



中华人民共和国国家标准

GB/T 27858—2011

化学品 沉积物-水系统中摇蚊毒性试验 加标于水法

Chemicals—Sediment-water chironomid toxicity test—Spiked water method

2011-12-30 发布

2012-08-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准与经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 219《化学品试验指南 沉积物-水系统中摇蚊毒性试验 加标于水法》(2004 年 4 月)(英文版)技术性内容相同。

本标准做了下列结构和编辑性修改:

- 为与现有系列国家标准一致,将标准名称改为《化学品 沉积物-水系统中摇蚊毒性试验 加标于水法》;
- 将 OECD 219 中的“介绍”作为本标准的“引言”;
- 将 OECD 219 中的附件 1“术语和定义”作为本标准的第 3 章“术语和定义”;附件 2、附件 3、附件 4 以及附件 5 分别对应本标准的附录 A、附录 B、附录 C 以及附录 D。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准起草单位:江苏出入境检验检疫局、中国化工经济技术发展中心。

本标准主要起草人:王红松、汤礼军、刘君峰、王晓兵、戴雨肅。

引 言

本标准用于评估化学品长期暴露对处在沉积物中的淡水双翅目摇蚊属(*Chironomus* sp.)幼虫的影响。本标准主要以 BBA 标准为基础,使用一种沉积物-水系统,包括人造土壤和水柱体暴露场景^[1],同时也借鉴了已有的对 *Chironomus riparius* 和 *Chironomus tentans* 的毒性测试方法,上述摇蚊毒性试验方法已在欧洲和北美^[2-8]建立并通过了比对试验^[1,8,9]。本标准也可使用其他已有充分实证的摇蚊种类,如 *Chironomus yoshimatsui*^[10-11]。

本标准的暴露场景是将受试物质加入水中。应根据试验的应用目的选择适当的暴露场景。水暴露场景(包括将受试物加入水柱体中)是旨在模拟农药喷撒漂移的场景,同时也考虑到了间隙水中浓度的初始峰值。除了当累积过程的持续时间大于试验周期时,本标准对其他类型的暴露(包括化学物质溅出)也很有用。

要用沉积物中的生物测试的受试物质通常可在这个系统中存在很长时间。沉积物中的生物可通过多种途径暴露受试物质。每种暴露途径的相对重要性,以及每种暴露的时间对总体毒性效应的贡献,取决于相关化学品的理化特性。对于强吸附物质(如辛醇/水分配系数 $\lg K_{ow} > 5$ 的物质),或与沉积物共价结合的物质,让受试生物摄入了受试物的食物可能是一条重要的暴露途径。为了不低估高亲脂性物质的毒性,可考虑在使用受试物之前向沉积物中加入饲料。为了将所有潜在的暴露途径纳入考虑之中,本标准将重点关注长期暴露。*C. riparius* 和 *C. yoshimatsui* 的试验持续时间为 20 d~28 d, *C. tentans* 为 28 d~65 d。如果因特殊目的,需要短期数据,例如研究不稳定化学品的毒性效应,可用附加的平行试样进行试验,并在 10 d 后放弃。

试验的最终结果为羽化的成虫总数和羽化时间。如果需要额外的短期数据,建议只能适当增加额外的平行试验,在试验进行 10 d 后,进行幼虫的存活和生长的测量。

本标准建议使用人工配制沉积物。与天然沉积物相比,配制沉积物有几个优点:

- 因为配制沉积物为可再生的“标准化基体”,减少了实验的不确定性,并且没必要去寻找未被污染的清洁沉积物来源;
- 试验可在任何时候开始,而不必面对试验沉积物的季节性变化,也不必对沉积物进行预处理,以去除本土动物群。使用配制沉积物也减少了去野外收集足量的用于常规试验的沉积物的相关费用;
- 使用配制沉积物,使毒性数据可以相互比对,从而进行物质的毒性分类。

化学品 沉积物-水系统中摇蚊毒性试验 加标于水法

1 范围

本标准规定了加标于水法评估沉积物-水系统中摇蚊毒性的试验方法。

本标准适用于评估化学品长期暴露对于处在沉积物-水中的淡水双翅目摇蚊属(*Chironomus* sp.) 幼虫的影响。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本标准。凡是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 21809 化学品 蚯蚓急性毒性试验

3 术语和定义

下述术语和定义适用于本文件。

3.1

配制沉积物 formulated sediment

用来模拟天然沉积物物理成分的混合物,也可称为再生沉积物、人工沉积物或合成沉积物。

3.2

上覆水 overlying water

试验容器中处于沉积物之上的水。

3.3

间隙水 interstitial water or pore water

沉积物和土壤颗粒之间的水。

3.4

加标水 spiked water

已经添加了受试物的试验用水。

4 试验原理

将一龄摇蚊幼虫暴露于一系列含有不同浓度的受试物的沉积物-水系统中进行试验。试验开始时将一龄摇蚊幼虫引入装有沉积物-水系统的烧杯,然后将受试物加入水中。试验结束时,测量摇蚊羽化数和发育的速率。如有需要,也可在 10 d 后测量幼虫存活数和质量(使用适当的附加平行试样)。所测实验数据可用回归模型分析以估计导致羽化率或幼虫存活率或生长率下降 $x\%$ 的浓度(如 15%有效浓度 EC_{15} , 半数有效浓度 EC_{50} 等),或者用统计假设检验来测定无可观察效应浓度(NOEC)或者最低可观察效应浓度(LOEC)。后者需要用统计检验方法,以将效应值与对照值进行比较。

5 受试物信息

应了解受试物的溶解度、蒸汽压、经测量或计算而得的在沉积物中的分配量、以及在水和沉积物中的稳定性。还需要有一种可靠的分析方法,用于上覆水、间隙水和沉积物中受试物的定量测定,并具有已知确证的准确度和检出限。有用的信息还包括受试物的结构式、纯度、化学归宿(如衰减、生物与非生物降解等)。如果受试物质的理化性质导致其很难进行本试验,则可参考文献^[12]。

6 参考物质

定期进行参考物质的试验,以验证试验方案和试验条件的可靠性。已成功应用于比对试验和有效性研究的参考毒物有林丹、氟乐灵、五氯苯酚、氯化镉和氯化钾^[1-2,5-6,13]。

7 质量保证与质量控制

为使试验有效,应满足下列条件:

- 试验结束时,对照组的羽化率不应低于70%^[1,6];
- 对照容器中的 *C. riparius* 和 *C. yoshimatsui* 应在引入后的12 d~23 d内羽化为成虫;
C. tentans 则需要20 d~65 d;
- 试验结束时,应测量每个试验容器中的pH值和溶解氧浓度。溶解氧浓度应不低于该温度下空气饱和值(ASV)的60%,所有试验容器中上覆水的pH值应在6.0~9.0之间;
- 水温变化不超过 $\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。可用恒温室来控制水温,并按适当的时间间隔进行记录。

8 试验方法描述

8.1 试验容器

试验在直径为8 cm的600 mL玻璃烧杯中进行。也可使用其他容器,但应确保上覆水和沉积物的适宜深度。沉积物表面应足够为每条幼虫提供 $2\text{ cm}^2\sim 3\text{ cm}^2$ 的面积。沉积层深度与上覆水深度之比应为1:4。试验容器和其他与试验系统直接接触的器具应全部用玻璃或其他化学惰性材料(如聚四氟乙烯)制成。

8.2 受试物种选择

试验所选用的适宜物种为 *C. riparius*。也可选用 *C. tentans*,但试验操作更困难,试验周期更长。也可选用 *C. yoshimatsui*。附录A提供了 *C. riparius* 的详细培育方法。其他种类的培育条件也可获取,如 *C. tentans*^[4] 和 *C. yoshimatsui*^[11]。试验前应确认受试物种类,但如果使用室内培育的生物,可不必在每次试验前做如此确认。

8.3 沉积物

8.3.1 优先选用配制沉积物。如果使用天然沉积物,应做性质鉴定(至少要测pH值、有机碳含量;也建议测定其他参数,如碳氮比和粒度等),并且该天然沉积物未受污染,不存在与摇蚊竞争或捕食摇蚊的其他生物。在用于摇蚊毒性试验以前,建议先将天然沉积物在与后续试验相同的条件下陈化数天。下列配制沉积物是以GB/T 21809中使用的人造土壤为基础的,推荐在本试验中使用^[1,4,15]。

——4%~5%(干重)泥炭;pH值尽可能在5.5~6.0之间;重要的是应采用粉末状泥炭,磨成粉末

(粒度 $\leq 1\text{mm}$),只能空气干燥。

——20%(干重)高岭黏土(高岭石含量最好大于30%)。

——75%~76%(干重)石英砂(以细砂为主,50%以上的石英砂颗粒应在 $50\text{ }\mu\text{m}\sim 200\text{ }\mu\text{m}$)。

——加入去离子水,使最终混合物中的水分含量为30%~50%。

——加入化学纯碳酸钙(CaCO_3)将最终混合物的pH值调节至 7.0 ± 0.5 。

——最终混合物中的有机碳含量应为 $2.0\%\pm 0.5\%$,可分别用适量的上述泥炭和石英砂调节。

8.3.2 泥炭、高岭粘土和石英砂的来源应清楚。沉积物组分应经检查无化学污染(如重金属、有机氯化物、有机磷化合物等)。附录B描述了配制沉积物的制备情况。如果能证实在加入上覆水后,不会发生沉积物组分的分离(如泥炭颗粒的漂起),并且泥炭或沉积物已充分陈化,也可以用干燥组分直接混合进行制备。

8.4 水

附录A和附录C列出了可使用的稀释水的化学指标,任何符合这些指标的水均可作试验用水。在整个培育和试验过程中,如果摇蚊能够存活于其中而未显不适,则任何适宜的水,包括自然水(地表水)、配制水(参见附录A)以及除氯的自来水等,都可用作培育用水和试验用水。试验开始时,试验用水的pH值应在6.0~9.0之间,总硬度不大于 400 mg/L (以 CaCO_3 计)。但是,如果怀疑硬度离子与试验物质之间有反应,则应使用硬度低一些的水(因此,在此情况下不能使用Elendt M4介质)。在整个试验过程中应自始至终使用同一类型的水。附录C中所列的水质特性指标每年至少应测定两次,当怀疑这些指标可能发生显著变化时,也应进行检测。

8.5 储备液-加标水

试验浓度以水柱体(指位于沉积物之上的水体)浓度为基础计算。选定浓度的试验液通常是将储备液稀释制成。将受试物质溶解于试验介质中制成储备液;有时为了制备适宜浓度的储备液,可使用一些溶剂或分散剂。可选用的溶剂有:丙酮、乙醇、甲醇、乙二醇-乙醚乙酸酯、乙二醇-二甲醚、二甲基甲酰胺以及三乙撑乙二醇。可选用的分散剂有:聚氧乙烯醚(40)氢化蓖麻油、吐温80、甲基纤维素0.01%和HCO-40。在最终的试验介质中,助溶剂浓度应尽可能低(如不大于 0.1 mL/L)并且在所有处理组中都一样。如果使用了助溶剂,应通过只有助溶剂的对照试验来验证助溶剂不会对摇蚊幼虫的存活产生影响或产生其他可观测到的不利影响。因此,应尽量不用助溶剂。

9 试验设计

9.1 总则

试验设计涉及选择试验浓度的组数以及浓度的间距(组距)、每个浓度的试验容器数和每个试验容器中的幼虫数。应对EC点的估算、NOEC的估算,以及限度试验的设计进行描述。

9.2 回归分析的设计

9.2.1 效应浓度(如 EC_{15} , EC_{50})和所关注的受试物质的效应浓度范围应包含在试验所用的浓度范围内。一般说来,当效应浓度处于试验浓度的范围内时,评估效应浓度(EC_x)的准确性、特别是有效性可得到提高。应避免出现大大低于最低阳性浓度和大大高于最高浓度的情况。探寻浓度范围的预试验有助于选择拟采用的浓度范围。

9.2.2 如需估计 EC_x ,应至少设置5组试验浓度,每个浓度3份平行试样。为使评估模型更为准确,试验的浓度应足够多。浓度间隔比例因子应不大于2(除非剂量响应曲线的斜率很小)。当不同响应的试

验浓度的个数增加时,可以减少每个浓度的平行试样的个数。增加平行试样个数或减小试验浓度的间隔可减小试验结果的置信区间。如果需要评估幼虫 10 d 的存活和生长情况,则需增加额外的平行试样。

9.3 评估 NOEC/LOEC 的设计

如需评估 NOEC/LOEC,应设置 5 组试验浓度,每个浓度至少 4 个平行试样,浓度间隔比例因子不应大于 2。为了保证足够的统计效能,以便在 5% 的显著水平上($p=0.05$)检测出与对照组 20% 的差异,平行试样的个数应足够多。如需评估生长率,可用方差分析法(ANOVA),如 Dunnett 检验和 Williams 检验等^[16-19]。在进行羽化率评估时,可用 Cochran-Armitage 检验、Fisher 精确检验(经 Bonferroni 修正)或者 Mantel-Haentzel 检验。

9.4 限度试验

如果在探寻浓度范围的预试验中没有观测到任何效应,则应进行限度试验(一个试验浓度和一个对照浓度)。限度试验的目的就是在一个足够高的浓度下进行试验,以使决策者能够排除该物质可能产生的毒性效应。限度值设定在一个预期在任何情况下都不会出现的浓度。推荐浓度为 1 000 mg/kg (干重)。试验和对照各需至少 6 个平行试样。应证明试验有足够的统计效能,能够在 5% 的显著水平上($p=0.05$)检测出与对照组 20% 的差异。对于度量的效应结果(生长率和质量),如果数据满足 t 检验的要求(正态,齐性方差),则 t 检验是一种合适的统计方法。如果数据不能满足这些要求,可以应用方差不齐 t 检验,或者非参数检验,如 Wilcoxon-Mann-Whitney 检验。对于羽化率,则可用 Fisher 精确检验。

10 试验步骤

10.1 暴露条件

10.1.1 加标水-沉积物系统的制备

10.1.1.1 向试验容器中加入适当数量的配制沉积物,形成厚度至少 1.5 cm 的一层,然后加入 6 cm 深度的水。沉积物厚度与水深之比不应超过 1:4,沉积层厚度不应超过 3 cm。加入受试生物之前,沉积物-水系统应进行 7 d 的柔和通风(见附录 B)。在向水柱体中加入试验溶液时,为了避免沉积物分层和再次激起微小颗粒悬浮在水中,可在沉积物上盖一个塑料片,把溶液倒在塑料片上然后迅速将塑料片移开。也可以用其他合适的器具。

10.1.1.2 应在试验容器上加一个玻璃盘之类的盖子。必要时,试验过程中可加水使水深超过初始的体积以补偿水分的挥发。只能加入蒸馏水或电离水以避免盐分浓度增加。

10.1.2 加入受试生物

10.1.2.1 在向试验容器中加入受试生物的 4 d~5 d 前,应将卵块从培养器中取出,移至加了培养介质的小容器中。可使用培养器中现成的已陈化介质,也可用新配制的介质。如果用后者,应向培养介质中加入绿藻,和/或几滴将切片鱼食磨细后的悬浮液的滤出液。只能使用刚刚产生的卵块。正常情况下,卵出生 2 d~3 d 后幼虫就开始孵化(*C. riparius*, 温度 20℃ 情况下 2 d~3 d; *C. tentans*, 温度 23℃ 情况下 1 d~4 d; *C. yoshimatsui*, 温度 25℃ 情况下 1 d~4 d),幼虫至成虫共生长四龄,每龄 4 d~8 d。用于试验的是一龄幼虫(孵出后 2 d~3 d 或 1 d~4 d)。幼虫处于哪一龄可通过测量其头壳宽度来确定。

10.1.2.2 用一根钝头吸管将 20 只一龄幼虫随机放入每一个已加入加标水和沉积物的试验容器中。向试验容器加入幼虫时停止通风,加入后再保持 24 h。每种浓度所加入的幼虫数量根据所使用的不同

的试验方法而定,用 EC 点估算法时每种浓度至少 60 只,而用 NOEC 测定法则至少为 80 只。

10.1.2.3 加入幼虫 24 h 后,将受试物质加入上部的水柱体中(用吸管向水面下注入少量的受试物质溶液),再次给予轻微的通风,以小心混合上部水体,注意不要搅起沉积物。

10.1.3 试验浓度

10.1.3.1 为了选定正式试验的浓度范围,可进行浓度范围的预试验;为此,需要使用一系列间隔较大的受试物质浓度。在与正式试验相同的摇蚊表面密度条件下,将摇蚊暴露于每一种试验物质浓度中一段时间,这样即可估算出适当的试验浓度。浓度范围的探寻试验不需要平行试样。

10.1.3.2 正式试验用的试验浓度是根据探寻浓度范围的预试验的结果来决定,至少要选用 5 组浓度。浓度的选定应与 9.2 和 9.3 的要求相符。

10.1.4 对照

试验时要准备好对照容器,这些容器中不加入受试物质,但要加入沉积物。对照容器也要备好适当数量的平行试样(参见 9.2 和 9.3)。如果在 8.5 使用了某种溶剂,则要增加沉积物溶剂对照。

10.1.5 试验系统

应使用静态系统。在某些特殊的情况下,比如水质指标变得不再适合受试生物或者影响化学平衡时(例如:水中溶解的氧气含量过低,排泄物含量过高,或者从沉积物中析出的矿物质影响水的 pH 值或硬度时),也可使用半静态或流动系统:间断性或持续性地更新上部水体。尽管如此,通常情况下最好使用其他的改善上部水体质量的方法,比如通风;而避免使用半静态或流动系统。

10.1.6 饲料

应及时给幼虫投食,最好每天一次或者每周至少三次。对于最初 10 d 内的小幼虫,每条幼虫 0.25 mg/d~0.5 mg/d(*C. yoshimatsu* 应为 0.35 mg~0.5 mg)的鱼饲料(一种水悬浮液或者磨碎的精细饲料,例如 Tetra-Min 或 Tetra-Phyll,详见附录 A)应足够了。对于大一些的幼虫,饲料应稍多一些:在余下的试验中,每条幼虫 0.5 mg/d~1.0 mg/d 应足够了。如果发现真菌生长或者对照中观察到死亡率,则所有试验组和对照组中的饲料供给量应减少。如果不能停止真菌的生长,则试验应重做。当试验强吸附物质(例如 $\lg K_{ow} > 5$ 的物质)或者与沉淀物共价结合的物质时,应在陈化期前向配制沉积物中加入足量的饲料以确保幼虫的生存和自然生长。对此,应使用植物性饲料替代鱼饲料。例如,加入 0.5%(干重)的磨细的植物叶子,叶子来源于刺蓴麻(*Urtica dioica*)、桑树(*Morus alba*)、白三叶草(*Trifolium repens*)、菠菜(*Spinacia oleracea*),或者其他植物原料(*Cerophyl* 或者透明纤维素)。

10.1.7 孵化条件

10.1.7.1 加入幼虫 24 h 后要给试验容器中的上覆水柔和通风,并且保持到试验结束(应注意溶解氧的浓度不得低于 ASV 的 60%)。通风是通过固定在沉积层之上 2 cm~3 cm 处的一根玻璃巴斯德吸管进行的(即每秒 1 个或数个泡沫)。当试验挥发性化学物质时,则不能给沉积物-水系统通风。

10.1.7.2 试验要在 20 °C±2 °C 的恒温条件下进行。对于 *C. tentans* 和 *C. yoshimatsu*,推荐的温度分别是 23 °C 和 25 °C±2 °C。通常使用 16 h 的光照周期,光照度应为 500 lx~1 000 lx。

10.1.8 暴露时间

暴露从幼虫加入加标容器和对照容器时就开始。*C. riparius* 和 *C. yoshimatsu* 的最长暴露时间是 28 d,*C. tentans* 是 65 d。如果蚊羽化较早,试验可在对照容器中最后一只成虫羽化之后的至少 5 d 后结束。

10.2 观察

10.2.1 羽化

10.2.1.1 测定发育时间和完全羽化的雌雄蚊总数。从其羽状触角可轻易识别雄蚊。

10.2.1.2 每周至少进行三次观察,与对照容器中的幼虫相比较,目估加标容器中的幼虫的任何反常行为(例如离开沉淀物、非正常游动)。在预期的羽化期间,应每天对羽化蚊计数,每天记录完全羽化蚊的性别和数量。经过鉴别之后,应把蚊从容器中移出。要记录试验终止前的所有产出的卵块,然后移出,以防止幼虫再次引入沉积物。要记录能观察到的未能羽化的蛹数量。羽化的测量方法见附录 D。

10.2.2 发育和存活

如果需要幼虫 10 d 的存活和发育资料,应在试验开始时,额外准备试验容器,以便在随后的试验中,使用它们。使用 250 μm 的滤网过滤从这些额外的试验容器中取出的沉淀物,滤出幼虫。对死亡的界定是死去,或者对机械刺激没有反应。未能再找到的幼虫也要统计为死亡(那些在试验初期就死去的幼虫可能已经被微生物分解)。测定每个试验容器中存活幼虫的干重(应无杂质),计算每个试验容器中的平均单个幼虫干重。确定存活的幼虫处于哪个虫龄是很有用的,为此,需要测量每个幼虫的头壳宽度。

10.3 分析试验

10.3.1 受试物的浓度

10.3.1.1 在试验开始(加入受试物质 1 h 后更适宜)和结束时,应至少对最高浓度组和一个较低浓度组中的上覆水、间隙水和沉积物样本进行测定;这些受试物质浓度的测定显示了水-沉积物系统中受试化学物质的行为和分布情况。试验开始时沉积物的取样可能影响试验(例如取走试验幼虫);因而,如果适当,在试验开始和试验期间要使用另外的试验容器来做取样测定(见 10.3.1.2)。在可比较的条件下(例如沉积物与水的比率、应用种类、沉积物的有机碳含量),如果在水/沉积物研究中,水和沉积物中受试物质的分布情况可以被清楚地测定,则不必再测量沉积物中的受试物质浓度。

10.3.1.2 当要做实验期间测量(例如第 7 d),以及需要分析大量的样本时,样本的取出势必影响整个试验系统,此时应采用额外的试验容器;这些额外的试验容器在与正式试验容器相同的条件下进行处理(包括引入受试生物),但不用来作生物学观察,仅用于从中进行取样分析。

10.3.1.3 推荐用离心法分离间隙水,条件为:10 000 g (g 为自由落体加速度值)、4 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min。但是,如果能够证实受试物不被吸附在过滤器上,也可以用过滤法。在一些情况下,几乎不可能分析间隙水的浓度,因为试样量太少了。

10.3.2 理化参数

用适当方法测量试验容器中的 pH 和温度(见第 7 章)。在试验开始和结束时,应测量最高浓度的一个试验容器以及对照容器中的硬度和氨度。

11 数据和报告

11.1 结果处理

11.1.1 本试验的目的是要测定受试物对摇蚊发育速率和完全羽化的雌雄蚊总数的影响,或者在为期 10 d 的试验中测定受试物对存活幼虫的数量和质量的影响。如果没有迹象显示摇蚊性别对统计灵敏

度存在差异时,则雌雄的结果可以合并统计。灵敏度差异存在与否可用统计方法判定,例如 $X^2-r \times 2$ 表检验。在为期 10 d 的试验中,应测定幼虫存活数和每个容器中的平均个体干重。

11.1.2 根据试验开始时测得的沉积物中受试物浓度来计算效应浓度,效应浓度应以干态质量为基础。

11.1.3 为了计算 EC_{50} 或其他 EC_x 值,每个试验容器的统计数据值可当作真实的平行试验值。计算任何 EC_x 的置信区间时,应考虑这些数值之间的偏差,或者要证明偏差小到可以忽略不计。当适用最小平方模式时,每个试验容器的统计数据值需通过转换来改善偏差的同质性。但计算 EC_x 值时,应将响应数据转换回原值。

11.1.4 为了测定 NOEC/LOEC,当用假设检验法进行统计分析时,应考虑到每个试验容器的统计数据值的偏差,此时可用嵌套的 ANOVA 法;或者,当不符合通常的 ANOVA 法设定时,则需要进行更多更充分的试验^[20]。

11.2 羽化率

11.2.1 羽化率是离散数据,当剂量-效应关系预期为单向,并且这些数据也符合这一预期时,可用递减的方法进行 Cochran-Armitage 检验。否则,要使用 Fisher 精确检验或者 Bonferroni-Holm 修正 p 值的 Mantel-Haentzal 检验。当相同浓度的平行试验的偏差比二项式分布更大(通常被称为“外二项式”偏差),则应用充分的 Cochran-Armitage 检验或者 Fisher 精确检验。

11.2.2 每个试验容器中蚊的羽化总数 n_e ,除以加入的幼虫的数量 n_a ,即得羽化率,见式(1):

$$ER = \frac{n_e}{n_a} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ER——羽化率;

n_e ——每个容器中羽化蚊的数量;

n_a ——每个容器中加入的幼虫数。

11.2.3 当存在外二项式偏差时,最适合于大样本量的可选方法就是把羽化率当成一个连续的效应值。当剂量-效应关系预期为单向,并且 ER 值也符合这一预期时,应用像 William 检验这样的程序;当剂量-效应关系不保持单向时,则适用 Dunnett 检验。这里把大样本量定义为:在一个平行试验(一个容器)中,羽化数和未羽化数都超过 5。

11.2.4 使用 ANOVA 方法时,ER 的值应该通过平方根-反正弦转换或 Turkey-Freeman 转换以获取一个近似正态分布并使方差齐性。当使用绝对频数时,可以应用 Cochran-Armitage 检验、Fisher 精准 (Bonferroni) 检验或 Mantel-Haentzal 检验。平方根-反正弦转换是对 ER 的平方根求反正弦 ($\sin^{-1}$) 值。

11.2.5 使用回归分析计算羽化率 EC_x (例如可使用 probit^[21]、logit、Weibull 或合适的商用软件等)。如果不能用回归分析 (例如只有少于两个部分效应值),则使用其他非参数方法比如移动平均或简单插补。

11.3 发育速率

11.3.1 平均发育时间表示由从刚引入幼虫(试验第 0 d)到大群实验性羽化成虫所跨越的平均时间(为了正确计算发育时间,应考虑幼虫引入时的虫龄)。发育速率(单位: 1/d)是发育时间的倒数,表示每天羽化的幼虫的比率。对于评估沉积物毒性研究而言,发育速率更重要,因为与发育时间相比,它的偏差更低,更均一,更接近正态分布;因而更有效的参数检验程序可以用于计算发育速率而不是发育时间。因为发育速率是一个连续效应值, EC_x 值可以使用回归分析来估算^[22-23]。

11.3.2 对于下列统计检验,观察第 x 天所观察到摇蚊数量假定为从第 x 天到第 $x-L$ 天(L =观察间隔的长度,通常为 1 d)中羽化而成。每个容器的平均发育速率($\bar{x}$)根据式(2)计算:

$$\bar{x} = \frac{1}{n_e} \sum_{i=1}^m f_i x_i \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：
 $\bar{x}$ —— 每个容器的平均发育速率；
 i —— 观察间隔指数；
 m —— 观察间隔最大值；
 f_i —— 观察间隔 i 中所羽化的摇蚊数量；
 n_e —— 至实验最后阶段所羽化的摇蚊总数 ($= \sum f_i$)；
 x_i —— 在观察间隔 i 中所羽化的摇蚊发育速率。

11.3.3 在观察间隔 i 中所羽化的摇蚊发育速率 x_i 按照式(3)计算：

$$x_i = 1 / \left(d_i - \frac{l_i}{2} \right) \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：
 d_i —— 观察的天数（从加入幼虫起算的日期）；
 l_i —— 观察间隔 i 的长度（日期，通常为 1 d）。

11.4 试验报告

11.4.1 受试物：

- 特性，相关的物理-化学特性[水溶性，蒸气压，土壤(或沉积物中)中的分配系数，水稳定性等]；
- 化学识别信息(通用名、化学名、结构式以及 CAS 号等)，包括纯度和定量分析方法。

11.4.2 受试生物：

- 试验使用的生物的种类、学名、来源和饲养条件；
- 处理卵块和幼虫方法的信息；
- 加入试验容器时受试生物的虫龄。

11.4.3 检测条件：

- 使用的沉积物，如：天然或人工配制的沉积物；
- 对于天然沉积物，应记录沉积物取样地区的位置并作描述，如可能，还应包括污染史和天然沉积物的特性：pH 值、有机碳含量、碳氮比和粒度（如适用）。
- 配制沉积物的制备：成分和特性（在试验开始前的 pH 值，有机碳含量，pH 值，水分等）；
- 试验用水的准备（如使用配制水）及其特性（在试验开始前的氧浓度，pH 值，传导率，硬度等）；
- 沉积物和上覆水的厚度；
- 上覆水和间隙水的体积；沉积物分别含间隙水和不含间隙水的质量；
- 试验容器（材料和尺寸）；
- 储备液和试验浓度的制备方法；
- 受试物质的使用：所用受试物质试验浓度，平行试样个数和使用的溶剂（若使用）；
- 孵化条件：温度，光照周期和强度，通风（频率和强度）；
- 喂养方面的具体信息包括饲料的种类、制备、喂养数量和喂养方案。

11.4.4 结果：

- 理论试验浓度，实际测量的试验浓度和决定试验容器中试验物浓度的所有分析结果；
- 试验容器中水的质量，如：pH 值，温度，溶氧量，硬度和氨度；
- 如果在试验过程中对蒸发了的试验用水进行了补偿，则应记录；
- 每天每个容器内成长为雄蚊和雌蚊的数量；
- 每个容器内没能成长为摇蚊的幼虫的数量；

- 每个容器内单个幼虫的平均干态质量；如合适，测量每一龄虫的平均干态质量；
- 每个平行试样和每个检测浓度的羽化百分率（雄蚊和雌蚊合计）；
- 每个试验容器中的完全羽化成蚊的平均发育率和处理率（雄蚊和雌蚊合计）；
- 估计毒性效应值，例如 EC_{xx} （及其相关的置信区间），NOEC 和/或 LOEC，以及所用的统计方法；
- 结果讨论，包括任何偏离该标准会对试验结论产生的影响。

附 录 A
(资料性附录)
摇蚊培养方法推荐

A.1 摇蚊培养方法

摇蚊幼虫的培养可以在沉积器皿或更大的容器中进行。在容器的底部铺上一薄层石英砂,厚度约 5 mm ~10 mm,也可以用硅藻土(如 Merck, Art 8117)代替(厚度更薄,仅需几毫米就足够)。然后加入适用的水,水深数厘米。应补充蒸发损失,保持水位,防止干燥。如需要,可以更换水。还应提供温和的通风。摇蚊幼虫的培养容器外面应加一个笼子,以防止羽化后成虫的逃逸。笼子应足够大(至少 30 cm×30 cm×30cm),这样成虫能成群并交配。

笼子应放置于室温下或温度为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温环境中[16 h 光照(强度 1 000 lx),8 h 黑暗]。据报道,空气湿度(RH)小于 60%会阻止摇蚊的繁殖。

A.2 培养水

任何适用的天然水或配制水都可使用。一般推荐使用井水、去氯的自来水和人工介质(如下述 Elendt “M4”或“M7”)。水在使用前应鼓氧。如需要,培养水可以用倾倒或虹吸法更换,应小心别损害到幼虫的管状巢。

A.3 幼虫的喂食

摇蚊幼虫用鱼食喂养(用 Tetra Min, Tetra Phyll 或其他类似品牌鱼食)每天每笼大约 250 mg。可以给干的粉末或用水调配成悬浮液:1.0 g 碎鱼食加入 20 mL 水混匀,每天每笼喂 5 mL 这样的配制液(使用前摇匀)。幼虫较大时可以适当多给些。

按照水质调整喂食量,如果培养介质“混浊”,应减少喂食量。加食应小心调控。加食太少会导致幼虫向水柱迁移,加食太多会导致微生物繁殖快,水中氧气浓度下降。这两种情况都会使摇蚊幼虫生长变慢。

当启用新的培养容器时,可以加一些绿藻(如 *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*)。

A.4 成虫的喂食

一些实验员推荐:将棉花球浸泡于饱和蔗糖溶液后,作为羽化后成虫的食物。

A.5 羽化

在温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,摇蚊幼虫在培养箱中大约 13 d~15 d 后就开始羽化成虫。

A.6 虫卵

成虫出现后,每周三次检查所有幼虫培养箱中凝胶状虫卵。如出现卵块,应小心取出,转移到盛有

培养液的小盆中。这些卵块将用于建立新的培养容器(每个容器加入 2 块~4 块卵块)或用于毒性试验。

一龄摇蚊幼虫在 2 d~3 d 后孵化。

A.7 新建培养箱

一旦培养体系建立后,每周(或根据实验需要,延长新建周期)就能新建一个培养容器。当出现成虫后,就可以移去老的培养容器。使用这样的培养体系可以稳定高效地提供摇蚊成虫。

A.8 介质“M4”和“M7”的配制

Elendt(1990)已描述过介质“M4”。介质“M7”的配制与“M4”一样,只是某些物质的浓度只有“M4”的四分之一,参见表 A.1。由于用以配制贮备溶液的 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 NaNO_3 、 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 的浓度不够,试验用溶液不能按照 Elendt 和 Bias(1990)配制。

A.9 介质“M7”的配制

每一个贮备溶液(I)单独配制,混合贮备液(II)由这些贮备溶液(I)配制而成(参见表 A.1)。将 50 mL 混合贮备液(II),及表 A.2 中所列主要营养元素贮备液若干毫升,用去离子水稀释至 1 L,这样就配成了介质“M7”。按表 A.3 将三种维生素加入到去离子水中,配制成维生素贮备溶液。使用前,在最终的“M7”中加 0.1 mL 混合维生素贮备液(维生素贮备液应小份冷冻贮存)。介质应鼓氧并稳定。

表 A.1 介质 M4 和 M7 微量元素贮备液

贮备液(I)	称取下列质量(mg),用去离子水稀释至 1 L	配制混合贮备液(II):混合下列量(mL)的贮备液(I)并用去离子水稀释至 1 L		试验溶液最终浓度/(mg/L)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3^a	57 190	1.0	0.25	2.86	0.715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7 210	1.0	0.25	0.361	0.090
LiCl^a	6 120	1.0	0.25	0.306	0.077
RbCl^a	1 420	1.0	0.25	0.071	0.018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^a$	3 040	1.0	0.25	0.152	0.038
NaBr^a	320	1.0	0.25	0.016	0.004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^a$	1 260	1.0	0.25	0.063	0.016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^a$	335	1.0	0.25	0.017	0.004
ZnCl_2	260	1.0	1.0	0.013	0.013
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200	1.0	1.0	0.010	0.010
KI	65	1.0	1.0	0.003 3	0.003 3
Na_2SeO_3	43.8	1.0	1.0	0.002 2	0.002 2
NH_4VO_3	11.5	1.0	1.0	0.000 58	0.000 58
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}^{a,b}$	5 000	20.0	5.0	2.5	0.625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^{a,b}$	1 991	20.0	5.0	1.0	0.249
^a 这些物质在 M4 和 M7 中的差异,如上所示。					
^b 单独配制这些溶液,然后混合在一起立即高压灭菌处理。					

表 A.2 介质 M4 和 M7 主要营养元素贮备液

营养元素	称取下列质量(mg), 用去离子水稀释至 1 L	配制 M4 和 M7 介质贮备液主 要营养素加入量/(mL/L)	试验溶液 M4 和 M7 最终浓度/(mg/L)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	29 380	1.0	293.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0.5	123.3
KCl	58 000	0.1	5.8
NaHCO ₃	64 800	1.0	64.8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0.2	10.0
NaNO ₃	2 740	0.1	0.274
KH ₂ PO ₄	1 430	0.1	0.143
K ₂ HPO ₄	1 840	0.1	0.184

将三种维生素溶液混合,制备成一个维生素贮备液,见表 A.3。

表 A.3 介质 M4 和 M7 维生素贮备液

维生素	称取下列质量(mg), 用去离子水稀释至 1 L	配制 M4 和 M7 介质贮备液主要 营养素加入量/(mL/L)	M4 和 M7 试验溶液最终浓度 /(mg/L)
盐酸硫胺(维生素 B1)	750	0.1	0.075
维生素 B12	10	0.1	0.001 0
维生素 B7	7.5	0.1	0.000 75

附录 B
(规范性附录)
制备配制沉积物

B.1 沉积物组分

配制沉积物的组分应符合表 B.1 要求。

表 B.1 配制沉积物的组分要求

组成	特征	沉积物干重百分比/%
泥炭	水苔泥炭, pH 尽量接近 5.5~6.0, 无可见植物残余, 细磨(颗粒尺寸 $\leq 1\text{mm}$)并且风干	4~5
石英砂	粒度: 颗粒在 $50\text{ }\mu\text{m}$ ~ $200\text{ }\mu\text{m}$ 范围的应大于 50%	75~76
高岭石粘土	高岭石含量 $\geq 30\%$	20
有机碳	添加泥炭和砂来调整	2 ± 0.5
碳酸钙	粉状 CaCO_3 (化学纯)	$0.05\sim 0.1$
水	电导率 $\leq 10\text{ }\mu\text{S/cm}$	30~50

B.2 制备

泥炭风干后, 磨至微细粉末。用高性能均质化装置将置于去离子水中的一定量泥炭粉末制成悬浮液。用 CaCO_3 调整此悬浮液的 pH 值至 5.5 ± 0.5 。在 $20\text{ }^\circ\text{C}\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 下, 温和搅拌此悬浮液, 并陈化至少 2 d, 以稳定 pH 值, 并建立稳定的微生物组分。再次测量 pH 值应在 6.0 ± 0.5 。然后, 将此泥炭悬浮液混入另外的组分(砂和高岭石粘土)和去离子水, 获得均匀的沉积物。此沉积物水含量应在沉积物干重的 30%~50% 范围内。此最终混合物的 pH 值需再次测定, 并控制在 6.5~7.5, 需要时用 CaCO_3 调节。取沉积物样品, 检测干重和有机碳含量。在作摇蚊毒性试验前, 建议在与后续试验相同条件下将此配制沉积物陈化 7 d。

B.3 贮存

用来制备人工沉积物的干组分可以在室温下贮存在干燥阴凉的地方。配制沉积物(湿)在试验前不能贮存, 应在 7 d 陈化结束后立即使用。

附 录 C
(规范性附录)
稀释用水的化学特性要求

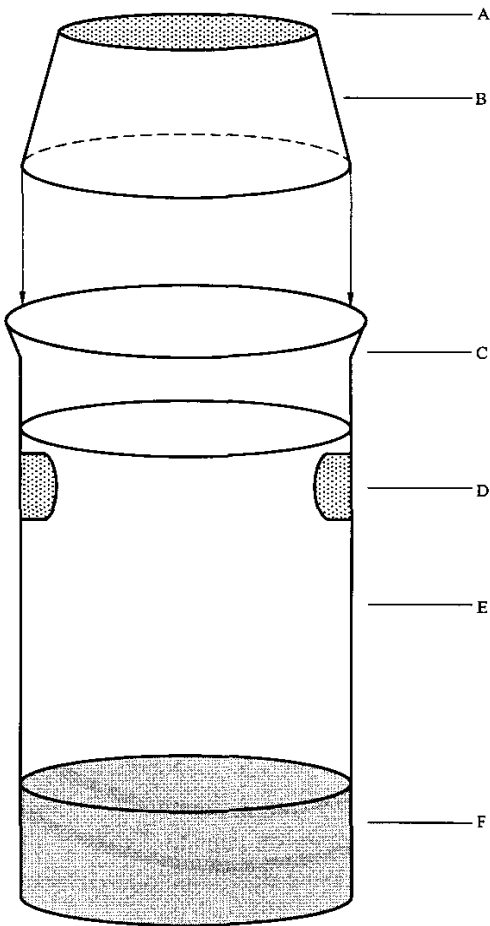
C.1 稀释用水的化学特性要求见表 C.1。

表 C.1 稀释用水的化学特性要求

物 质	浓 度
颗粒物	<20 mg/L
总有机碳	<2 mg/L
未离子化的氯	<1 µg/L
硬度以碳酸钙计	<400 mg/L ^a
残留氯	<10 µg/L
总有机磷农药	<50 µg/L
总有机氯农药+多氯联苯	<50 µg/L
总有机氯	<25 µg/L
^a 当硬离子和受试物有相互作用时,应使用低硬度水(这种情况下,不能使用 Elendt M4 介质)。	

附录 D
(规范性附录)
羽化网罩示意图

D.1 羽化网罩放置于试验烧杯上,从第 20 d 到试验的最后应放置这些羽化网罩。所使用的羽化网罩示例见图 D.1。



- A —— 尼龙筛网； D —— 水交换筛网出入口；
B —— 倒置的塑料杯； E —— 水；
C —— 无边开口烧杯； F —— 沉积物。

图 D.1 羽化网罩示意图

参 考 文 献

- [1] BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp, Berlin 1995
- [2] R. Fleming *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No; EC 3738. August 1994. WRc, UK
- [3] SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands
- [4] ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards, Volume 11. 05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA
- [5] Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus ripariu*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997
- [6] US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994
- [7] US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996); Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates
- [8] US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996); Chironomid Sediment toxicity Test
- [9] Milani, D., K. E. Day, D. J. McLeay, and R. S. Kirby. (1996). Recent intra-and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyaella and azteca*) and midge larvae (*Chironomus ripariu*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada
- [10] Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4):345-350
- [11] Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1):47-57
- [12] OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23
- [13] Environment Canada. (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995
- [14] Suedel, B. C. and J. H. Rodgers. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13:1163-1175
- [15] Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31:3291-3303
- [16] Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50:1096-1121
- [17] Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20:482-491

- [18] Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117
- [19] Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531
- [20] Rao, J. N. K. and A. J. Scott. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585
- [21] Christensen, E. R. 1984. Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221
- [22] Bruce and Versteeg 1992, A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494
- [23] Slob, W. 2002. Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* , 66: 298-312
-