TEQ)、毒性单位 (TU) 或最低无效应稀释度 (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。

本方法的性能也适宜用有效性来衡量, 以空白对照水样和参比样品对照水样进行质量控制, 空白对照 15 分钟或 30 分钟的 \bar{f}_{kt} 应介于 0.6~1.8 之间; 空白对照平均 \bar{f}_{kt} 值与各平行的相对偏差不应大于 10%; 平行样品的相对抑制率的相对偏差不应大于 10%; 经过 30 分钟的接触时间后, 3.4 mg/L 的 3,5-二氯苯酚、0.55 mg/L 的 Zn (II) (相当于 2.42 mg/L 的七水硫酸锌) 以及 18.7 mg/L 的 Cr (VI) (相当于 52.9 mg/L 的重铬酸钾) 的参比样品溶液应分别导致 20~80% 的相对抑制率。

4.2 标准制订的技术路线

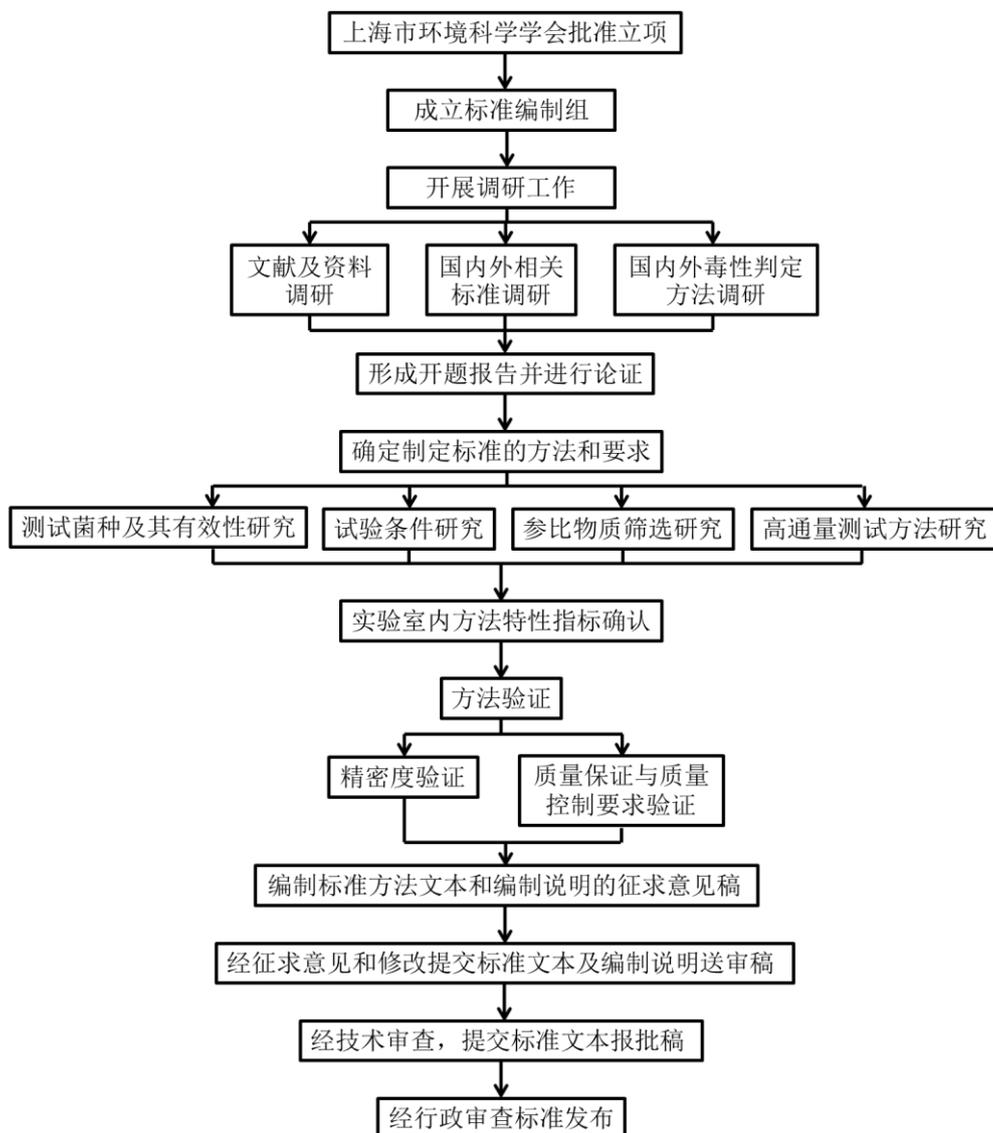


图 1 技术路线图

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

本标准规定了高通量测定水质急性毒性的发光细菌法, 适用于测定地表水, 地下水, 饮用水、生活污水, 工业废水及海水的发光细菌急性毒性。

5.1.2 本方法标准拟达到的特性指标要求

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, 测定结果以发光细菌的相对发光强度 (T_t)、相对抑制率 (H_t) 与稀释系列浓度的曲线关系获得效应浓度 (EC)、

毒性当量 (TEQ)、毒性单位 (TU) 或最低无效应稀释度 (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。

本方法的性能也适宜用有效性来衡量, 以空白对照水样和参比样品对照水样进行质量控制, 空白对照 15 分钟或 30 分钟的 \bar{f}_{kt} 应介于 0.6~1.8 之间; 空白对照平均 \bar{f}_{kt} 值与各平行的相对偏差不应大于 10%; 平行样品的相对抑制率的相对偏差不应大于 10%; 经过 30 分钟的接触时间后, 3.4 mg/L 的 3,5-二氯苯酚、0.55 mg/L 的 Zn (II) (相当于 2.42 mg/L 的七水硫酸锌) 以及 18.7 mg/L 的 Cr (VI) (相当于 52.9 mg/L 的重铬酸钾) 的参比样品溶液应分别导致 20~80% 的相对抑制率。

5.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

5.2.1 空白对照 Blank control

在实验室中用于检查或监控仪器或测量性能, 或监控研究过程中样品的变化。

根据 ISO 21338-2010 “Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)” 中对空白对照的定义 “sample used in a laboratory in order to check or monitor the instrument or measurement performance or to monitor changes in a sample under investigation” ——在实验室中用于检查或监控仪器或测量性能, 或监控研究过程中样品的变化。

5.2.2 参比样品 Reference substance

当从以前的试验中已知一种物质的效应或特性时, 并且当这种物质作为试验样品在试验体系内进行测试时, 这种物质被称为参比样品。

根据 ISO 21338-2010 “Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)” 中对参比样品的定义 “when the effect or behaviour of a substance is known from previous tests (reference substance) and when this substance is examined within the framework of a test series as test sample, this is called the reference sample” ——当从以前的试验中已知一种物质的效应或特性时, 并且当这种物质作为试验样品在试验体系内进行测试时, 这种物质被称为参比样品。

5.2.3 测试样品 Test substance

通过各种样品预处理方法制备的测试样品, 例如溶解、均质化、沉淀、过滤、中和或曝气。

根据 ISO 21338-2010 “Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)”中对测试样品的定义“test sample is made from the sample by means of various preparatory steps specific to the sample and the test, e.g. by dissolving, homogenizing, sedimenting, filtering, neutralizing or aeration”——通过各种样品预处理方法制备的测试样品, 例如溶解、均质化、沉淀、过滤、中和或曝气。

5.2.4 接触时间 Contact time

空白对照、参比样品或测试样品与测试细菌接触的时间。

根据 ISO 21338-2010 “Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)”中对接触时间的定义“*In the test, the contact time is the time available to control or sample for contact with the test bacteria*”——空白对照或样品与测试细菌接触的时间。

5.2.5 校正因子 Correction factor

校正因子 f_{kt} 用于校正样品的初始发光强度。

根据 ISO 21338-2010 “Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)”中对校正因子的定义“*In the test, the correction factor, f_{kt} , serves to correct the initial luminescence intensity of the sample.*”——校正因子 f_{kt} 用于校正样品的初始发光强度。

5.2.6 相对发光单位 Relative light unit (RLU)

发光细菌在体内合成细菌荧光酶, 催化还原型的黄素单核苷酸及长链脂肪醛发生氧化反应而释放的光量子数的测量单位。

根据“JJF1828-2020 ATP 荧光检测仪校准规范”中对相对发光单位的定义“三磷酸腺苷 (Adenosine Triphosphate, ATP) 水解为一磷酸腺苷 (Adenosine Monophosphate, AMP) 和焦磷酸盐释放化学能驱动荧光素在荧光素酶催化下氧化释放的光量子数的测量单位”。

5.2.7 相对发光强度 Relative light intensity

发光细菌与样品经过一定反应时间后的发光强度与反应前的发光强度的百分比值。

根据 DB44 T 1946-2016 “生物毒性水质自动在线监测仪技术要求 发光细菌法”中对相对发光度的定义“指加入受试样品的受试发光细菌发光度与对照发光度的比值, 单位为%”。

5.2.8 相对抑制率 Relative inhibition rate of light intensity

发光细菌与样品经过一定反应时间后的发光强度相对于反应前的发光强度所减少的百

分比值。

根据 DB37/T 4298 “绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法”中对光抑制率的定义“水样在一定的时间和条件下与发光细菌接触后，发光细菌的发光量降低的百分比”。

5.2.9 效应浓度 Effective concentration (EC)

引起受试发光细菌发光强度相对抑制率达到一定程度所对应的样品浓度。比如相对抑制率达到 50%所对应的为半数效应浓度，即 EC₅₀。

根据 DB37/T 4298 “绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法”中对半数效应浓度的定义“样品在一定的时间和条件下与发光细菌接触后，发光细菌的发光量减少 50 %时的样品浓度”。

5.2.10 最低无效应稀释度 Lowest ineffective dilution (LID)

平均相对抑制率小于 20%时的稀释度。

根据 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”中对接触时间的定义“The lowest D-value tested, at which the mean inhibitory effect \bar{H}_{30} is < 20 %, is called LID_{1b}.”——LID_{1b}是指平均相对抑制率小于 20%时的稀释度。

根据 ISO 21338-2010 “Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test)”中对最低无效应稀释度的定义“The LID value is the most concentrated test batch tested at which the inhibition of light emission is <20 %”——LID是指相对抑制率小于 20%时的稀释度。

5.2.11 毒性当量 Toxicity equivalent (TEQ)

与样品急性毒性相当的参比样品浓度。

根据 GB 21903-2008 “发酵类制药工业水污染物排放标准”4 水污染物排放控制要求，其中一项指标为急性毒性(氯化汞毒性当量)，其测定方法标准为 GB/T 15441-1995“水质 急性毒性的测定 发光细菌法”。

根据 GB/T 15441-1995 “水质 急性毒性的测定 发光细菌法”中对氯化汞毒性当量的描述“与样品急性毒性相当的氯化汞浓度（一般用 mg/L）”。

5.2.12 毒性单位 Toxic unit (TU)

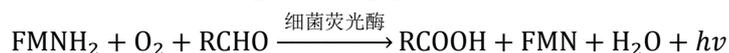
样品实际浓度与该样品的效应浓度的比值。

根据文献“综合毒性指标在水污染物排放标准中的应用探讨”中对毒性单位的描述“毒性单位“TU”可以理解为废水导致产生急性毒性效应或慢性毒性效应的稀释倍数，急性毒

性单位公式为 $TU_a=100/LC_{50}$ ”。

5.3 方法原理

发光细菌可以在体内合成细菌荧光酶，催化还原型的黄素单核苷酸及长链脂肪醛发生氧化反应而放出光子，这种氧化反应并不放热，是典型的“冷”光，其光波范围是 420-670 nm，最大发射波长为 475-485 nm，故呈蓝绿色。反应产物除光子发射之外，生成氧化型黄素单核苷酸及相应的脂肪酸。发光细菌发光过程的简略反应方程式为：



发光细菌暴露在无毒性水体中可以正常发光，当水体中含有环境毒物时，发光便会受到抑制，受抑制程度与毒物浓度之间有良好的正相关关系。本标准使用高通量的 96 孔板作为反应载体，通过生物发光检测仪测定系列稀释的环境水样（如地表水，地下水，饮用水、生活污水，工业废水及海水）与发光细菌接触一定时间后的发光强度变化，可以利用发光细菌的相对发光强度 (T_t)、相对抑制率 (H_t) 与稀释系列浓度的曲线关系获得效应浓度 (EC)、毒性当量 (TEQ)、毒性单位 (TU) 或最低无效应稀释度 (LID) 来表征水样的急性毒性水平并评价毒性程度。

参照 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“方法原理”的表述：The test criterion is the luminescence, measured after a contact time of 15 min or 30 min and optionally 5 min, taking into account a correction factor (f_{kt}), which is a measure of intensity changes of control samples during the exposure time. The inhibitory effect of the water sample can be determined as LID (see Annex B) or as EC_{20} - and/or EC_{50} -values by means of a dilution series. (EC is the effective concentration.)——在样品与发光细菌 (*Vibrio fischeri*) 接触 5、15、30 分钟后，计算样品的抑制作用，并考虑用于测定暴露时间内空白对照发光变化的校正因子 f_{kt} ，用 LID 或 EC_{20} 和/或 EC_{50} 值表示 (EC 是抑制作用浓度)。

参照 GB 15441-1995 “水质急性毒性的测定发光细菌法” 中“方法原理”的表述：基于发光细菌相对发光度与水样毒性组分总浓度呈显著负相关 ($P \leq 0.05$)，因而可通过生物发光光度计测定水样的相对发光度，以此表示其急性水平；水质急性毒性水平可按选用相当的参比物氯化汞浓度 (以 mg/L 为单位) 来表征，或选用 EC_{50} 值 (半数有效浓度，以样品液百分浓度为单位) 来表征。

参照 DB23/T 2750-2020 “水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法” 中“方法原理”的表述：水样在一定的时间和条件下与发光细菌接触后，发光细菌的发光强度变化与水样中毒性组分总浓度呈负相关关系，通过生物发光光度计测定水样与发光细菌接触一定时间后的发光抑制率来表征水样的急性毒性水平。

5.4 干扰

5.4.1 浊度较高的样品会引起由于光吸收或者光散射导致的光损失，这类样品在分析之前需要通过静置、离心、过滤等方法进行处理。

5.4.2 pH 值过高或过低均会对发光细菌的发光产生影响。当样品 pH 值超出 6.0~8.5 的范围，若须测定包括 pH 值影响在内的急性毒性，则不需要调节样品 pH 值；若须测定排除 pH 值影响的急性毒性，则需要对样品 pH 值进行调节。

5.4.3 样品的盐度不宜太高，防止发光细菌发生高渗反应。费氏弧菌测试样品终点盐度不应超过 3.5%。

以上操作是为了排除水样浊度、pH 值和盐度对测试效应的干扰，对测试过程和发光细菌无影响。

5.5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合 GB/T 6682 要求的实验用水，以及分析纯试剂。

5.5.1 菌种及配套试剂

发光细菌菌种及配套试剂包括：

a) 费氏弧菌 (*Aliivibrio fischeri* NRRL B-11177) 冻干粉，-20 °C 冷冻保存；

c) 复苏液及渗透压调节液，与菌种冻干粉配套使用，4 °C 以下冷藏保存。

根据 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” 5.1 Test bacteria: Use a strain of luminescence bacteria belonging to the species *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. The bacterial suspensions used for toxicity measurements are prepared from commercially available freeze-dried reagents which can be stored in a freezer at -18 °C to -20 °C. The bacteria start glowing immediately after reconstitution and are ready to be used for the test.——使用发光细菌费氏弧菌 (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177)。用于毒性测试的细菌悬液可以用商品化的保存在 -18 °C ~ -20 °C 的冻干菌。细菌可以在水化后立刻开始发光并用于测试。

5.5.2 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$

用于调节样品 pH 值。称取氢氧化钠 40 g，用水完全溶解后，定容至 1 L。加入量不超过样品体积的 5%。

根据 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” 5.3 Sodium hydroxide solution, e.g. $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$.——氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$ 。

5.5.3 盐酸溶液： $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$

用于调节样品pH值。称取盐酸36.5 g，用水定容至1 L。加入量不超过样品体积的5%。

根据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” 5.4 Hydrochloric acid, e.g. $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$. For the adjustment of the pH, it may be necessary to use acids or bases of lower or higher concentration.——盐酸溶液： $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$ 。为了调整pH值，可能需要使用浓度较低或较高的酸或碱。

5.5.4 重铬酸钾标准贮备液： $\rho(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 211.60 \text{ mg/L}$

精密称取重铬酸钾21.16 mg，用水完全溶解后，定容至100 mL。贮存于玻璃瓶内，密封，4 °C冷藏可保存6个月。

根据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” 5.6 Reference substances: Prepare the following reference-substance stock solutions with sodium chloride solution (5.2) as diluent separately, without adjustment of the pH:19,34 mg/l Zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), 6,8 mg/l 3,5-Dichlorophenol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$) (purity > 99 %), 105,8 mg/l Potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).——以氯化钠溶液(5.2)为稀释液，不调整pH，分别配制以下参比样品贮备液：19.34 mg/L七水硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$)，6.8 mg/L 3,5-二氯苯酚($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$)(纯度> 99%)，105.8 mg/L重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)。

为了获得能使发光细菌发光光强产生敏感而又缓和的梯度变化的稀释系列，并且在稀释系列中包含用于质量保证和质量控制的105.8 mg/L重铬酸钾，将211.60mg/L的重铬酸钾贮备液稀释2倍时可获得105.8 mg/L重铬酸钾。

5.5.5 七水合硫酸锌标准贮备液： $\rho(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 29 \text{ mg/L}$

精密称取七水合硫酸锌14.5 mg，用水完全溶解后，定容至500 mL。贮存于玻璃瓶内，密封，4 °C冷藏可保存6个月。

根据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” 5.6 Reference substances: Prepare the following reference-substance stock solutions with sodium chloride solution (5.2) as diluent separately, without adjustment of the pH:19,34 mg/l Zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), 6,8 mg/l 3,5-Dichlorophenol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$) (purity > 99 %), 105,8 mg/l Potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).——以氯化钠溶液(5.2)为稀释液，不调整pH，分别配制以下参比样品贮备液：19.34 mg/L七水硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$)，6.8 mg/L 3,5-二氯苯酚($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$)(纯度> 99%)，105.8 mg/L重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)。

为了获得能使发光细菌发光光强产生敏感而又缓和的梯度变化的稀释系列,并且在稀释系列中包含用于质量保证和质量控制的19.34 mg/L七水硫酸锌,将29 mg/L的七水硫酸锌稀释1.5倍时可获得19.34 mg/L七水硫酸锌。

5.5.6 3,5-二氯苯酚标准贮备液: ρ (DCP, $C_6H_4OCl_2$) =20.4 mg/L

精密称取3,5-二氯苯酚20.4 mg,用水完全溶解后,定容至1000 mL。贮存于棕色玻璃瓶内,密封,4 °C冷藏可保存6个月。

根据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” 5.6 Reference substances: Prepare the following reference-substance stock solutions with sodium chloride solution (5.2) as diluent separately, without adjustment of the pH:19,34 mg/l Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$), 6,8 mg/l 3,5-Dichlorophenol ($C_6H_4OCl_2$) (purity > 99 %), 105,8 mg/l Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$).——以氯化钠溶液(5.2)为稀释液,不调整pH,分别配制以下参比样品贮备液: 19.34 mg/L七水硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$), 6.8 mg/L 3,5-二氯苯酚($C_6H_4OCl_2$) (纯度> 99%), 105.8 mg/L重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)。

为了获得能使发光细菌发光光强产生敏感而又缓和的梯度变化的稀释系列,并且在稀释系列中包含用于质量保证和质量控制的6.8 mg/L 3,5-二氯苯酚,将20.4 mg/L的3,5-二氯苯酚稀释3倍时可获得6.8 mg/L的3,5-二氯苯酚。

5.5.7 氯化钠溶液: ρ (NaCl) =20 g/L (2%)

一般使用2 % 氯化钠(NaCl)溶液作为使用费氏弧菌进行测试的样品的渗透压调节液及样品稀释液。

称取氯化钠20 g,用水完全溶解后,定容至1 L。贮存于玻璃瓶内,密封,4 °C冷藏可保存6个月。

根据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” 5.2 Sodium chloride solution, as diluent: Dissolve 20 g of sodium chloride (NaCl) in water and make up to 1 l with water.——配制氯化钠溶液,作为稀释液,溶解20克氯化钠(NaCl)于水中,定容至1 L。

5.5.8 不透光的带盖96孔板(工作体积 $\geq 200 \mu L$)。

采用不透光的带盖96孔板作为测试容器,测试体系总体积缩小为200 μL ,使用与96孔板适配的具有顶读及化学发光检测功能的仪器检测发光强度,每块板的96个孔可以同时测定,更具有自动化程度高、人为干扰少、简便、快速、高通量、准确、发光菌用量少等特点。

5.6 仪器和设备

5.6.1 适用于 96 孔板的、具有顶读及生物发光检测功能的仪器。

标准文本9.4样品测试中要求在96孔板中，每孔加入细菌悬液后，立刻置于测试温度下，等待30分钟后，用发光检测仪测定发光强度，记录为 I_0 ；然后将样品或稀释后的样品迅速加入到细菌悬液中，并使用平板振荡器轻轻振荡摇匀，并置于规定的测试温度下，在接触5分钟、15分钟或30分钟时测定发光强度，分别记录为 I_5 、 I_{15} 、 I_{30} ，不同微孔板的测定间隔宜在30秒以内。

5.6.2 pH 计：精确到 0.1 pH 单位，测量范围从 0 到 14。

标准文本 8.3.3pH 调节中要求测定样品的 pH 值，如在 6.0~8.5 范围内，无需调节 pH 值，如需要调节 pH 值，选择加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液或盐酸溶液，但加入酸碱的体积不得超过总体积的 5%。

5.6.3 溶解氧测定仪：精确到 0.1 mg/L。

标准文本 8.3.2 溶解氧调节中要求测定样品的溶解氧，溶解氧浓度应高于 3 mg/L，如果低于 3 mg/L，使用曝气或搅拌等合适的方法提高溶解氧浓度。

5.6.4 盐度计：精确到 0.1 mg/L 或 0.1%。

标准文本 8.3.4 盐度调节中要求用 20 g/L 氯化钠溶液进行盐度调节，测试样品终点盐度不应超过 3.5%。

5.6.5 电子分析天平：精度为 0.0001 g。

用于配制标准文本 6 中的试剂。

5.6.6 培养箱：14~25 °C 之间，在一次测试中，温度偏差不超过 ±1 °C。

标准文本 9.1 测试温度中要求使用费氏弧菌测试时，控制测试温度在 14~16 °C。在一次测试中，温度偏差不超过 ±1 °C。

5.6.7 冰箱：冷藏温度 2~8 °C，冷冻温度 -18 °C 以下。

标准文本 6.1 菌种及配套试剂中要求费氏弧菌 (*Aliivibrio fischeri* NRRL B-11177) 冻干粉，-20 °C 冷冻保存；复苏液及渗透压调节液，与菌种冻干粉配套使用，4 °C 以下冷藏保存。

5.6.8 涡旋混合器。

标准文本 9.3 发光细菌悬液的准备中要求从冰箱中取出冻干粉小瓶和复苏液，快速倒入菌体复苏液，将菌体复苏液快速倒入冻干粉小瓶，并使用涡旋混合器充分混匀，作为发光细菌母液，并置于 2~8 °C 下复苏 10~15 分钟后，再用稀释液 (6.8 或 6.9) 将发光细菌母液稀释到合适的发光强度 (控制空白对照组的初始发光强度在 2 万 RLU 以上)，并使用涡旋混合器充分混匀，作为发光细菌悬液，并保存在测试温度 (9.1) 下待用。

5.6.9 平板振荡器。

标准文本 9.4 样品测试中要求在 96 孔板中，每孔加入细菌悬液后，立刻用发光检测仪测定发光强度，记录为 I_0 ；然后将样品或稀释后的样品迅速加入到细菌悬液中，并使用平板振荡器轻轻振荡摇匀。

5.6.10 单通道移液器：200 μ L、1 mL、5 mL、10 mL。

用于配制标准文本 9.2 测试溶液的准备和 9.3 发光细菌悬液的准备。

5.6.11 多通道移液器：200 μ L。

标准文本 9.4 样品测试中要求在 96 孔板中，使用多通道移液器，每孔加入细菌悬液。

5.7 样品

5.7.1 样品的采集

5.7.1.1 地表水、生活污水和工业废水的采集须符合 HJ/T 91 以及 HJ 91.1 要求的技术规范。

5.7.1.2 地下水的采集须符合 HJ/T 164 要求的技术规范。

5.7.1.3 饮用水的采集须符合 GB/T 5750.2 要求的技术规范。

5.7.1.4 海水样品的采集须符合 GB 17378.3 要求的技术规范。

本标准适用于测定地表水，地下水，饮用水、生活污水，工业废水及海水的发光细菌急性毒性，所以引用了以上 4 个采样技术规范。

5.7.2 样品的保存

采样瓶使用惰性材料制成（如聚四氟乙烯），务必清洁、干燥。采样时，水样应该充满容器，不留空气，密封。样品保存在放有冰袋的保温箱内运回实验室，6小时内分析。若样品不能及时分析，应在2~8 $^{\circ}$ C 的黑暗环境下冷藏保存，但不得超过48小时。可在-18 $^{\circ}$ C 以下保存长达两个月。样品的保存不添加任何化学试剂。

根据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” 7.1 Sampling: Collect samples in chemically inert, clean containers as specified in ISO 5667-16. Fill the containers completely and seal them. Test the samples as soon as possible after collection. Where necessary, store samples at 2 $^{\circ}$ C to 5 $^{\circ}$ C in the dark in the containers for not longer than 48 h. For periods up to two months, store at ≤ -18 $^{\circ}$ C. Do not use chemicals to preserve the samples. Perform the necessary pH-adjustment and salt addition immediately before testing.——在ISO 5667-16规定的化学惰性、清洁容器中收集样品。把容器装满并密封。样品采集后尽快测试。如有必要，可将样品置于2 $^{\circ}$ C至5 $^{\circ}$ C的黑暗环境中保

存,保存时间不超过48小时。可在 ≤ -18 °C保存长达两个月。不要使用化学品保存样品。在测试前立即进行必要的pH值调整和盐的添加。

5.7.3 样品预处理

5.7.3.1 浊度调节

浊度较高的样品应采用静置沉淀1小时、离心(5000 g)10分钟或过滤等方式进行处理。使用悬浮液、上清液或滤液进行测试。

根据 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” 7.2 Sample preparation: Strongly turbid samples should be allowed to settle for 1 h or centrifuged, for example for 10 min at 5000 g, or should be filtered. Use the supernatant or filtrate for the test.——浊度较高的样品应静置 1 小时或离心 10 分钟, 例如 5000 g 离心 10 分钟, 或应过滤。使用上清液或滤液进行试验。

5.7.3.2 溶解氧调节

测定样品的溶解氧,溶解氧浓度应高于3 mg/L,如果低于3 mg/L,使用曝气或搅拌等合适的方法提高溶解氧浓度。

根据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” 7.2 Sample preparation: Measure the oxygen concentration in all samples. An oxygen concentration > 3 mg/l is required for the test. If the oxygen concentration of the undiluted sample is less than 3 mg/l, use adequate methods to oxygenate the sample, e.g. aeration or stirring.——测定所有样品中的氧浓度。氧浓度应> 3 mg/L。如果未稀释样品的氧浓度小于 3 mg/L, 请使用适当的方法提高样品溶解氧浓度, 如曝气或搅拌。

5.7.3.3 pH 调节

测定样品的pH值,如在6.0~8.5范围内,无需调节pH值,如需要调节pH值,选择加入1 mol/L的氢氧化钠溶液或盐酸溶液,但加入酸碱的体积不得超过总体积的5%。

经过pH值调节的样品,建议分别测定调节前后样品的发光细菌急性毒性,对结果进行对比分析。

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” 使用费氏弧菌进行测试,根据7.2 Sample preparation: Measure the pH of all samples. If the pH is between 6,0 and 8,5, an adjustment is usually not necessary. Adjustment of the pH-value, however, may alter the nature of the sample. On the other hand, the pH of the sample and the pH of the test batch may differ because of the buffer capacity of the test medium.

It may be necessary to carry out tests on both the pH-adjusted and the non-pH-adjusted samples. If necessary, adjust the pH of the sample by adding either hydrochloric acid (5.4) or sodium hydroxide solution (5.3). Depending on the purpose of the test, the pH may be adjusted to 7.0 ± 0.2 or to the upper (8.5 ± 0.2) and lower limits (6.0 ± 0.2). Choose the concentration of the hydrochloric acid or the sodium hydroxide solution to restrict the volume added to not more than 5 % of total volume.——测定所有样品的pH值。如果pH值在6.0和8.5之间，通常不需要调整。然而，pH值的调整可能会改变样品的性质。另一方面，样品的pH值和测试组的pH值可能因测试介质的缓冲能力而不同。可能有必要对pH调整后的样品和非pH调整后的样品进行测试。如有必要，可通过加入盐酸(5.4)或氢氧化钠溶液(5.3)来调整样品的pH值。根据测试的目的，pH值可以调整到 7.0 ± 0.2 或上(8.5 ± 0.2)和下(6.0 ± 0.2)。选择盐酸或氢氧化钠溶液的浓度，限制加入体积不超过总体积的5%。

5.7.3.4 盐度调节

用 20 g/L 氯化钠溶液进行盐度调节,测试样品终点盐度不应超过 3.5%。

样品盐度调节以后的体积增加量不得超过总体积的 10%。盐水样品测定的校正见标准文本附录 A。

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”使用费氏弧菌进行测试，根据 7.2 Sample preparation: Add 20 g of sodium chloride per litre to the water sample or to the neutralized water sample. For samples with high salt concentrations, measure the salinity and add the amount of salt which is necessary to adjust the osmolarity to 20 g/l NaCl. If the sample contains between 20 g/l and 50 g/l NaCl-equivalents, add no salt. The resulting salt concentration in the test samples shall not exceed the osmolarity of a 35 g/l sodium chloride solution. For salt water samples, Annex D gives further information.——在水样或中性水样中，每升加入 20 g 氯化钠。对于盐浓度较高的样品，测定盐浓度，加入适量的盐，调节渗透压至 20 g/L 氯化钠。如果样品中有等渗成分，相当于 20g/L 至 50 g/L 氯化钠的渗透性，则不加盐。最终样品中盐的浓度不应超过 35 g/L 氯化钠溶液的渗透性。对于盐水样品，见附录 D。

5.8 分析步骤

5.8.1 测试温度

使用费氏弧菌测试时，控制测试温度在 14~16 °C，在一次测试中，温度偏差不得超过 ± 1 °C。

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” 使用费氏弧菌进行测试，根据 8.4 Test procedure: Carry out two parallel

determinations per dilution level at a test temperature of $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.——在 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的测试温度下，每稀释水平进行两次平行测定。

5.8.2 测试溶液的准备

根据标准文本 6.4~6.6 准备参比样品的标准贮备液，根据样品种类选择 1~3 种参比样品类型。

根据标准文本 6.7，准备样品和参比样品稀释液、空白对照组。

根据标准文本 8.3 预处理样品。

按标准文本附录 B，用稀释液逐级稀释经预处理的样品和参比样品标准贮备液，制备样品和参比样品的稀释系列。

将空白对照、样品和参比样品的稀释系列置于规定的测试温度下（见标准文本 9.1）。

根据 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” 8.1 Initial preparations: Prepare the reference samples according to 5.6. Test each batch of bacteria after delivery with all three reference substances. Test at least one of the three reference substances in parallel to each stock suspension vial reconstituted. Prepare the samples according to 7.2. Prepare, in a first set of test tubes (6.5), the sample dilution series, the reference sample (5.6) and the controls (5.2) required. A common procedure for the preparation of the dilution series is described in Annex B. Depending on the purpose of the test and the statistical requirements concerning the test results, other dilution designs with concentrations in a geometric or a logarithmic series may be appropriate as well. Due to mixing of equal volumes of sample/diluted sample and test suspension, the highest sample concentration in the test is 50 % sample as a rule. For the testing of nearly undiluted water samples (80 % sample), an extra control batch is needed (see B.2 and Table 1). Maintain the test tubes containing the sodium chloride solution (5.2) for controls, the reference samples (5.6), the samples (7.2) and the samples of the dilution series (Table B.1) at $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.——根据 5.6 准备参比样品。每批细菌接收时用三种参比样品进行测试。样品测试时，选择其中一种参比样品对配制的每瓶细菌悬液进行平行测试。根据 7.2 准备样品。在第一套试管(6.5)中准备所需的样品稀释系列、参比样品(5.6)和空白对照(5.2)。稀释系列制备的一般程序见附录 B。根据测试的目的和有关测试结果的统计要求，其他浓度为几何级数或对数级数的稀释设计也可能是适当的。由于样品试验溶液和细菌悬浮液是等体积混合的，测试中的最高样品浓度通常为 50%的样品母液。当对几乎未稀释的水样（80%样品）进行测试时，需要额外增加一个空白对照（见 B.2 和表 1）。维护包含氯化钠溶液的试管的控制，参比样品，的样品和样品稀释系列。将含有空白对照(5.2)、样品(7.2)和参比样品(5.6)的稀释系列(表 B.1)的测试管置于 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。

5.8.3 发光细菌悬液的准备

从冰箱中取出冻干粉小瓶和复苏液，将菌体复苏液快速倒入冻干粉小瓶，并使用涡旋混合器（标准文本 7.8）充分混匀，作为发光细菌母液，并置于 2~8 °C 下复苏至少 10 分钟后，再用稀释液（标准文本 6.7）将发光细菌母液稀释到合适的发光强度，并涡旋混合器（标准文本 7.8）充分混匀，作为发光细菌悬液，并保存在测试温度（标准文本 9.1）下待用。

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”使用费氏弧菌进行测试，根据 8.2 Preparation of stock suspension: Remove the vial of the freeze-dried culture (contents sufficient for up to 100 measurements) from the freezer immediately before reconstitution in water. For the reconstitution, cool 1 ml of distilled water in a glass test tube to 4 °C ± 3 °C. Pour this volume of cooled water all at once into the lyophilized bacteria in the vial, thereby minimizing cell damage during the rehydration process. It is important that water be added quickly, to allow the bacteria to come into contact with the water at once, thus avoiding clumping and loss of activity. Therefore, do not use a pipette. The exact volume of water is not critical. The reconstituted luminescent bacteria suspension (cell concentration about 10⁸ cells per millilitre) serves as a stock suspension; store it at 4 °C ± 3 °C. The stock suspension may be used for testing purposes, as long as the validity criteria stated in Clause 11 are met. Refrozen, rehydrated bacteria may be used for preliminary tests only.——从冷冻冰箱中取出冻干粉小瓶，快速倒入 1mL 冷却（4±3 °C）的去离子水，从而在再水化过程中最大限度地减少细胞损伤。重要的是要迅速加入去离子水，不要用移液枪，不要求精确的体积，让细菌立即与菌体复苏液接触，从而避免重聚和活性损失。细菌悬液母液中含细菌 10⁸ 个/mL 以上，保存在 4±3 °C 下。再冷冻，再水化的细菌只能用于预试验。

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”使用费氏弧菌进行测试，根据 8.3.1 Initial step: After a waiting time of at least 10 min, prepare the test suspensions from the stock suspension into a second corresponding set of test tubes (6.5), maintained at 15 °C ± 1 °C by one of the two variants.——等待至少 10 分钟后，将细菌悬液母液添加到第二组相应的测试管(6.5)中制备细菌悬液，并将细菌悬液置于 15 °C ± 1 °C。

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”使用费氏弧菌进行测试，根据 8.3.3 Variant B: Prepare the test suspensions outside the test tubes in a conical flask (volume e.g. 250 ml). Add 1 volume of the stock suspension to 50 volumes of the solution (5.5) maintained at 4 °C ± 3 °C and mix the resultant suspension thoroughly. Pipette 500 µl of test suspension into the test tubes, maintained at 15 °C ±

1 °C in the incubator, at the same time intervals (5 s to 20 s) as used for later intensity measurements.——在测试管以外的锥形烧瓶中准备细菌悬液(如 250 mL 体积)。将 1 体积的细菌悬液母液加入 50 体积的溶液(5.5), 置于 4 °C ±3 °C, 并将细菌悬液完全混合。将 500 μL 的待测细菌悬液移至测试管中, 在培养箱中, 保持在 15 °C ±1 °C, 之后用于按相同的时间间隔 (5~ 20 秒)测定发光强度。

5.8.4 样品测试

每次试验设置空白对照、参比样品对照和样品组, 每个组至少两个平行。

可测试的最小稀释度为 1→1.25 (80%样品, D=1), 作为几乎未稀释的样品, 可以通过将 4 体积的样品与 1 体积的细菌悬液 (例如 160 μL 样品和 40 μL 细菌悬液) 混合而制备, 同时需要设置一个空白对照 (D=1), 通过 40 μL 细菌悬液和 160 μL 稀释液进行配制。其他稀释系列是由样品试验溶液和细菌悬浮液等体积混合的, 空白对照 (D=2) 每孔加入 100 μL 细菌悬液和 100 μL 的稀释液, 参比样品对照每孔加入 100 μL 细菌悬液和 100 μL 的参比样品溶液, 样品组每孔加入 100 μL 细菌悬液和 100 μL 的样品溶液 (见标准文本附录 B)。

参比样品对照和样品组 96 孔板排列方式参见标准文本附录 C。在 96 孔板 (标准文本 6.8) 中, 使用多通道移液器 (标准文本 7.11), 每孔加入细菌悬液后, 立刻置于测试温度下, 等待 30 分钟后, 用发光检测仪 (标准文本 7.1) 测定发光强度, 记录为 I_0 ; 然后将样品或稀释后的样品迅速加入到细菌悬液中, 并使用平板振荡器轻轻振荡摇匀 (标准文本 7.9), 并置于规定的测试温度下, 在接触 5 分钟、15 分钟或 30 分钟时测定发光强度, 分别记录为 I_5 、 I_{15} 、 I_{30} , 不同微孔板的测定间隔宜在 30 秒以内。

测试报告格式参见标准文本附录 D。

根据 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” 8.4 Test procedure: Carry out two parallel determinations per dilution level at a test temperature of 15 °C ± 1 °C. Adjust the luminometer instrument to a convenient near-maximum setting. After a conditioning time of at least 15 min, determine and record the luminescence intensity, I_0 , of the test suspensions by means of a luminometer. As the contact time for all test samples shall be equal, use a chronometer (6.7) for the measurement of the luminescence intensities at equal time intervals, seriatim. An interval of 5 s to 20 s has been found convenient. Measure all samples, as differing luminescence may be expected due to possible inhomogeneities of the test suspension. Immediately after the luminescence measurement of a test suspension, make up this suspension to a total volume of 1 ml with samples (7.2), diluted samples (Annex B), reference sample (5.6) or sodium chloride solution (5.2), as appropriate, by pipetting 500 μl of each of the samples, diluted samples, reference sample or sodium chloride solution, prepared in the first set of test tubes, to the test suspensions in each of the corresponding tubes in

the second set of test tubes. Mix by hand, start the chronometer and put the test tubes back into the thermo-block at $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Repeat the above procedure for all other test tubes, leaving the same time interval between successive additions. Determine and record the luminescence intensity in all test tubes of the second set of test tubes, including controls, after, optionally, 5 min (I_5) and again after 15 min and 30 min (I_{15} , I_{30}), as required, at intervals of 5 s to 20 s. Record the instrument adjustment.——在 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的试验温度下, 每稀释水平测试 2 个平行。调整发光检测仪。在至少 15 分钟后, 用发光检测仪测定并记录细菌悬液的发光强度 I_0 。由于所有测试样品的接触时间应该相等, 使用计时器(6.7)在相等的时间间隔依次测量发光强度。5 到 20 秒的间隔较为合适。测试所有样品, 因为细菌悬液的不均匀性可能会导致不同的发光强度。然后立刻在含有细菌悬液的的第二组测试管中, 相应加入 500 μL 第一组测试管中的样品(7.2)、稀释的样品(附录 B)、参比样品 (5.6)或氯化钠溶液(5.2), 总体积为 1 mL。手动混匀, 启动计时器, 将测试管置于 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中。对所有其他测试管重复上述步骤, 每次添加的时间间隔相同。在接触 5 分钟、15 分钟或 30 分钟时测定第二组测试管的发光强度, 分别记录为 I_5 、 I_{15} 、 I_{30} , 每次间隔 5 到 20 秒。记录仪器的调整情况。

5.9 结果计算与表示

测试结果可以使用相对发光强度 (T_t)、相对抑制率 (H_t), 也可以计算得到效应浓度 (EC)、毒性当量 (TEQ)、毒性单位 (TU) 或最低无效应稀释度 (LID) 表示。

5.9.1 发光菌的抑制影响

根据空白对照的发光强度变化, 使用公式 (1) 计算校正因子 f_{kt} 。

$$f_{kt} = I_{kt}/I_{k0} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

t ——反应时间, 5分钟,15分钟,30分钟可选;

f_{kt} ——反应时间为 t 时的校正因子;

I_{kt} ——经过反应时间 t 后, 空白对照的发光强度, 单位为相对发光单位 (RLU);

I_{k0} ——空白对照的初始发光强度, 单位为相对发光单位 (RLU)。

根据 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” 9.1 Inhibitory effect on luminescent bacteria: Calculate the correction factor (f_{kt} -value) from the measured luminescence intensity using Equation (1): $f_{kt} = I_{kt} / I_0$ ($t = 5\text{ min}, 15\text{ min}, 30\text{ min}$) (f_{kt} is the correction factor for the contact time of 5 min, 15 min or 30 min; I_{kt} is the luminescence intensity in the control sample after the contact time of 5 min, 15 min or 30 min, in

relative luminescence units; I_0 is the luminescence intensity of the control test suspension, immediately before the addition of the diluent (5.2), in relative luminescence units.). This factor serves to correct the initial values I_0 of all test samples before they can be used as reference values for the determination of the water-dependent decrease in luminescence. ——根据测量到的发光强度, 利用式(1)计算校正因子: $f_{kt} = I_{kt} / I_0$ ($t = 5 \text{ min}, 15 \text{ min}, 30 \text{ min}$) (f_{kt} 是接触时间为 5 min、15 min、30 min 时的校正因子; I_{kt} 是接触时间分别为 5 min、15 min、30 min 后空白对照的发光强度, 单位为相对发光单位; I_0 是空白对照试验悬液在加入稀释剂 (5.2) 之前的发光强度, 以相对发光单位表示。) 这个因子用于校正所有测试样品的初始值 I_0 , 然后它们才能被用作测定发光的参考值。

使用公式 (2) 计算校正因子的相对偏差:

$$(\bar{f}_{kt} \pm f_{kti}) / \bar{f}_{kt} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

\bar{f}_{kt} —— f_{kt} 的平均值;

f_{kti} —— 为两个平行的校正因子的任何一个。

根据 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” 9.1 Inhibitory effect on luminescent bacteria: Calculate the mean correction factor \bar{f}_{kt} and the deviation of the individuals from the means in percent (one significant digit) using Equation (2): $[(\bar{f}_{kt} \pm f_{kti}) / \bar{f}_{kt}] \times 100$. (f_{kti} is either of the two individual values of the correction factor and \bar{f}_{kt} is the mean value.). ——使用公式 (2) 计算平均校正因子 \bar{f}_{kt} 和单个校正因子对平均值的偏差百分比 (一个有效数字): $[(\bar{f}_{kt} \pm f_{kti}) / \bar{f}_{kt}] \times 100$ (f_{kti} 是两个平行的校正因子的任何一个, \bar{f}_{kt} 是平均值)。

使用公式 (3) 计算样品初始发光强度 I_0 的校正值 I_{ct} :

$$I_{ct} = I_0 \times \bar{f}_{kt} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

I_{ct} —— 添加样品前的校正值, 单位为相对发光单位 (RLU);

I_0 —— 是添加样品或稀释样品前的发光强度, 单位为相对发光单位 (RLU);

\bar{f}_{kt} —— f_{kt} 的平均值。

根据 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” 9.1 Inhibitory effect on luminescent bacteria: Calculate I_{ct} using Equation

(3): $I_{ct} = I_0 \times \bar{f}_{kt}$ (\bar{f}_{kt} is the mean of f_{kt} ; I_0 is the luminescence intensity of the test sample suspension, immediately before the addition of the sample (7.2) or the diluted sample (Annex B), in relative luminescence units; I_{ct} is the corrected value of I_0 for test sample tubes immediately before the addition of the test sample). ——用式(3)计算 I_{ct} : $I_{ct} = I_0 \times \bar{f}_{kt}$ (\bar{f}_{kt} 是 f_{kt} 的均值; I_0 为试验样品悬浮液在加入样品(7.2)或稀释样品(附录B)之前的发光强度,以相对发光单位表示; I_{ct} 是测试样管在加入测试样管前 I_0 的修正值)。

使用公式(4)计算样品的相对发光强度 T_t 以及公式(5)计算相对抑制率 H_t :

$$T_t = I_t / I_{ct} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- T_t ——测试样品的相对发光强度,单位为百分比(%) ;
- I_t ——反应 t 时间后,样品的发光强度,单位为相对发光单位(RLU) ;
- I_{ct} ——添加样品前的校正值,单位为相对发光单位(RLU) 。

根据GB/T 15441-1995“水质 急性毒性的测定 发光细菌法”7.1计算样品相对发光度(%),并算出平均值:相对发光度(%)=氯化汞管或样品管发光量(mV)/CK管发光量(mV)×100。

$$H_t = (I_{ct} - I_t) / I_{ct} \times 100\% \dots\dots\dots(5)$$

式中:

- H_t ——测试样品的相对抑制率,单位为百分比(%) ;
- I_{ct} ——添加样品前的校正值,单位为相对发光单位(RLU) ;
- I_t ——反应 t 时间后,样品的发光强度,单位为相对发光单位(RLU) 。

根据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” 9.1 Inhibitory effect on luminescent bacteria: Calculate the inhibitory effect of a test sample using Equation (4): $H_t = [(I_{ct} - I_t) / I_{ct} \times 100]$ (H_t is the inhibitory effect of a test sample after the contact time of 5 min, 15 min or 30 min, in percent; I_{ct} see Equation (3); I_t is the luminescence intensity of the test sample after the contact time of 5 min, 15 min or 30 min, in relative luminescence units.). ——用式(4)计算测试样品的抑制作用: $H_t = [(I_{ct} - I_t) / I_{ct} \times 100]$ (H_t 是测试样品在接触时间为5min、15min或30min后的抑制作用,单位为百分比; I_{ct} 见式(3); I_t 为接触时间为5 min、15 min或30 min后被测样品的发光强度,以相对发光单位表示)。

使用公式(6)计算相对抑制率的相对偏差:

$$\bar{H}_t(\%) - H_{ti}(\%) \dots\dots\dots(6)$$

式中：

\bar{H}_t —— H_t 的平均值，单位为百分比（%）；

H_{ti} ——为两个平行的相对抑制率的任何一个，单位为百分比（%）。

根据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” 9.1 Inhibitory effect on luminescent bacteria: Calculate the mean of the inhibitory effect H_t for each dilution level, in percent. Calculate the arithmetic difference of the parallel determinations of H_{ti} from their respective mean H_t , in percent points (one significant digit): $\bar{H}_t(\%) - H_{ti}(\%)$ (H_{ti} is either of the two individual values of the inhibitory effects of a test sample and H_t is the mean value.). ——计算每个稀释水平的抑制率 H_t 的平均值，单位为百分比。计算 H_{ti} 间的算术差异，以百分数（一个有效数字）为单位： $H_t(\%) - H_{ti}(\%)$ (H_{ti} 是两个平行的相对抑制率的任何一个，而 H_t 是平均值)。

5.9.2 计算 EC 值

使用合适标准线性或非线性回归分析计算浓度-效应曲线关系。

为计算浓度-效应关系，使用公式（7）计算稀释系列的 Γ_t （ t 时刻的发光损失率）：

$$\Gamma_t = [\bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t)] \dots\dots\dots(7)$$

式中：

Γ_t ——经过反应时间 t 后的发光损失率；

\bar{H}_t —— H_t 的平均值，单位为百分比（%）。

注：当某一浓度的相对抑制率为0%或100%时，发光损失率不能计算，因此通常计算浓度效应关系的 H_t 值在10%到90%之间。

根据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 ” 9.1 Inhibitory effect on luminescent bacteria : Calculate the concentration-effect relationship for each exposure time using suitable standard linear or nonlinear regression analysis. For evaluation of concentration-effect relationships using a linear regression technique, evaluate, for each dilution level, the gamma value (ratio of light lost to the amount of light remaining at time t) using Equation (5): $\Gamma_t = [\bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t)]$ (is the gamma value of the test sample after the contact time of 5 min, 15 min or 30 min; \bar{H}_t is the mean of H_t). When a certain test concentration gives 0 % or 100 % inhibition of bioluminescence, the gamma value

cannot be calculated. Therefore, usually only H_t -values between 10 % and 90 % are used in the calculation of the concentration-effect relationship. ——使用适当的标准线性或非线性回归分析计算每个暴露时间的浓度效应关系。为了使用线性回归技术评估浓度-效应关系，对于每个稀释水平，利用式（5）评估伽马值(在时间 t 时光损失量与剩余发光量的比值)： $\Gamma_t = [\bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t)]$ (Γ_t 是测试样品在接触时间为5分钟、15分钟或30分钟后的伽马值； \bar{H}_t 是 Ht 的均值)。当某一测试浓度对生物发光有0%或100%的抑制时，伽马值无法计算。因此，通常只使用10%到90%之间的 Ht 值来计算浓度效应关系。

使用公式（8）计算特定时间下的浓度效应关系：

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \dots\dots\dots(8)$$

式中：

c_t ——样品浓度，单位为百分比（%）；

b ——回归方程的斜率；

Γ_t ——经过反应时间 t 后的发光损失率；

$\lg a$ ——回归方程的截距。

通过最小二乘法计算 EC_{20} 和 EC_{50} 值的置信限：

$\Gamma_t=0.25$ 时， $c_t=EC_{20,t}$ ；

$\Gamma_t=1.00$ 时， $c_t=EC_{50,t}$ 。

对于非线性回归分析，各种模型可从统计软件中获得。计算得到的抑制效应（ H_t ）可直接用于估计非线性的浓度-效应关系的参数，由此可推导出任何水平的 EC 值。

如果不能用曲线拟合，则可以使用双对数坐标作图法估计 EC 值。

根据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” 9.2 Determination of EC -values: The concentration-effect relationship at a given exposure time often can be described by the following linear equation: $\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a$ (c_t is the portion of the water sample within the test sample, in percent; Γ_t see Equation (5); b is the value of the slope of the described line; $\lg a$ is the value of the intercept of the described line). By means of standard least-squares regression statistics, calculate the EC_{20} - and EC_{50} -values with corresponding confidence limits, in which:—— $c_t=EC_{20,t}$ at $\Gamma_t=0.25$; $c_t=EC_{50,t}$ at $\Gamma_t=1.00$. For non-linear regression analysis, various models are available within standard graphic or statistical software packages. They are typically based on functions of the normal distribution (i.e. Probit analysis), the logistic distribution (i.e. Logit analysis), or the Weibull distribution (i.e. Weibull analysis). Calculated inhibitory effects (H_t) can be used directly to estimate parameters of the

nonlinear concentration-effect relationship, from which EC-values for any level might subsequently be derived. If the range of value pairs cannot be curve-fitted, the EC-values can be estimated graphically using a double logarithmic coordinate system. ——在一定的暴露时间内, 浓度-效应关系通常可以用以下线性方程来描述: $\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a$ (c_t 为测试样品中水样的比例, 单位为百分比; Γ_t 见式(5); b 为上述直线的斜率值; $\lg a$ 是上述直线的截距值)。利用标准最小二乘回归统计, 计算 EC_{20} 和 EC_{50} 值及其置信限, 其中 $\Gamma_t=0.25$ 时 $c_t=EC_{20,t}$; $\Gamma_t=1.00$ 时 $c_t=EC_{50,t}$ 。对于非线性回归分析, 各种模型在标准图形或统计软件包中可用。它们通常基于正态分布(即Probit分析)、logistic分布(即Logit分析)或Weibull分布(即Weibull分析)的函数。计算的抑制效应(H_t)可以直接用于估计非线性浓度-效应关系的参数, 由此可以推导出任何水平的EC值。如果值对的范围不能曲线拟合, 则可以使用双对数坐标系以图形方式估计EC值。

5.9.3 毒性当量 (TEQ)

建立并检验参比样品浓度 (C) 与其相对发光强度 (T_t) 均值的相关方程, 也可以绘制关系曲线。

- a) 使用公式(9)求出一元一次线性回归方程的 a (截距)、 b (斜率、回归系数) 和 r (相关系数)

$$T_t = a + bC \dots\dots\dots (9)$$

式中:

T_t ——相对发光强度, 单位为百分比 (%) ;

a ——回归方程的截距;

b ——回归方程的斜率;

C ——参比样品浓度, 单位为毫克每升 (mg/L) 。

- b) 也可以根据建立的上述方程绘制关系曲线。即指定相对发光强度为 10%和 90%, 代入上式, 求出相应的参比样品浓度, 在常数坐标纸上, 定出二点, 画一条直线, 即为符合该方程的参比样品浓度与相对发光强度的关系曲线。

将测得的样品相对发光强度, 代入上述方程, 求出与样品急性毒性相当的参比样品浓度 (一般用mg/L) 。

根据GB/T 15441-1995 “水质 急性毒性的测定 发光细菌法” 7.2符合5.1.2.3条件者, 建立并检验氯化汞浓度 (C)与其相对发光度 ($T, \%$) 均值的相关方程, 也可以绘制关系曲线:

- a.求出一元一次线性回归方程的 a (截距)、 b (斜率、回归系数) 和 r (相关系数), 列出方程: $T=a+bC_{\text{氯化汞}}$ 。查相关系数显著水平 (P 值) 表, 检验所求 r 值的显著水平。若 $P \leq 0.01$, 且 EC_{50} 氯化汞= $0.10 \text{ mg/L} \pm 0.02 \text{ mg/L}$, 则所求相关方程成立; 反之, 不能成立, 必须重测系列氯化汞浓度的发光量。氯化汞溶液配制过夜者, 必须重配后再测定。b.也可以据建立的上

述方程绘制关系曲线。即指定发光度为10%和90%，代入上式，求出相应的二个氯化汞浓度，在常数坐标纸上，定出二点，画一直线，即为符合该方程的氯化汞浓度与相对发光度的关系曲线。

5.9.4 毒性单位 (TU)

使用公式 (10) 计算毒性单位 (TU)。

$$TU = 100/EC_{50} \dots\dots\dots(10)$$

式中：

TU——毒性单位；

EC₅₀——相对抑制率达到 50%所对应的半数效应浓度，单位为百分比 (%)。

根据文献“综合毒性指标在水污染物排放标准中的应用探讨”中对毒性单位的描述“毒性单位“TU”可以理解为废水导致产生急性毒性效应或慢性毒性效应的稀释倍数，急性毒性单位公式为 $TU_a=100/LC_{50}$ ”。

5.9.5 最低无效应稀释度 (LID)

当测试废水时，逐级稀释，平均相对抑制率小于20%时的稀释度用最低无效应稀释度 (LID) 表示，稀释度由浓度比例表示 (如废水含量1:4 (25%体积比)，稀释度为D=4)。

根据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” 9.2 Determination of EC-values: B.1 Principle When testing waste water by means of a graduated dilution (D), the most concentrated test batch tested at which no inhibition, or only minor effects not exceeding the test-specific variability, were observed is expressed as “Lowest Ineffective Dilution (LID)”. This dilution is expressed as the reciprocal value of the volume fraction of waste water in the test batch (e.g. if the waste water content is 1 in 4 (25 % volume fraction) the dilution level is D = 4).——稀释度由浓度比例表示 (如废水含量1:4 (25%体积比)，稀释度为D=4)。

根据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” B.5 Expression of results: The lowest D-value tested, at which the mean inhibitory effect \bar{H}_{30} is < 20 %, is called LID_{1b}.——平均相对抑制率小于20%时的稀释度用最低无效应稀释度 (LID_{1b}) 表示。

5.9.6 结果评价

对于排放到自然水体中的任何废水（如生活污水、工业废水），采用EC₅₀值或TU值评价样品的急性毒性，EC₅₀值越小，测试样品毒性越强（见表8）；TU值越大，测试样品毒性越强（见表9）。

表 8 排入水环境中的废水水质急性毒性分级（EC₅₀ 值）

毒性等级	EC ₅₀	毒性级别
I	<25%	强毒
II	25%~75%	毒
III	75%~100%	微毒
IV	>100%或求不出 EC ₅₀	无毒

表 9 排入水环境中的废水水质急性毒性分级（TU 值）

毒性等级	TU 值	毒性级别
I	TU<0.4	无毒
II	0.4≤TU<1	低毒
III	1≤TU<10	中毒
IV	10≤TU<100	重毒
V	TU≥100	高毒

根据文献“发光细菌法在环境监测中的应用（王兆群等，2009）”中对工业废水的急性毒性等级划分的描述“Bolich根据采用发光细菌方法和采用鱼类、蚤类测定工业废水的急性毒性的试验结果，提出了3个毒性比较方法标准：①有毒/无毒，②百分数等级，③对数等级。其百分数等级划分标准为国内多数科研人员所采用，见表1”。

表 1 发光细菌试验百分数法等级划分

EC ₅₀ 或 LC ₅₀	毒性级别	等级
< 25 %	强毒	I
25 % ~ 75 %	毒	II
75 % ~ 100 %	微毒	III
> 100% 或求不出 EC ₅₀	无毒	IV

根据文献“A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters (Persoone et al., 2003)”中对排入水环境中的废水水质急性毒性分级的描述“Class I: no acute toxicity—none of the tests shows a toxic effect (i.e., an effect value significantly higher than that in the controls). Class II: slight acute toxicity—the effect percentage observed in at least one toxicity test is significantly higher than that in the control but is below 50% (<1 TU). Note bene: In analogy to the scoring system for natural waters, the 20% effect level can be used as the lowest PE considered to have a significant toxic impact. The 20%

effect corresponds to 0.4 TU (because 50% effect=1 TU, 20% effect is equivalent to 0.4 TU; 30% effect=0.6 TU, and 40% effect=0.8 TU). Class III: acute toxicity—the L(E)C₅₀ is reached or exceeded in at least one test, but in the 10-fold dilution of the sample the effect is less than 50% (=1–10 TU). Class IV: high acute toxicity—the L(E)C₅₀ is reached in the 10-fold dilution for at least one test but not in the 100-fold dilution (=10–100 TU). Class V: very high acute toxicity—the L(E)C₅₀ is reached in the 100-fold dilution for at least one test (≥ 100 TU).” —— I 级：无急性毒性——所有试验均未显示毒性效应(即效应值明显高于对照)。II 级：轻微急性毒性——至少一次毒性试验中观察到的效应百分比明显高于对照，但低于50% (<1 TU)。注：与自然水域的评分系统类似，20%的效应等级可以作为被认为具有显著毒性影响的最低PE。20%效应对应0.4 TU(因为50%效应=1 TU, 20%效应相当于0.4 TU; 30%效应=0.6 TU, 40%效应=0.8 TU)。III级：急性毒性——至少在一次试验中达到或超过L(E)C₅₀，但在10倍稀释的样品中效应小于50% (= 1-10 TU)。IV级：高急性毒性——在10倍稀释至少一次试验中达到L(E)C₅₀，但在100倍稀释(= 10-100 TU)中未达到。V级：非常高的急性毒性——在100倍稀释至少一次试验(≥ 100 TU)中可达到L(E)C₅₀。

6 质量保证和质量控制

- 6.1 15 分钟或 30 分钟的 \bar{f}_{kt} 应介于 0.6~1.8 之间。
- 6.2 空白对照平均 \bar{f}_{kt} 值与各平行的相对偏差不应大于 10%。
- 6.3 平行样品的相对抑制率的相对偏差不应大于 10%。
- 6.4 经过 30 分钟的接触时间后，3.4 mg/L 的 3,5-二氯苯酚、0.55 mg/L 的 Zn (II) (相当于 2.42 mg/L 的七水硫酸锌) 以及 18.7 mg/L 的 Cr (VI) (相当于 52.9 mg/L 的重铬酸钾) 的参比样品溶液应分别导致 20~80% 的相对抑制率。
- 6.5 若测试结果不符合标准文本 12.1~12.4 的要求，需重新测定。

根据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” 11Criteria of validity: The test is valid if: the \bar{f}_{kt} - value for 15 min or 30 min incubation ranges between 0,6 and 1,8; the parallel determinations do not deviate from their mean by more than 3 % for the control samples; for the test samples which determine the LID_{ib}-value, the deviation from their mean in “percent points” does not exceed 3 % points (see Note c in Table 1); for the batch of bacteria delivered, the three reference substances (5.6) (solutions not neutralized, check separately) cause 20 % to 80 % inhibition after 30 min of contact time at the following concentrations in the final test suspension: 3,4 mg/l 3,5-dichlorophenol; 2,2 mg/l Zn(II) (equivalent to 9,67 mg/l zinc sulfate heptahydrate); 18,7 mg/l Cr(VI) (equivalent to 52,9 mg/l potassium dichromate); one of these three reference substances (5.6) (solution not

neutralized) tested in parallel to each stock suspension vial reconstituted for the actual test (8.2) causes 20 % to 80 % inhibition after 30 min contact time.——在15分钟或30分钟时, \bar{f}_{kit} 值应该为0.6到1.8之间; 空白平行与平均值之间的偏差不能超过3%; 样品的LID_{1b}-值(最低无效应浓度)与平均值的偏差不超过3%; 每组细菌接收时用三种参比样品检测30分钟后的抑制率是否在20-80%之间: 3.4 mg/L的3,5-二氯苯酚、2.2 mg/L的Zn(II)(相当于9.67 mg/L的七水硫酸锌)、18.7 mg/L的Cr(VI)(相当于52.9 mg/L的重铬酸钾)。样品测试时, 选择其中之一。参比样品需要测平行。

7 方法验证

7.1 方法验证方案

组织五家有资质的实验室进行验证。工作主要内容是方法精密度、重复性及再现性的验证试验。

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五家实验室, 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。

方法精密度的验证: 两家验证单位对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的精密度进行验证, 使用空白对照进行测试, 空白对照1通过40 μ L细菌悬液和160 μ L稀释液进行配制, 空白对照2通过每孔加入100 μ L细菌悬液和100 μ L的稀释液进行配制。测试两组空白对照中5万、10万、20万、40万、80万RLU五个不同发光值的发光细菌悬液的发光值, 每个发光细菌悬液测试8个平行, 计算空白对照平均 \bar{f}_{k30} 值及其与各平行的相对偏差。

方法重复性的验证: 实验室内对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的重复性进行验证, 使用参比样品3, 5-二氯苯酚 ($\rho=20.4$ mg/L)、七水硫酸锌 ($\rho=29$ mg/L)、重铬酸钾 ($\rho=211.6$ mg/L)、草甘膦 ($\rho=20$ mg/L) 及高毒、中毒、低毒三个环境样品进行测试, 重复测定5次, 分别计算不同验证样品的EC₂₀、EC₅₀、标准偏差、相对标准偏差、相对抑制率的相对偏差。

方法再现性的验证: 五家验证单位对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的再现性进行验证, 标准编制组分别将高毒、中毒、低毒三个环境样品和10支费氏弧菌分配到各验证实验室, 各实验室自制参比样品工作液, 各验证实验室使用参比样品3, 5-二氯苯酚 ($\rho=20.4$ mg/L)、七水硫酸锌 ($\rho=29$ mg/L)、重铬酸钾 ($\rho=211.6$ mg/L)、草甘膦 ($\rho=20$ mg/L) 及高毒、中毒、低毒三个环境样品进行测试, 分别计算不同验证样品的EC₂₀、EC₅₀、标准偏差、相对标准偏差、相对抑制率的相对偏差; 分别计算空白对照平均 \bar{f}_{k30} 值及其与各平行的相对偏差, 检验其是否符合空白对照 \bar{f}_{k30} 在0.6~1.8之间、空白对照平均 \bar{f}_{k30} 值与各平行的相对偏差不大于3%的质控要求; 分别计算3.4 mg/L的3, 5-二氯苯酚、2.2 mg/L的Zn(II)(相当

于9.67 mg/L的七水硫酸锌)以及18.7 mg/L的Cr(VI)(相当于52.9 mg/L的重铬酸钾)的参比样品工作液的相对抑制率,检验其是否符合参比样品20~80%的相对抑制率。

编制组最终将《水质 发光细菌 高通量急性毒性测试方法》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。

7.2 方法验证过程及结论

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。

7.2.1 方法精密度

两家验证单位对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的精密度进行验证,使用空白对照进行测试,空白对照1通过40 μL细菌悬液和160 μL稀释液进行配制,空白对照2通过每孔加入100 μL细菌悬液和100 μL的稀释液进行配制。测试两组空白对照中5万、10万、20万、40万、80万RLU五个不同发光值的发光细菌悬液的发光值,每个发光细菌悬液测试8个平行。结果见表10和表11,空白对照的 f_{k30} 为0.48~1.03,大多数数据符合0.6~1.8的质控要求;空白对照平均 \bar{f}_{k30} 值与各平行的相对偏差数据范围为-9.1%~9.9%,部分超过3%的质控要求。

附表中:1)上海市环境监测中心;2)上海市检测中心。

表 10 方法精密度测试数据(空白对照 f_{k30})

	发光细菌悬液发光值(RLU)	实验室号	f_{k30}								范围	结论
空白对照 1	5 万	1	0.53	0.54	0.55	0.54	0.53	0.53	0.57	0.48	0.48~1.03	大多符合 0.6~1.8 的质控要求
	10 万		0.61	0.62	0.62	0.63	0.64	0.61	0.60	0.60		
	20 万		0.66	0.69	0.69	0.69	0.68	0.67	0.67	0.64		
	40 万		0.72	0.75	0.74	0.72	0.72	0.72	0.70	0.69		
	80 万		0.73	0.76	0.76	0.76	0.76	0.74	0.73	0.71		
	5 万	2	0.77	0.81	0.82	0.86	0.92	0.86	0.82	0.78		
	10 万		0.85	0.94	0.92	0.94	0.84	0.90	0.88	0.89		
	20 万		0.93	0.97	0.94	0.94	0.94	0.93	0.93	0.90		
	40 万		0.93	1.03	0.97	0.99	0.97	0.97	0.96	0.93		
	80 万		0.91	0.93	0.91	0.93	0.91	0.92	0.91	0.89		
空白对照 2	5 万	1	0.64	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.70	0.70	0.64~0.95	
	10 万		0.75	0.74	0.75	0.76	0.76	0.74	0.74	0.75		
	20 万		0.74	0.75	0.75	0.75	0.74	0.75	0.73	0.72		
	40 万		0.74	0.76	0.76	0.74	0.75	0.75	0.75	0.72		
	80 万		0.75	0.76	0.76	0.76	0.76	0.75	0.74	0.73		
	5 万	2	0.88	0.95	0.91	0.92	0.92	0.92	0.89	0.87		

10万	0.93	0.94	0.93	0.93	0.92	0.93	0.92	0.90
20万	0.92	0.94	0.91	0.91	0.90	0.91	0.91	0.88
40万	0.88	0.89	0.89	0.88	0.87	0.86	0.88	0.86
80万	0.81	0.82	0.81	0.82	0.81	0.80	0.80	0.79

表 11 方法精密度测试数据（空白对照 \bar{f}_{k30} 值与各平行的相对偏差）

	发光细菌悬液发光值 (RLU)	实验室号	与平均 \bar{f}_{k30} 值偏差 (%)								范围	结论
空白对照 1	5万	1	0.8	-1.5	-2.7	-1.9	0.7	0.9	-6.2	9.9	-9.1% ~9.9%	部分超过3%的质控要求。
	10万		0.5	-0.6	-1.2	-2.0	-2.9	1.1	2.9	2.3		
	20万		1.4	-2.0	-2.4	-1.9	-1.5	0.4	1.1	5.0		
	40万		0.0	-4.1	-2.1	-0.6	-0.4	0.4	2.5	4.2		
	80万		1.4	-2.1	-2.3	-2.5	-1.7	0.6	1.7	4.8		
	5万	2	7.3	2.4	0.8	-3.1	-9.1	-3.4	1.4	5.7		
	10万		5.2	-4.9	-2.4	-4.9	6.2	-1.0	1.7	0.1		
	20万		0.8	-3.9	-0.7	-0.3	-1.1	0.6	0.4	4.2		
	40万		4.3	-6.6	-0.5	-2.3	-0.2	0.1	1.3	3.9		
	80万		0.4	-1.7	0.4	-2.2	-0.1	-0.3	0.8	2.7		
空白对照 2	5万	1	8.4	-1.7	-2.2	-1.2	-1.1	-1.9	-0.7	0.3	-4.6% ~8.4%	
	10万		0.2	0.8	0.1	-1.1	-1.3	0.8	0.7	-0.1		
	20万		0.2	-1.4	-0.8	-1.0	-0.2	-0.5	1.2	2.6		
	40万		0.4	-1.6	-1.8	0.8	-0.3	-1.0	-0.3	3.8		
	80万		0.7	-1.2	-1.4	-1.1	-1.0	-0.3	0.9	3.4		
	5万	2	2.5	-4.6	0.1	-1.4	-1.6	-1.0	1.4	4.6		
	10万		-0.3	-1.9	-0.5	-0.5	0.2	-0.3	0.2	3.1		
	20万		-1.1	-2.9	-0.6	0.0	1.3	0.1	0.2	2.9		
	40万		-0.2	-1.5	-2.1	-0.2	1.0	1.5	-0.3	1.8		
	80万		0.1	-1.6	-0.5	-1.7	0.1	0.8	0.8	2.0		

7.2.2 方法重复性

实验室内对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的重复性进行验证，使用参比样品 3,5-二氯苯酚 ($\rho=20.4 \text{ mg/L}$)、七水硫酸锌 ($\rho=29 \text{ mg/L}$)、重铬酸钾 ($\rho=211.6 \text{ mg/L}$)、草甘膦 ($\rho=20 \text{ mg/L}$) 及高毒、中毒、低毒三个环境样品进行测试，重复测定5次，结果见表12、表13和表14。参比样品 EC_{20} 的实验室内相对标准偏差分别为4.5%、28.0%、12.3%、45.3%， EC_{50} 的实验室内相对标准偏差分别为8.3%、9.7%、11.3%、35.3%。高毒环境样品的 EC_{20} 均 $<3.13\%$ ，中毒环境样品的 EC_{20} 的实验室间相对标准偏差为17.3%，低毒环境样品的 EC_{20} 均 $>80\%$ ；高毒环境样品的 EC_{50} 均 $<3.13\%$ ，中毒环境样品的 EC_{50} 的实验室间相对标准偏差为8.8%，低毒环境样品的 EC_{50} 均 $>80\%$ 。各验证样品的相对抑制率的相对偏差范围为-9.0%~9.0%。

表 12 参比样品重复性测试数据 (EC)

	Cr(VI)		Zn(II)		3,5-二氯苯酚		草甘磷	
	EC ₂₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)						
X1	4.34	11.06	0.31	0.76	1.84	3.37	7.49	9.03
X2	4.71	13.32	0.23	0.70	1.59	4.40	7.50	9.70
X3	4.47	11.77	0.22	0.78	1.72	4.36	2.37	3.75
X4	4.50	12.17	0.42	0.89	1.90	4.00	3.46	5.63
X5	4.18	10.85	0.28	0.88	2.19	4.53	7.78	9.24
\bar{x} (mg/L)	4.44	11.84	0.29	0.80	1.85	4.13	5.72	7.47
S (mg/L)	0.20	0.98	0.08	0.08	0.23	0.47	2.59	2.64
RSD (%)	4.5	8.3	28.0	9.7	12.3	11.3	45.3	35.3

表 13 环境样品重复性测试数据 (EC)

	环境样品 1 (高毒)		环境样品 2 (中毒)		环境样品 3 (低毒)	
	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)
X1	<3.13	<3.13	8.73	23.46	>80%	>80%
X2	<3.13	<3.13	5.49	19.10	>80%	>80%
X3	<3.13	<3.13	7.37	23.42	>80%	>80%
X4	<3.13	<3.13	8.66	23.70	>80%	>80%
X5	<3.13	<3.13	7.68	21.61	>80%	>80%
\bar{x} (%)	-	-	7.59	22.26	-	-
S (%)	-	-	1.31	1.96	-	-
RSD (%)	-	-	17.3	8.8	-	-

表 14 参比样品及环境样品验证数据 (相对抑制率的相对偏差)

	相对抑制率的相对偏差范围 (%)					范围	结论
	X1	X2	X3	X4	X5		
Cr(VI)	±1.6	±2.6	±4.4	±4.2	±1.6	±4.4%	参比样品及环境样品相对抑制率的相对偏差范围为 ±9.0%
Zn(II)	±2.3	±1.3	±2.5	±1.8	±2.3	±2.5%	
3,5-二氯苯酚	±2.6	±3.1	±2.4	±5.1	±2.6	±5.1%	
草甘磷	±6.4	±1.7	±2.3	±4.1	±6.4	±6.4%	
高毒环境样品	±0.6	±1.2	±0.3	±0.6	±0.6	±1.2%	
中毒环境样品	±2.3	±2.8	±9.0	±2.7	±2.3	±9.0%	
低毒环境样品	±1.8	±3.1	±4.7	±4.0	±1.8	±4.7%	

7.2.3 方法再现性

五家验证单位对水质发光细菌高通量急性毒性测试方法的再现性进行验证,使用参比样品3,5-二氯苯酚($\rho=20.4\text{ mg/L}$)、七水硫酸锌($\rho=29\text{ mg/L}$)、重铬酸钾($\rho=211.6\text{ mg/L}$)、草甘磷($\rho=20\text{ mg/L}$)及高毒、中毒、低毒三个环境样品进行测试。参比样品及环境样品再

现性测试结果见表15、表16和表17。参比样品EC₂₀的实验室间相对标准偏差分别为28.4%、24.4%、21.5%、28.5%，EC₅₀的实验室间相对标准偏差分别为27.2%、21.1%、13.0%、26.2%。高毒环境样品的EC₂₀均<3.13%，中毒环境样品的EC₂₀的实验室间相对标准偏差为26.3%，低毒环境样品的EC₂₀大多>80%；高毒环境样品的EC₅₀均<3.13%，中毒环境样品的EC₅₀的实验室间相对标准偏差为15.0%，低毒环境样品的EC₅₀均>80%。各验证样品的相对抑制率的相对偏差范围为-6.4%~6.4%。

附表中：1) 上海市环境监测中心；2) 上海市检测中心；3) 上海化工研究院；4) 东华大学；5) 上海锐浦环境技术发展有限公司，下同。

表 15 参比样品再现性测试数据 (EC)

实验室号	Cr(VI)		Zn(II)		3,5-二氯苯酚		草甘磷	
	EC ₂₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)						
1	4.34	11.06	0.35	0.62	2.61	3.87	7.69	8.61
2	4.90	15.15	0.31	0.76	1.84	3.37	7.49	9.03
3	2.11	7.16	0.35	0.84	2.53	3.64	10.51	12.28
4	3.61	14.35	0.31	0.60	2.66	3.77	7.47	8.27
5	4.55	14.76	0.17	0.49	1.62	2.74	4.45	5.84
\bar{x} (mg/L)	3.90	12.50	0.30	0.66	2.25	3.48	7.52	8.81
S (mg/L)	1.11	3.39	0.07	0.14	0.48	0.45	2.15	2.31
RSD (%)	28.4	27.2	24.4	21.1	21.5	13.0	28.5	26.2

表 16 环境样品再现性测试数据 (EC)

实验室号	环境样品 1 (高毒)		环境样品 2 (中毒)		环境样品 3 (低毒)	
	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)
1	<3.13	<3.13	4.61	15.53	14.88	>80
2	<3.13	<3.13	8.73	23.46	>80	>80
3	<3.13	<3.13	9.53	22.45	>80	>80
4	<3.13	<3.13	7.68	21.61	>80	>80
5	<3.13	<3.13	6.40	20.31	>80	>80
\bar{x} (%)	-	-	7.39	20.67	-	-
S (%)	-	-	1.95	3.10	-	-
RSD (%)	-	-	26.3	15.0	-	-

表 17 各验证样品相对抑制率测试数据

实验室号	相对抑制率的相对偏差范围 (%)						
	Cr (VI)	Zn (II)	3,5-二氯苯酚	草甘磷	高毒环境样品	中毒环境样品	低毒环境样品
1	±1.5	±0.7	±3.5	±2.6	±0.4	±1.4	±1.2
2	±1.6	±2.3	±2.6	±6.4	±0.6	±2.3	±1.8
3	±1.1	±1.5	±2.0	±1.8	±0.7	±2.6	±2.0
4	±5.5	±1.4	±4.7	±3.2	±0.2	±3.0	±2.0

5	±0.9	±1.4	±1.0	±0.9	±0.3	±2.4	±0.3
范围	±5.5	±2.3	±4.7	±6.4	±0.7	±3.0	±2.0
结论	各验证样品的相对抑制率的相对偏差范围为-6.4%~6.4%						

方法有效性测试结果见表18、表19和表20，空白对照的 f_{k30} 为0.47~0.77，大多数数据符合0.6~1.8的质控要求；空白对照平均 \bar{f}_{k30} 值与各平行的相对偏差数据范围为-3.24%~3.24%，部分超过3%的质控要求；3.4 mg/L的3,5-二氯苯酚和18.7 mg/L的Cr(VI)（相当于52.9 mg/L的重铬酸钾）对费氏弧菌的相对抑制率均在20~80%的质控要求内，2.2 mg/L的Zn(II)（相当于9.67 mg/L的七水硫酸锌）对费氏弧菌的相对抑制率超过80%，相对抑制率在20~80%质控范围内的Zn(II)浓度为0.412和0.550 mg/L（相当于1.81和2.42 mg/L的七水硫酸锌）。

表 18 方法有效性测试数据（空白对照 f_{k30} ）

	实验室号	f_{k30}				范围	结论
空白对照 1	1	0.60	0.57	0.59	0.62	0.57~0.77	大多数数据符合 0.6~1.8 的质控要求
	2	0.62	0.64	0.62	0.63		
	3	0.66	0.65	0.65	0.64		
	4	0.77	0.75	0.67	0.66		
	5	0.69	0.69	0.68	0.67		
空白对照 2	1	0.61	0.63	0.64	0.68	0.61~0.74	
	2	0.65	0.68	0.68	0.69		
	3	0.71	0.72	0.69	0.71		
	4	0.70	0.71	0.74	0.71		
	5	0.64	0.63	0.65	0.66		

表 19 方法有效性测试数据（空白对照 \bar{f}_{k30} 值与各平行的相对偏差）

	实验室号	与平均 \bar{f}_{k30} 值偏差 (%)				范围	结论
空白对照 1	1	2.26	-2.26	-2.12	2.12	-2.26~2.26	部分超过 3%的质 控要求
	2	-1.51	1.51	-1.09	1.09		
	3	0.71	-0.71	0.39	-0.39		
	4	1.04	-1.04	0.63	-0.63		
	5	0	0	0.74	-0.74		
空白对照 2	1	-1.55	1.55	-3.24	3.24	-3.24~3.24	
	2	-1.76	1.76	-0.59	0.59		
	3	-0.97	0.97	-1.02	1.02		
	4	-0.76	0.76	1.88	-1.88		
	5	0.59	-0.59	-0.89	0.89		

表 20 方法有效性测试数据（参比样品）

	实验室号	相对抑制率 (%)		范围	结论
18.7 mg/L Cr(VI)	1	67.9	67.4	51.7%~73.3%	符合相对抑制率 20~80%的 要求
	2	55.8	57.6		
	3	72.2	73.3		

	实验室号	相对抑制率 (%)		范围	结论
	4	51.7	53.8		
	5	59.6	59.4		
2.2 mg/L Zn (II)	1	93.7	93.2	80.3%~93.7%	相对抑制率均超过 80%，相对抑制率在 20~80%质控范围内的 Zn (II) 浓度为 0.412 和 0.550 mg/L (相当于 1.81 和 2.42 mg/L 的七水硫酸锌)
	2	89.4	90.3		
	3	82.8	80.3		
	4	92.1	92.2		
	5	90.4	90.8		
3.4 mg/L 3,5-二氯 苯酚	1	44.1	49.5	39.7%~63.1%	符合相对抑制率 20~80%的要求
	2	50.0	53.9		
	3	43.7	47.1		
	4	40.7	39.7		
	5	63.1	61.2		

8 与开题报告的差异说明

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，明确适用范围为地表水，地下水，饮用水、生活污水，工业废水及海水，受试菌株为费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*)，地表水、生活污水和工业废水的采集须符合HJ/T 91以及HJ 91.1要求的技术规范，地下水的采集须符合HJ/T 164要求的技术规范，饮用水的采集须符合GB/T 5750.2要求的技术规范，海水样品的采集须符合GB 17378.3要求的技术规范。在参考实验室内和实验室间的验证结果及ISO 11348-3-2007的基础上，明确参比物质为重铬酸钾、七水硫酸锌和3,5-二氯苯酚，方法有效性为：

- (1) 15分钟或30分钟的 \bar{f}_{kt} 应介于0.6~1.8 之间；
- (2) 空白对照平均 \bar{f}_{k30} 值与各平行的相对偏差不应大于10%；
- (3) 平行样品的相对抑制率的相对偏差不应大于10%；
- (4) 经过30分钟的接触时间后，3.4 mg/L的3,5-二氯苯酚、0.55 mg/L的Zn (II) (相当于2.42 mg/L的七水硫酸锌) 以及18.7 mg/L的Cr (VI) (相当于52.9 mg/L的重铬酸钾) 的参比样品溶液应分别导致20~80%的相对抑制率；
- (5) 若测试结果不符合 (1) ~ (4) 的要求，需重新测定。

9 标准征求意见稿技术审查情况

待补充

10 标准实施建议

待补充

11 标准征求意见情况 (送审稿增加内容)

待补充

12 参考文献

- [1]黄灿克. 发光细菌毒性法在水质评估与预警中的应用研究[D]. 浙江大学, 2014.
- [2]杨虹, 刘金冠, 崔桂贤. 天津市地表水水体污染发光细菌的急性毒性表征研究[J]. 硅谷, 2010, 000(007):132-132.
- [3]张秀君. 发光菌监测海水毒性实验研究[J]. 沈阳教育学院学报, 1999, 001(001):110-112.
- [4]董玉瑛, 冯霄, 王宗爽. 发光细菌法测定有机工业废水综合毒性[J]. 化工环保, 2005(01):68-70.
- [5]王兆群, 丁长春. 发光细菌法监测河流水质状况[J]. 环境与开发, 2001, 016(001):49-50.
- [6]李雪梅, 柯真山, 杜青,等. 采用淡水发光菌评估污水处理厂进出水毒性的研究[J]. 给水排水, 2010, 36(1):130-134.
- [7] wu IAngling, JIANG Yue, ZHANG Lili, et al. Toxicity of urban highway runoff in Shanghai to Zebrafish(Danio rerio)embryos and luminous bacteria(Vibrio qinghaiensis. Q67)[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2014, 21(4) :2663—2676.
- [8] GB 15441,水质急性毒性的测定发光细菌法[S].国家环境保护局, 1995.
- [9] 岳舜琳. 用发光细菌监测水质突发性污染[J]. 净水技术, 2008, 27(1): 65—68.
- [10] 王家玲. 环境微生物学实验[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1992.
- [11] GB 21903, 发酵类制药工业水污染物排放标准[S].环境保护部国家质量监督检验检疫总局, 2008.
- [12] GB 21904, 化学合成类制药工业水污染物排放标准[S].环境保护部国家质量监督检验检疫总局, 2008.
- [13] GB 21905, 提取类制药工业水污染物排放标准[S].环境保护部国家质量监督检验检疫总局, 2008.
- [14] GB 21906, 中药类制药工业水污染物排放标准[S].环境保护部国家质量监督检验检疫总局, 2008.
- [15] GB 21907, 生物工程类制药工业水污染物排放标准[S].环境保护部国家质量监督检验检疫总局, 2008.
- [16] GB 21908, 混装制剂类制药工业水污染物排放标准[S].环境保护部国家质量监督检验检疫总局, 2008.
- [17] DB23/T 2750,水质 生物毒性的测定 发光细菌快速测定法[S]. 黑龙江省市场监督管理局, 2020.
- [18] ISO 11348-3, 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 [S]. ISO, 2007.

- [19] ISO 21338, Water quality — Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test) [S]. ISO, 2010.
- [20] A A Bulich. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples[J], *Process Biochemistry*, 1982, 17(2): 45-47.
- [21] 任春, 卢延娜, 张虞,等. 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):5.
- [22] Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I, et al. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. [J] .*Wiley InterScience*, 2003, 18(6) :395—402.
- [23] Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Germany. Ordinance on requirements for the discharge of waste water into waters[S].
- [24] DB37/T 4298, 绿潮次生毒性的快速检测方法 发光细菌法[S]. 山东省市场监督管理局, 2020.
- [25] SN/T 5103, 国境口岸饮用水生物毒性发光细菌检测方法[S]. 中华人民共和国海关总署, 2019.

附件 3

征求意见回复表

单位名称（盖章）				
联系人				
通讯地址				
联系电话				
邮 箱				
序号	标准条款	修改建议	主要理由	备注

（不够请另附页）