

第五卷

欧共体委员会

布鲁塞尔， 29/10/2003

COM(2003) 664 临时版本

2003/0256(COD)

2003/0257(COD)

第五卷—法规提案附X，C部分

**关于化学品的注册、评估、授权和限制 (REACH), 建立欧洲化学品管理局
并修订指令 1999/45/EC 和法规 (EC) (有关持久有机污染物)**

欧洲议会和理事会法规提案

**为使指令适应欧洲议会和理事会关于化学品的注册、评估、授权和限制法
规 (EC) 而修订理事会指令 67/548/EEC 的指令**

欧洲议会和理事会指令提案

(由欧委会提交)

{SEC(2003)1171}

关于化学品的注册，评估，授权和限制（REACH）的

欧洲议会和理事会提案

第V卷

C.1. 鱼急性中毒.....	13
1. 方法	13
1.1. 引言	13
1.2. 定义及单位	13
1.3. 参考物质	13
1.4. 测定方法原理.....	13
1.5. 质量标准	13
1.6. 测定方法描述.....	14
2. 实验结果和评估	17
3. 实验结果报告	18
4. 参考文献	19
附录 1: 再造水	21
附录 2: 建议测定的鱼样	22
附录 3: 浓度示例: 死亡百分率	23
C.2. 水蚤的急性中毒.....	24
1. 方法	24
1.1. 引言	24
1.2. 定义及单位	24
1.3. 参考物质	24
1.4. 测定方法原理.....	24
1.5. 质量标准	25
1.6. 测定方法描述.....	25

2.	实验结果和评估	27
3.	实验结果报告	28
4.	参考文献	29
附录 1:	再造水	30
附录 2	31
附录 3:	浓度示例: 死亡百分率	32
C.3.	海藻的抑制测定	33
1.	方法	33
1.1.	引言	33
1.2.	定义及单位	33
1.3.	参考物质	33
1.4.	测定方法原理.....	33
1.5.	质量标准	34
1.6.	测定步骤描述.....	34
2.	实验数据和评估	38
2.1.	生长曲线面积的比较.....	38
2.2.	生长率的比较.....	39
2.3.	计算 NOEC.....	40
3.	实验结果报告	40
4.	参考文献	40
附录 1:	培养藻类的步骤的实例.....	42
附录 2:	43
C.4.	完全生物降解测定	43
第 1 部分	总则	43
I.1.	引言	43
I.2.	选择适当方法.....	43
I.3.	参考物质	45
I.4.	测定方法原理.....	45
I.5.	质量标准	46
I.6.	一般的步骤及准备 工作.....	46

I.7.	实验数据和评估	51
I.8.	实验结果报告	52
第 2 部分	DOC 消耗法 (方法 C.4-A)	53
II.1.	测定方法的原理.....	53
II.2.	方法的描述.....	53
II.3.	实验数据和结果报告	55
II.4.	数据说明	55
第 3 部分	改进的 OECD 筛选测定方法 (方法 C.4-B)	58
III.1.	方法的原理.....	58
III.2.	方法的描述.....	58
III.3.	实验数据和结果报告	60
III.4.	数据记录表.....	60
第 4 部分	CO ₂ 放出测定 (方法 C.4-C)	62
IV.1.	方法的原理.....	62
IV.2.	方法的描述.....	63
IV.3.	实验数据和结果报告	65
IV.4.	数据记录表	66
第 5 部分	测压呼吸计法实验 (方法 C.4-D)	68
V.1.	测定方法原理.....	68
V.2.	测定方法描述.....	68
V.3.	实验数据和结果报告	70
V.4.	数据记录表	70
第 6 部分	密闭测定 (方法 C.4-E)	73
VI.1.	测定方法原理.....	73
VI.2.	测定方法描述.....	74
VI.3.	实验数据和结果报告	76
VI.4.	数据记录	77
第 7 部分	M.I.T.I. 测定 (方法 C.4-F)	80
VII.1.	测定方法原理.....	80
VII.2.	测定方法描述.....	80

VII.3. 实验数据和结果报告	82
VII.4. 数据记录	83
C.5. 降解 - 生化需氧量	94
1. 方法	94
11. 引言	94
1.2. 定义及单位	94
1.3. 参考物质	94
1.4. 测定方法原理.....	94
1.5. 质量标准	94
1.6. 测定方法描述.....	94
2. 实验数据和评估.....	94
3. 实验结果报告	95
4. 参考文献	95
C6 化学降解需氧量	96
1. 测定方法	96
1.1. 引言	96
1.2. 定义及单位	96
1.3. 参考物质	96
1.4. 测定方法原理.....	96
1.5. 定量标准	96
1.6. 测定方法描述	96
2. 实验数据和评估	97
3. 实验结果报告	97
4. 参考文献	97
C7 作为 pH 值函数的非生物的水解降解.....	98
1. 测定方法	98
1.1. 引言	98
1.2. 定义及单位	98
1.3. 参考物质	99
1.4. 测定方法原理.....	99

1.5.	定量标准	99
1.6.	测定方法描述	99
2.	数据	102
3.	实验结果报告.....	102
3.1.	实验结果报告	102
3.2.	实验结果处理.....	102
4.	参考文献	102
附录:	缓冲溶液.....	103
A.	CLARK 和 LUBS 缓冲溶液.....	103
B.	KOLTHOFF 和 VLEESHOUWER 缓冲溶液.....	103
C.	SØRENSEN 缓冲溶液.....	103
C.8.	蚯蚓的毒性.....	104
	人造土壤实验	104
1.	方法	104
1.1.	引言	104
1.2.	定义及单位	104
1.3.	参考物质	104
1.4.	测定方法原理.....	104
1.5.	定量标准	105
1.6.	实验步骤.....	105
2.	数据	107
2.1.	实验数据及评估.....	107
3.	实验结果报告	107
3.1.	测定结果报告	107
4.	参考文献	108
C.9.	生物降解	109
	ZAHN- WELLENS 实验	109
1.	测定方法	109
1.1.	引言.....	109
1.2.	定义及单位	110

1.3.	参考物质	110
1.4.	测定方法原理.....	111
1.5.	定量标准	111
1.6.	测定过程的描述.....	111
2.	实验数据和评估	114
3.	实验结果报告	114
3.1.	测定结果报告	114
3.2.	实验结果的解释.....	114
4.	参考文献	115
附录:	实验结果评估示例	116
C.10.	生物降解.....	119
	活性土壤仿真实验	119
1.	测定方法	119
1.1.	引言	119
1.2.	定义及单位	119
1.3.	参考物质	120
1.4.	测定方法原理.....	120
1.5.	定量标准	120
1.6.	测定方法描述.....	121
2.	实验结果和评估	125
2.1.	复合单元模式	125
2.2.	非复合单元模式	126
3.	实验结果报告	126
3.1.	测定结果报告	127
3.2.	实验结果的解释.....	128
4.	参考文献	128
C.11.	生物降解	133
	活性污泥呼吸抑制实验	133
1.	测定方法	133
1.1.	引言	133

1.2.	定义及单位	134
1.3.	参考物质	134
1.4.	测定方法的原理.....	134
1.5.	定量标准	134
1.6.	测定方法描述.....	134
2.	实验数据和评估	137
3.	实验结果报告	137
3.1.	实验结果报告	137
3.2.	数据的解释.....	138
4.	参考文献	138
C.12.	生物降解	139
	改良 SCAS 测定.....	139
1.	方法	139
1.1.	引言	139
1.2.	定义及单位	139
1.3.	参考物质	140
1.4.	测定方法原理.....	140
1.5.	定量标准	141
1.6.	实验过程描述.....	141
2.	实验数据和计算	142
3.	实验结果报告	142
3.1.	实验结果报告	142
3.2.	实验结果解释.....	143
3.	参考文献	143
C.13.	生物聚集: 流动鱼测定	146
1.	方法	146
1.1.	引言	146
1.2.	定义及单位	146
1.3.	原理和实验方法	147
1.4.	测定物质及性质.....	148

1.5.	实验的注意事项.....	149
1.6.	参考物质	149
1.7.	测定方法描述.....	149
1.8.	实验过程.....	151
2.	数据	156
2.1.	实验结果处理.....	156
2.3.	实验结果解释.....	156
3.	实验结果报告	156
3.1.	测定物质:.....	156
3.2.	测定种类	157
3.3.	测定情况.....	157
3.4.	实验结果:.....	157
4.	参考文献	158
C.14.	幼鱼的生长测定	171
1.	方法	171
1.1.	引言	171
1.2.	定义	171
1.3.	测定方法原理.....	171
1.4.	检测物质信息.....	172
1.5.	测定的有效性.....	172
1.6.	测定方法描述.....	172
1.7.	测定设计	174
1.8.	测定步骤	175
2.	实验数据和结果报告	178
2.1.	实验结果处理.....	178
2.2.	实验结果说明.....	180
2.3.	实验结果报告	180
3.	参考文献	181
C.15.	鱼在胚胎期和幼苗期的短期毒性实验.....	188
1.	方法	188

1.1.	引言	188
1.2.	定义	188
1.3.	测定方法原理.....	188
1.4.	实验物质信息.....	189
1.5.	实验的有效性.....	189
1.6.	测定方法描述.....	189
1.7.	测定步骤	191
2.	实验数据和结果报告	194
2.1.	实验结果处理.....	194
2.2.	实验结果说明.....	195
2.3.	实验结果报告	195
3.	参考文献	196
C.16.	蜜蜂敏锐的口头毒性测定	210
1.	方法	210
1.1.	引言	210
1.2.	定义	210
1.3.	测定方法原理.....	210
1.4.	测定的有效性.....	211
1.5.	测定方法描述.....	211
1.6.	测定步骤	212
2.	实验数据和结果报告	213
2.1.	数据	213
2.2.	测定结果报告	213
3.	参考文献	214
C.17.	蜜蜂急性接触毒性测定	216
1.	方法	216
1.1.	引言	216
1.2.	定义	216
1.3.	测定方法原理.....	216
1.4.	测定有效性.....	216

1.5.	测定方法描述.....	216
1.6.	测定步骤	217
2.	实验数据和结果报告	218
2.1.	实验数据	218
2.2.	实验结果报告	218
3.	参考文献	219
C.18.	组分平衡法确定吸附/解吸附	221
1.	方法	221
1.1.	引言	221
1.2.	应用范围	221
1.3.	定义及单位	222
1.4.	测定方法原理.....	225
1.5.	实验物质信息.....	226
1.6.	实验的适用性.....	226
1.7.	实验方法描述.....	226
1.8.	分析方法.....	229
1.9.	实验.....	231
2.	实验数据和结果报告	237
2.1.	吸附.....	237
2.2.	解吸附	240
3.	参考文献	244
C.19.	使用高效液相色谱 (HPLC) 对土壤和污泥的吸附系数 (K_{OC}) 进行评 价.....	282
1.	方法	282
1.1.	引言	282
1.2.	定义	282
1.3.	参考物质	283
1.4.	实验原理.....	284
1.5.	测定适用性.....	285
1.6.	定量标准	286

1.7.	实验方法描述.....	286
1.8.	测定操作.....	287
2.	实验数据和结果报告	288
3	参考文献	288
C.20.	MAGNA 水蚤繁殖试验	294
1.	方法	294
1.1.	引言	294
1.2.	定义及单位	294
1.3.	测定方法原理.....	294
1.4.	测定物质信息.....	295
1.5.	测定的有效性.....	295
1.6.	测定方法描述.....	295
1.7.	测定设计	297
1.8.	步骤	298
2.	实验数据和结果报告	302
2.1.	实验结果处理.....	302
2.2.	实验结果报告	303
3	参考文献	304

C.1. 鱼急性中毒

1. 方法

1.1. 引言

本测定方法用于导致淡水鱼急性中毒致死化学物质的测定。因此有必要尽可能掌握这些物质的水溶性、蒸汽压、化学稳定性、溶解常数和生物降解率等数据，从而有助于筛选最合适的测定方法（静态，半静态和流动法），保证测定过程中被测物浓度较为恒定。在设计测定方法和分析结果时还应考虑到其它信息（例如：结构式，纯度，主要杂质的种类和百分比，添加物的存在和数量和正辛醇/水分配系数）。

1.2. 定义和单位

急性中毒指的是接触某种化学物质很短时间在某些组织中产生的明显的不良反应。在本测定中，急性中毒的衡量标准用平均致死浓度(LC₅₀)来表示,即在给定时间内导致50%数量的被测定鱼死亡的接触物质的浓度。

所有测定物质浓度用重量体积比表示（mg/L）。也可以用重量比（mg/kg）表示。

1.3. 参考物质

可以作为测定的参考物质指的是在实验室测定条件下，测定物的响应信号没有显著的变化。

本测定没有特别规定参考物质。

1.4. 测定方法原理

极限测定需用100毫克每升进行测定从而保证LC₅₀值大于此测定浓度。

分别将鱼置于一系列含有不同试验浓度的水中96小时，至少每隔24小时记录死亡率，如果可能在每个观察时间，计算致死50%鱼的物质浓度(LC₅₀)。

1.5. 定量标准

定量标准适用于极限测定和整个测定方法和过程。

直到实验结束，对照组的死亡率不能超过10%（或总数不超过十条鱼中的一条）。

自始至终，溶解氧浓度必须大于空气饱和量的60%。

本实验过程中，测定物质的浓度应保持在起始浓度80%之内。

对于那些易溶于测定介质的物质，即溶解后形成稳定的溶液而不发生显著的挥发、降解、水解或吸收的，可认为起始溶液浓度为名义浓度值。要有证据能表明整个测定过程中浓度保持稳定并符合定量标准。

对于以下物质：

- (i) 在测定介质中溶解性差，或
- (ii) 能形成稳定的乳状液或分散液的，或
- (iii) 在水溶液中不稳定的，

起始浓度应在测定开始时在溶液中进行测定（或者，若技术条件不允许，应在水柱中测量）。浓度测定应溶解平衡一段时间后进行，但应在加入测定鱼之前。

在这些情况下，在测定中应采取进一步措施确定接触物质的实际浓度，满足定量标准。pH值变化不应超过一个单位。

1.6.测定方法描述

分为以下三种方法：

静态测定：

毒性测定过程中测定溶液没有水流产生（溶液在整个测定过程保持不变）。

半静态测定：

测定过程中溶液没有水流产生，但每隔一较长时间（如24小时）测定溶液进行更换。

流动测定：

在测定通道中，测定溶液不断进行更新，测定物质随溶液不断更新测定介质。

1.6.1.试剂

1.6.1.1. 测定物质溶液

一定离子强度的储备液用去离子水或符合1.6.1.2标准水溶解测定物配制。

测定所需浓度的溶液用储备液稀释配制，如果测定的是高浓度的，可直接将物质溶于水。通常测定的物质浓度取决其溶解度。对一些物质（其水溶解度低或有高 P_{ow} 值或形成的溶液实际为稳定的分散液的），可以不受其溶解度所限进行测定，从而保证获得其最大的可溶/稳定浓度数据。需要注意的是，该浓度下测定系统不被破坏。

超声波分散，有机溶剂，乳化剂或分散剂可辅助用于一些水溶性差的物质储备液的配制，或有助于物质在介质中的分散。当使用这些辅助物质时，测定浓度应包括相同数量的辅助物质，同时对照组中测定鱼也应使用相同数量的辅助物质。辅助物质的浓度应尽可能低，任何情况下不得大于100毫克每毫升。

测定过程中pH值不应改变。如果有显著证据表明pH值发生了变化，建议调整pH值重新进行测定并报道结果。在这种情况下，除非有特殊原因储备液的pH值应调整至稀释水

的pH值。最好用HCL和NaOH调节pH值。pH值调节过程中，储备液中被测物的浓度不应发生显著变化。如果调节过程中，测定化合物发生化学反应或物理沉淀现象应予以记录。

1.6.1.2. 贮存和稀释用水

使用Orinking供水设备(未被潜在的有毒的氯、重金属或其它物质污染)，品质优良的天然水或再造水（见附录 I）。水总硬度在10 mg/L 和250 mg/L之间（以CaCO₃为参照），pH值在6.0和8.5之间。

1.6.2. 仪器

所有实验仪器用化学惰性材料制成。

- 自动稀释系统（用于流动测定），
- 测氧计，
- 水硬度测量装置，
- 合适的温控装置，
- pH计。

1.6.3. 鱼样

测定选用的鱼应是健康的，没有显著变形的。

选择的鱼种类符合通常的标准，例如常年容易获得，便于保存，易于测定，对化学物质敏感同时也要考虑到任何经济、生物和生态所能承受的因素。在挑选鱼的种类时还要对已知数据和现存国际通用准则（见参考 1）进行比较。

附录 2 给出了建议用于测定的一系列鱼的种类。斑马鱼和虹鳟鱼首选。

1.6.3.1. 储存

测定应选择同一批相同长度和年龄的鱼。应在以下条件下至少储存12天。

载量：

适合测定系统（循环或流动）和鱼的种类。

水：

见1.6.1.2,

光：

每日光照12到16个小时，

溶解氧浓度：

至少为空气饱和量的80 %，

饲养:

每星期三或每日三次, 测定前24小时停止喂养。

1.6.3.2. 死亡率

放置48小时后, 采用以下标准记录死亡率:

- 七天内死亡率超过总数的10%:
 整个一批样作废,
- 在总数5%和10%之间:
 再储存7天时间。如果死亡率不再增加, 这批样可用于分析, 否则也作废,
- 小于总数的5%:

这批样可用于分析。

1.6.4. 适应

所有鱼样应储存在一定品质和温度的水中至少7天才可以用于测定。

1.6.5. 测定步骤

测距技术用于确定整个测定过程中测定浓度的范围。

进行没有待测物质的对照组实验, 如果有必要, 还应进行含有辅助物质的对照组实验。

视测定化合物的化学和物理性质而定, 选择恰当的静态、半静态或流动测定方法, 并符合定量标准。

接触化学物质的鱼样描述如下:

- 持续时间: 96 小时;
- 动物数量: 至少 7 个每浓度值;
- 容器: 与建议负载量相对应的容量;
- 载量: 静态和半静态测定建议最大负载量1g/L, 流动测定, 负载量也可适当增加;
- 测定浓度: 只是5个稳定常数相差不超过2.2的浓度值, 应可能使死亡率分布于0到100%之间;
- 水: 见 1.6.1.2;
- 光: 每日光照12到16个小时;
- 温度: 适合(附录 2)中的种类鱼, 但在任何测定中温度变化不超过 ± 1 ;
- 溶解氧浓度: 至少为选定温度条件下空气饱和量的60%;
- 饲养: 不需要。

应在刚开始的2小时到4小时之间和随后的每隔24小时检查一下鱼样。如果触摸鱼的尾部没有反应并且未观测到呼吸行为，可认为鱼已死亡。应取出死鱼，记录死亡率。同时记录还应包括各种可观察到的鱼样变形现象（如失去平衡，游泳和呼吸方式以及色素的改变）

pH值、溶解氧浓度和温度应每日记录。

极限测定

本测定方法描述的步骤中，极限测定用100毫克每升进行测定从而保证 LC_{50} 值大于此测定浓度。

如果测定物质的性质决定了100毫克每升的测定浓度无法达到，那么极限测定应用与测定物质的在介质中溶解度一致的浓度值进行（或者是形成稳定分散液的最大浓度值）（还可见1.6.1.1）。

极限测定应用7到10条鱼，与对照组实验用量一致（二项式公式指出如果使用10条鱼，死亡率为0，那么 LC_{50} 值比极限测定浓度值大的置信度为99.9%，如果使用的鱼数量分别为7, 8 或9， LC_{50} 值比极限测定浓度值大的置信度至少为99%）。

如果有死亡现象，就要进行完整的分析。如果观察到亚致死现象，也需加以记录。

2. 结果和评估

每一观察记录的时间段（24，48，72和96小时），在对数概率纸上以死亡率百分数对浓度作图。

如有可能，对每一观察时间段， LC_{50} 值和置信界限（ $p = 0.05$ ）应用标准步骤估算；这些数值应四舍五入为一位或最多两位有效数字（以两位有效数字为例：173.5四舍五入为170；0.127四舍五入为0.13；1.21四舍五入为1.2）。

对于那些浓度/百分比曲线斜率过大不利于计算 LC_{50} 值的情况，对图表 LC_{50} 值的估算十分有效。

如果两个相差2.2个单位的浓度值分别对应0和100%的死亡率，那么 LC_{50} 值必然落在这两个浓度值区间内。

如果观察到测定物质无法保持稳定或均匀性，那么要报道结果并注意对结果进行处理转化。

3. 实验结果报告

如有可能，实验结果报告应包含以下内容：

- 测定鱼样信息（科学名称，品系，供应商，任何预处理过程，每次测定浓度用的鱼的尺寸和数量）；
- 稀释水的来源，主要化学物性质（如pH值，硬度，温度）；
- 如果测定物水溶性差，配制储备液和测定液的方法过程；
- 任何辅助物质的浓度；
- 测定浓度列表，以及改浓度下测定液中测定物的稳定性等方面信息；
- 使用任何化学分析手段的方法步骤和实验结果报告；
- 如果进行了极限测定，报告结果；
- 选择测定方法的原因和详细过程（如静态，半静态，剂量率，流动分析速度，是否通气，鱼样负载量等等）；
- 测定仪器的描述；
- 光照制度；
- 每隔24小时溶解氧浓度，pH值和测定液的温度；
- 有证据表明测定方法符合定量标准；
- 用表格表示每一浓度下累积的死亡率值以及建议观察的每一时间段对照组实验结果（如需要使用辅助物质也要报告）；
- 测定结束后的浓度/百分数响应曲线的图表；
- 如有可能，对建议观察的每一时间段，报告LC₅₀值（置信度为95%）；
- 测定LC₅₀值的统计步骤描述；
- 如使用参考物质，报告其结果；
- 在测定过程中未引起死亡率的最大测定浓度；
- 在测定过程中引起100%死亡率的最小测定浓度；

4.参考文献

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- 2) AFNOR -Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* - Static and Flow Through methods -NFT 90-303 June 1985.
- 3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* -Static and Flow - Through methods -NFT 90-305 June 1985.
- 4) ISO 7346/1, /2 and /3 -Water Quality -Determination of the acute lethal toxicity of

substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: FLOW-through method.

- 5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden -Part II 1974.
- 6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).
- 7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
- 8) NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- 9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- 10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.
- 11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- 12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- 13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- 14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- 15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. tExp. Therap., 1949, vol. 96,99.
- 16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- 17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.
- 18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and

applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

20) StepHan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

附录 1: 再造水

合适的稀释水

所有化学物质都是分析纯。

分析用水都是优质的蒸馏水或者是电导率小于 $5\ \mu\text{Scm}^{-1}$ 的水。

蒸馏仪器不得含有任何合金制造的部件。蒸馏水装置不能使用任何含铜的材料。

储存液

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (二水氯化钙): 11.76g

用水溶解稀释定容至1升

MgSO₄·7H₂O (七水硫酸镁):4.93g

用水溶解稀释定容至1升

NaHCO₃ (碳酸氢钠):2.59g

用水溶解稀释定容至1升

KCL (氯化钾):0.23g

用水溶解稀释定容至1升

再造水

取四份储备液各25 mL混和后用溶解稀释定容至1升，向溶液中通气直至氧气浓度达到空气饱和值。

pH 值应为7.8 ± 0.2.

如有必要，用NaOH（氢氧化钠）和HCL（盐酸）调节pH值。

稀释液配置好后放置12小时，不需继续通气。

溶液中Ca和Mg离子浓度分别为2.5mmol/L，Ca和Mg离子比为4 : 1，Na和K离子比为10:1。

溶液总碱度为0.8 mmol/L。准备溶液中任何偏差都不能影响水的组成和性质。

附录2: 建议测试鱼样

建议测试鱼种类 建议测定温度范围（ ） 建议测定鱼样总长度（ cm ）

Brachydanio rerio (*Teleostei, Cyprinidae*)

(Hamilton-Buchanan) Zebra-fish 20 到 24 3.0 ±0.5

Pimephales promelas (*Teleostei, Cyprinidae*)

(Rafinesque) Fathead minnow 20 到 24 5.0 ±2.5

Cyprinus carpio (*Teleostei, Cyprinidae*)

(Linnaeus 1758) Common carp 20 到 24 6.0 ±2.0

Oryzias Latipes (*Teleostei, Poeciliidae*)

Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850)

Red killifish 20 到 24 3.0 ±1.0

Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters

1859) Guppy 20 到 24 3.0 ±1.0

Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae)

(Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill 20 到 24 5.0 ±2.0

Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae)

(Walbaum 1988) Rainbow trout 12 到 17 6.0 ±2.0

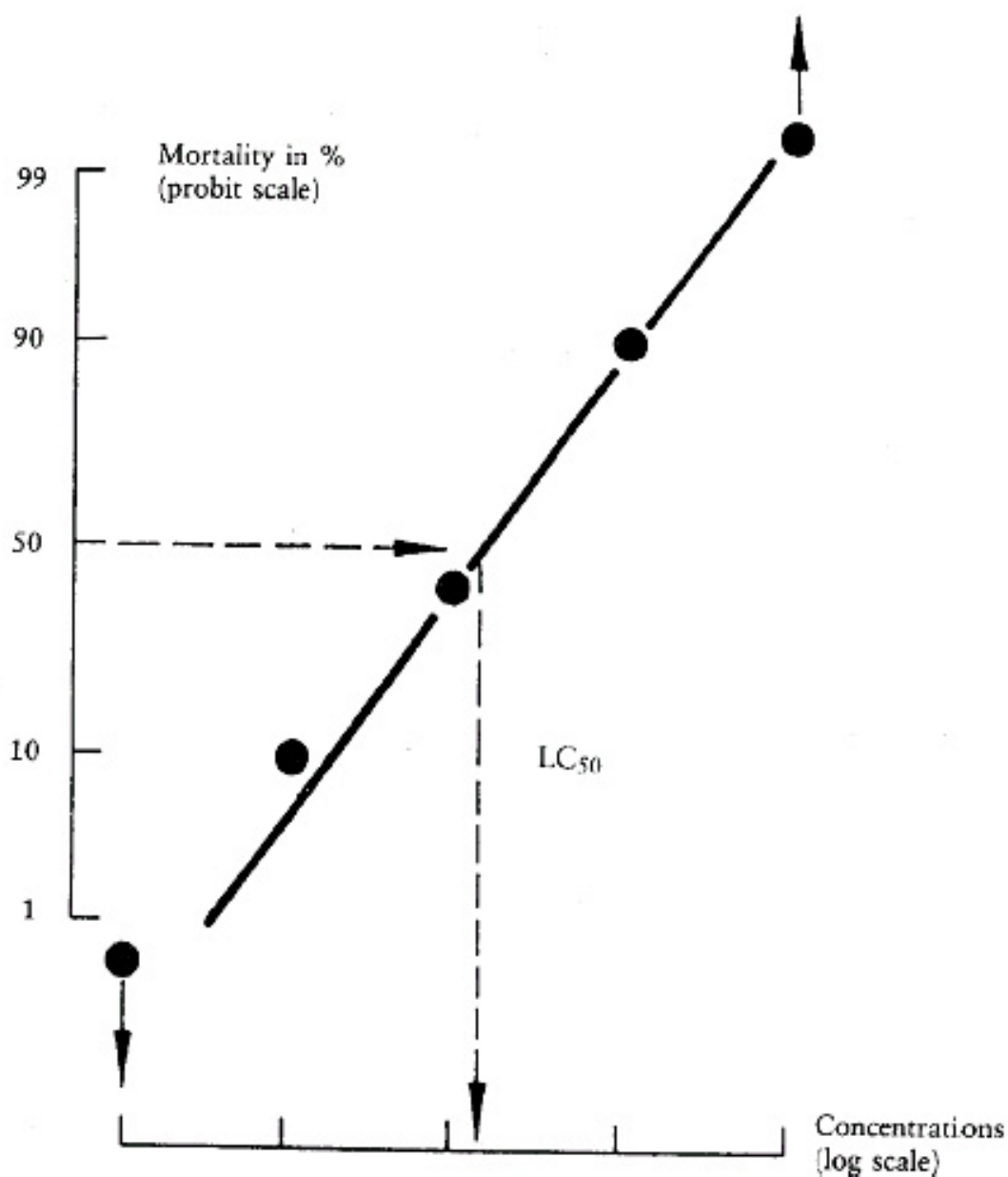
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus

1758) Golden Orfe 20 到 24 6.0 ±2.0

总结

上面所列出的鱼容易饲养而且/或者常年容易获得。它们在渔场和实验室环境容易喂养和培育。通过控制病菌和寄生虫，测定动物样品能保证健康状况良好和血统可知。这些鱼在世界上许多地方都能买到。

附录 3: 浓度示例：死亡率百分数



附录 3: 浓度示例：死亡率百分数

用对数概率纸测定LC₅₀值示例

死亡率百分数（概率坐标）

浓度（对数坐标）

C.2. 水蚤急性中毒

1. 方法

1.1. 引言

本测试方法用于导致淡水水蚤 静止的化学物质的中级有效浓度 (EC_{50}) 的测定。因此有必要尽可能掌握这些物质的水溶性、蒸汽压、化学稳定性、溶解常数和生物降解率等数据。

在设计测定方法和分析结果时还应考虑到其它信息 (例如结构式, 纯度, 主要杂质的种类和百分比, 添加物的存在和数量和正辛醇/水分配系数)。

1.2. 定义和单位

水蚤的 LC_{50} 的浓度的直接测定是通过如实验方法所述的 EC_{50} 的测定来实现的。

本实验中的 (导致水蚤) 急性中毒的毒性是指导致 (水蚤) 静止的中级有效浓度 (EC_{50}), 这个浓度按照原始数据值, 表示在给定时间内接触该浓度的物质导致 50% 数量的测定水蚤静止。

静止:

动物在轻轻敲打实验容器后 15 秒内仍不能游动被认为已经处于静止状态。

所有测定物质的浓度用重量体积比表示 (mg/L)。也可以用重量比 (mg/kg) 表示。

1.3. 参考物质

可以作为测定的参考物质指的是在实验室测定条件下, 测定物的响应信号没有显著变化的物质。

用四种不同物质作 EEC 环形实验的结果总结在附录 2 中。

1.4. 测定方法原理

极限测试需用 100 毫克每升进行测定从而保证 EC_{50} 值大于此测定浓度。

将水蚤 48 小时置于一系列含有不同浓度的被测物质的水中, 如做时间较短的实验, 在实验报告中要指明修改部分。

除非在其他特定的实验条件下, 以及足够的一系列不同的被测物质浓度, 被测物质的不同浓度会对水蚤的游动能力造成不同平均程度的影响。在实验最后, 不同的浓度会造成不同百分比的水蚤不再游动。导致 0% 或者 100% 水蚤静止的浓度直接来自实验的观察结果, 而 48 小时的 EC_{50} 值来自可能的计算。

这个实验使用一种统计系统, 所以实验方法在水蚤与被测物质的接触过程中不能更新。

1.5. 定量标准

定量标准适用于极限测试和整个测定方法和过程。

实验最后，对照实验的静止程度不能超过 10%。

对照实验下的水蚤，不能被困在水面表层。

在整个实验过程中，实验容器中的溶解氧浓度必须始终保持在 3mg/L 以上，而且无论如何不能让溶解氧浓度低于 3mg/L。

在整个实验持续过程中，被测物质的浓度必须保持在原浓度的 80% 以内。

对于那些易溶于测试介质的物质，溶解后形成稳定的溶液而且不发生显著的挥发、降解、水解或吸收的，可认为起始溶液浓度为标定浓度值。要有证据能表明测定过程中浓度保持稳定并符合定量标准。

对于以下物质：

- (i) 在测定介质中溶解性差，或
- (ii) 能形成稳定的乳状液或悬浊液的，或
- (iii) 在水溶液中不稳定的，

起始浓度应在测定开始时在溶液中进行测定（或者，若技术条件不允许，应在水柱中测量）。浓度测定应溶解平衡一段时间后进行，但应在加入被测有机体之前。

在这些情况下，在测试中应采取进一步措施确定接触物质的实际浓度，满足定量标准。

pH 值变化不应超过一个单位。

1.6. 测定方法概述

1.6.1 试剂

1.6.1.1 被测物质溶液

一定离子强度的储备液用去离子水或符合 1.6.1.2 标准水溶解测定物配制。

测定所需浓度的溶液用储备液稀释配制，如果测定的是高浓度的，可直接将物质溶于水。通常测定的物质浓度取决于其溶解度。对一些物质（其水溶解度低或有高 P_{ow} 值或形成的溶液实际为稳定的分散液的），可以不受其溶解度所限进行测定，从而保证获得其最大的可溶/稳定浓度数据。需要注意的是，该浓度下测定系统不被破坏。

超声波分散，有机溶剂，乳化剂或分散剂可辅助用于一些水溶性差的物质储备液的配制，或有助于物质在介质中的分散。当使用这些辅助物质时，测定浓度应包括相同数量的辅助物质，同时对照组中测定水蚤也应使用相同数量的辅助物质。辅助物质的浓度应尽可能低，任何情况下不得大于 100 毫克每毫升。

测定过程中 pH 值不应改变。如果有显著证据表明 pH 值发生了变化，建议调整 pH 值重新进行测定并报道结果。在这种情况下，除非有特殊原因储备液的 pH 值应调整至稀释水的 pH 值。最好用 HCL 和 NaOH 调节 pH 值。pH 值调节过程中，储备液中被测物的浓度不应发生显著变化。如果调节过程中，测定化合物发生化学反应或物理沉淀现象应予以记录。

1.6.1.2. 实验用水

本实验使用再造水（参照附录 1 和参考（2）：ISO 6341）。为避免在实验前有适应的需要，推荐使用与实验用水有相同质量（pH，硬度）的培养水。

1.6.2. 仪器

应使用标准的实验仪器及用具。与实验溶液接触的仪器最好完全是玻璃制的。

- 测氧计（有微电极或其他用于测量小体积样品中溶解氧的合适仪器），
- 足够的温度控制仪器，
- pH 计，
- 测量水硬度的仪器。

1.6.3. 测定用有机体

magna 水蚤是很好的测试种类，尽管 *puLex* 水蚤也可用于测试。被测动物在实验开始时必须有少于 24 小时的生命，是实验室培养的，没有明显疾病，以及有明确历史记录（如培养，以及任何预先处理等）。

1.6.4. 测定步骤

测距技术用于确定整个测定过程中测定浓度的范围。

进行没有待测物质的对照组实验，如果有必要，还应进行含有辅助物质的对照组实验。

水蚤与化学物质接触如下：

- 持续时间：24 小时；
- 动物数量：至少 20 个每一测试浓度，最好分为 4 批每批 5 个或 2 批每批 10 个；
- 载量：每个动物至少提供 2mL 测试溶液；
- 测定浓度：测试溶液必须在加入水蚤前即时配制，最好不用除了水以外的其他溶剂，浓度在不超出浓度比 2.2 的情况下构成一几何系列。有足够的不同浓度在 48 小时后得到 0 和 100% 的静止以及一系列中间程度的静止状态，以便和对照实验一起计算 48 小时 EC_{50} 值；

- 水：见 1.6.1.2；
- 光：任意的亮-暗循环；
- 温度：实验温度必须在 18 至 22 之间，但在任何测定中温度变化不超过 ± 1 ；
- 通风：测试溶液不能用气泡通风；
- 喂食：不需要。

对照测试与所有的测试浓度的 pH 值以及含氧量都要在实验最后测定。测试溶液的 pH 值不能改变。

易挥发物质必须在完全密封的容器中进行实验，容器要足够大以防止缺氧。

至少 24 小时后观察一次水蚤，48 小时后再观察一次。

极限测试

本测定方法描述的步骤中，极限测试用 100 毫克每升进行测定从而保证 EC_{50} 值大于此测定浓度。

如果测定物质的性质决定了 100 毫克每升的测定浓度无法达到，那么极限测试应用与测定物质的在介质中溶解度一致的浓度值进行（或者是形成稳定分散液的最大浓度值）（还可见 1.6.1.1）。

极限测试必须使用 20 个水蚤，分成两批或四批，与对照实验一样。如果静止状态出现，则进行完整的分析。

2. 结果和评估

每一观察记录的时间段（24 和 48 小时），在对数概率纸以静止率百分数对浓度作图。

如有可能，对每一观察时间段， EC_{50} 值和置信界限（ $p = 0.05$ ）应用标准步骤估算；这些数值应四舍五入为一位或最多两位有效数字（以两位有效数字为例：173.5 四舍五入为 170；0.127 四舍五入为 0.13；1.21 四舍五入为 1.2）。

对于那些浓度/百分比曲线斜率过大不利于计算 EC_{50} 值的情况，对图表 EC_{50} 值的估算十分有效。

如果两个相差 2.2 个单位的浓度值分别对应 0 和 100% 的静止率，那么 EC_{50} 值必然落在这两个浓度值区间内。

如果观察到测定物质无法保持稳定或均匀性，那么要报道结果并注意对结果进行处理转化。

3. 结果报告

如有可能，结果报告应包含以下内容：

- 测试有机体信息（学名，品系，供应商或种类，任何预处理，培养方法-包括来源，种类，喂食数量以及喂食频率）；
- 稀释水的来源，主要化学物性质（如 pH 值，硬度，温度）；
- 如果测定物水溶性差，配制储备液和测定液的方法过程；
- 任何辅助物质的浓度；
- 测定浓度列表，以及该浓度下测定液中测定物的稳定性等方面信息；
- 使用任何化学分析手段的方法步骤和结果报告；
- 如果进行了极限测定，报告结果；
- 测定仪器的描述；
- 光照制度；
- 测试液的溶解氧浓度，pH 值和温度；
- 有证据表明测定方法符合定量标准；
- 用表格表示每一浓度下累积的静止率值以及建议观察的每一时间段（24 和 48 小时）

对照组实验结果（如需要使用辅助物质也要报告）；

- 测定结束后的浓度/百分数相应曲线的图表；
- 如有可能，对建议观察的每一时间段，报告 EC_{50} 值（置信度为 95%）；
- 测定 EC_{50} 值的统计步骤描述；
- 如使用参考物质，报告其结果；
- 在测定过程中未引起静止的最大测定浓度；
- 在测定过程中引起 100% 静止率的最小测定浓度；

4. 参考文献

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- 2) International Standard ISO, Water Quality -Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989
- 3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera -crustacea) NFT 90301 (January 1983).
- 4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz,comed 1986.
- 5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (LLL).
- 6) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- 7) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99-113.
- 8) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.
- 9) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.
- 10) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM, 1977, STP 634, 65-84.
- 11) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

附录 1: 再造水

合适的稀释水（根据ISO 6341）

所有化学物质都是分析纯。

分析用水都是优质的蒸馏水或者是电导率小于 5_{μ}Scm^{-1} 的水。

蒸馏仪器不得含有任何铜制造的部件。

储存液

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (二水氯化钙):

溶于水中，配至1升

11.76 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (七水硫酸镁):

溶于水中，配至1升

4.93 g

NaHCO_3 (碳酸氢钠):

溶于水中，配至1升

2.59 g

KCl (氯化钾):

溶于水中，配至1升

0.23 g

再造稀释水

混合四种储备液各25毫升，配至1升。

往溶液中通气，使氧浓度与空气中的饱和浓度相同。

pH必须是 7.8 ± 0.2 。

如果需要，用NaOH（氢氧化钠）或者HCL（盐酸）调节pH值。

准备好的稀释水放置12小时，不需要另外通气。

溶液中Ca和Mg离子浓度和是2.5毫摩尔每升，Ca与Mg离子比是4 : 1，Na与K离子比是10 :

1。溶液总碱度是0.8毫摩尔每升。

任何准备稀释水过程中的偏差不能改变水的组成和性质。

附录2

1978年一个EEC循环测试的结果总结（同样在参考文献2中被引述）

注意：循环测试的目的是EC₅₀24小时的测定。

使用物质：

- 1) 重铬酸钾
- 2) 四丙基苯磺酸
- 3) 四丙基苯磺酸，钠盐
- 4) 三氯-2, 4, 5-苯氧基乙酸，钾盐

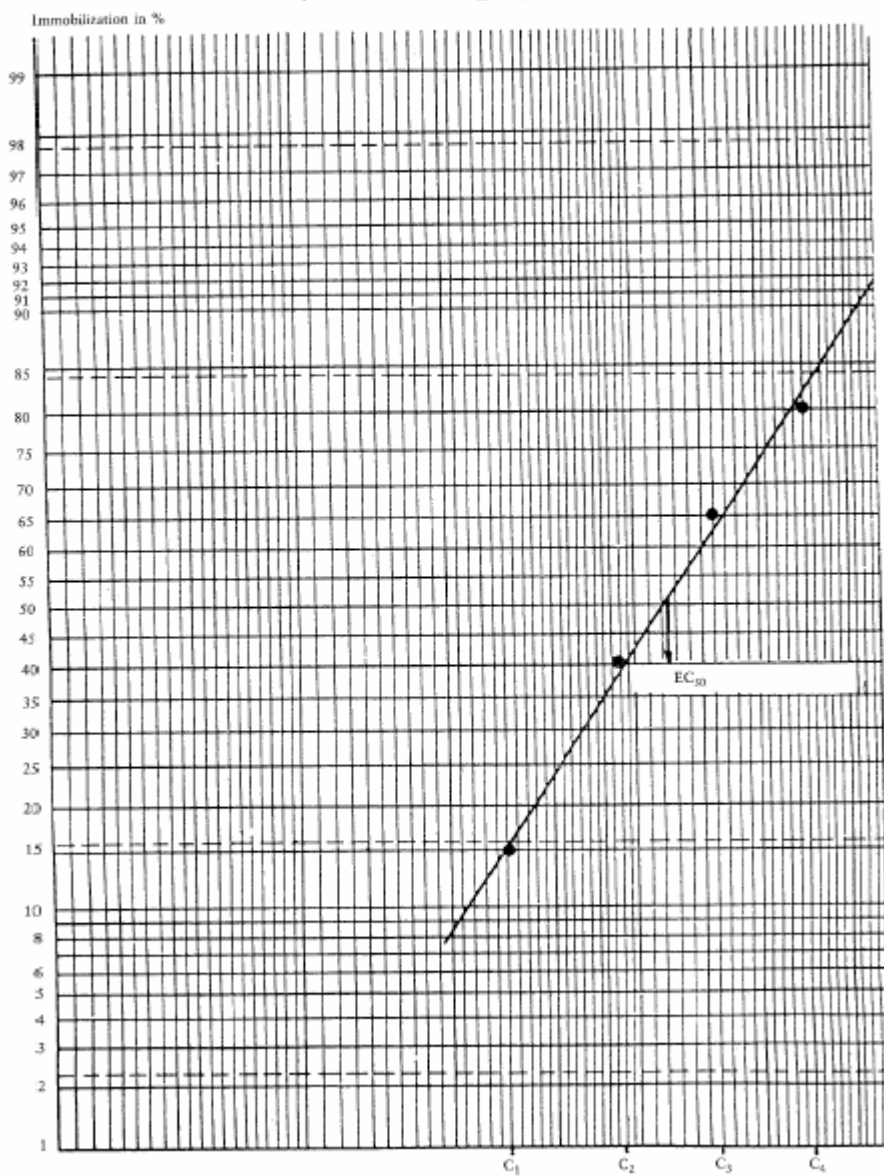
物质	参与实验数目	计算结果数目	EC ₅₀ -24 小时 mg/L平均值
1	46	129	1.5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

附录3:浓度试样:静止百分比

Appendix 3

Example of concentration: percentage immobilisation

Example of determination of EC_{50} using log-probit paper



C.3. 海藻抑制实验

1. 方法

1.1. 引言

本实验的目的是测定化学物质对于单细胞绿藻的生长影响。相对短时间(72小时)的测定可以估计对几个世代的作用。

本方法适用于几个单细胞藻类，方法描述必须和实验报告一起提供。

本方法对于水溶性物质的应用最为简单，该水溶性物质在实验条件下在水中存在。

本方法可用于不直接影响测试海藻生长的物质。

在实验前有必要尽可能掌握这些物质的水溶性、蒸汽压、化学稳定性、溶解常数和生物降解率等数据。

在设计测定方法和分析结果时还应考虑到其它信息（例如结构式，纯度，主要杂质的种类和百分比，添加物的存在和数量和正辛醇/水分配系数）。

1.2. 定义和单元

细胞密度：每毫升的细胞数；

生长：实验过程中细胞密度的增长；

生长速率：单位时间内细胞密度的增长；

EC₅₀：本方法中，导致相对于对照实验生长（E_bC₅₀）或生长率（E_rC₅₀）降低50%的物质浓度；

NOEC (无现象浓度)：本方法中，相对对照实验未能引起明显抑制生长作用的最高物质浓度。

所有被测物质浓度用重量体积比表示（mg/L）。也可以用重量比（mg/kg）表示。

1.3 参考物质

可以作为测定的参考物质指的是在实验室测定条件下，测定物的敏感度没有显著的变化。如果使用了参考物质，在实验报告中必须指出结果。

重铬酸钾可以用作一种参考物质，但它的颜色可能会影响照射细胞的光的质量和强度，以及会影响到可能使用的色谱测定法。

重铬酸钾被应用于一国际间实验室测试（见参考文献（3）和附录2）。

1.4. 测定方法原理

极限测试需用100毫克每升进行测定从而保证EC₅₀值大于此测定浓度。

选定的呈指数级生长的绿藻在实验特定的条件下，在各种浓度的被测物质中培养几个世

代。

培养测定溶液72小时，在此过程中至少每24小时测定一次每份溶液的细胞密度。这样就可以测定相对于对照实验的海藻生长的抑制作用了。

1.5. 定量标准

定量标准适用于极限测试和整个测定方法和过程。

对照实验的培养必须使细胞密度在3天内增长16倍。

本实验过程中，测定物质的浓度应保持不少于起始浓度的80%。

对于那些易溶于测试介质体的物质，溶解后形成稳定的溶液而且不发生显著的挥发、降解、水解或吸收的，可认为起始溶液浓度为标定浓度值。要有证据能表明测定过程中浓度保持稳定并符合定量标准。

对于以下物质：

- (i) 在测定介质中溶解性差，或
- (ii) 能形成稳定的乳状液或悬浊液的，或
- (iii) 在水溶液中不稳定的，

起始浓度应在测定开始时在溶液中进行测定。

浓度测定应在反应平衡一段时间后进行。

在这些情况下，在测试中应采取进一步措施确定接触物质的实际浓度，满足定量标准。

实验中可能观察到，显著数量的被测物质与海藻会有所结合。所以，为了证明与以上的定量标准一致，与海藻结合以及溶液（或者，若技术条件不允许，应在水柱中测量）中的物质的量都要考虑。然而，由于测量与海藻结合的物质带来明显技术上的问题，所以，要证明与定量标准一致，可以在最大浓度下不加海藻进行实验，在实验开始和最后测量测量浓度（或者，若技术条件不允许，应在水柱中测量）。

1.6. 测定步骤描述

1.6.1. 试剂

1.6.1.1. 测定物质溶液

一定离子强度的储备液用去离子水或符合1.6.1.2标准水溶解测定物配制。

加适当分量的溶液于海藻预先培养（见附录1）中，配成实验所选择的浓度。

通常测定的物质浓度取决其溶解度。对一些物质（其水溶解度低或有高 P_{ow} 值或形成的溶液实际为稳定的分散液的），可以不受其溶解度所限进行测定，从而保证获得其最大的

可溶稳定浓度数据。需要注意的是，该浓度下测定系统不被破坏。（例如在水面上盖上薄膜以防止水的氧化等）

超声波分散，有机溶剂，乳化剂或分散剂可辅助用于一些水溶性差的物质储备液的配制，或有助于物质在介质中的分散。当使用这些辅助物质时，测定浓度应包括相同数量的辅助物质，同时对照组中也应使用相同数量的辅助物质。辅助物质的浓度应尽可能低，任何情况下在测试介质中不得大于100毫克每毫升。

测定过程中pH值不应改变。如果有显著证据表明pH 值发生了变化，建议调整pH值重新进行测定并报道结果。在这种情况下，除非有特殊原因储备液的pH值应调整至稀释水的pH值。最好用HCL和NaOH调节pH值。pH值调节过程中，储备液中被测物的浓度不应发生显著变化。如果调节过程中，测定化合物发生化学反应或物理沉淀现象应予以记录。

1.6.1.2. 测试介质

分析用水都是优质的蒸馏水或者是电导率小于 5_{μ}Scm^{-1} 的水。

蒸馏仪器不得含有任何铜制造的部件。

以下为推荐使用的介质。

根据以下表格配制四份储备液。储备液用表层过滤或高压灭菌，在黑暗及4°C环境下保存。

储备液4只能用表层过滤灭菌。这些储备液将被稀释到最终的营养测定溶液浓度。

营养物	储备液浓度	最终测定溶液浓度
储备液1：大分子营养物		
NH ₄ Cl	1.5 g/L	15 mg/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.2 g/L	12mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.8 g/L	18 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g/L	15 mg/L
KH ₂ PO ₄	0.16 g/L	1.6 mg/L
储备液2：铁-EDTA		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	80 mg/L	0.08 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/L	01 mg/L
储备液3：微量元素		
H ₃ BO ₃	185 mg/L	0.185 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/L	0.415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L	3 x 10 ⁻³ mg/L

CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 mg/L	1.5 x 10 ⁻³ mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.01 mg/L	10 ⁻⁵ mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/L	7 x 10 ⁻³ mg/L
储备液4 : NaHCO ₃		
NaHCO ₃	50 g/L	50 mg/L

介质的pH值在与空气平衡后大约是8左右。

1.6.2. 仪器

- 标准实验仪器；
 - 合适体积的测定容器（例如250毫升锥形瓶适用于100毫升的测定溶液）所有的测定容器必须有特定的材料和规格；
 - 培养器具：可保持在21°C到25°C范围内的温度变化在±2°C的橱柜或密室，能够持续在波长400至700nm范围内的相同的照明。如果在对照实验中的海藻达到了建议的生长速率，可以认为生长所需的条件，包括光强度，已经达到满足；
- 推荐在平均测定溶液水平，400到700nm光照下使用60到120 μ E.m⁻².s⁻¹（35 到 70 x 10¹⁸ 光子.m⁻².s⁻¹范围内的光强度，使用合适的接受器。对于光测定仪器以勒克斯校正，在6000到10000勒克斯的平衡范围内都可以。达到所需光强度可用4到7只30W的普通白型荧光灯（色温大约4300K），在距离海藻培养0.35 m的地方照射。
- 细胞密度测定必须用直接数活细胞的方法，例如用有计数室的显微镜。其他方法（光度测定法，浊度测定法等）也可以使用，如果有足够的灵敏度，以及和细胞密度有足够好的相关度。

1.6.3. 测定生物

推荐使用快速生长的绿藻种类，这样培养和测定都会比较方便。最好使用下列品种：

- *Selenastrum capricornutum*, 例如 ATCC 22662 or CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, 例如 86.81 SAG,

注意：

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Gottingen, F.R.G.)

如果使用了其他种类，报告其品系。

1.6.4. 测定步骤

可能产生影响的浓度范围在范围-寻找测试基础上测定。

生长的两种测定（生物数量和生长速率）可以有大量完全不同的生长抑制测定，两种测定都必须在寻找范围测定中使用，以保证浓度的几何级数可以估计 E_bC_{50} 和 E_rC_{50} 值。

初始细胞密度

推荐在测定培养中的初始细胞密度大致在 10^4 个/毫升，对于*Selenastrum capricornutum* 和 *Scenedesmus subspicatus* 而言。当使用其他种类时，生物数量要具有可比性。

测定物质浓度

测定中，至少使用五个构成几何级数系列的浓度，浓度比不超过2.2。最低测定的浓度必须对海藻生长没有影响。最高测定浓度必须抑制相对对照实验至少50%的海藻生长，最好使海藻生长完全停止。

重复和对照

实验设计必须每个浓度包括三个重复，做三个不加测定物质的对照实验，如果有的话，做三个有辅助物质的对照实验。如有修改，实验设计可以增加不同的浓度，减少每个浓度的重复数。

测定操作

测定培养所包括的需要的测定物质浓度和需要的海藻接种体数量，通过往适当数量的海藻预培养物中加入相当分量的测定物质储备液来准备（见附录1）。

摇晃培养容器，将其放置在培养仪器中。通过晃动，搅拌或通入气体使海藻细胞呈悬浊状态，这样能改善气体交换以及减少测定溶液pH值变化。培养物必须保持在21至25°C范围内，并且控制在 $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内。

每一容器内的细胞密度在开始测定后至少在24，48和72小时后要测一次。

过滤后含有合适浓度测定化学物质的海藻介质，在直接计数外的测定细胞密度方法中被用来测定背景环境。

在实验开始及72小时后测量溶液pH 值。

在实验中，对照实验的pH值一般不超过1.5个单位的变化范围。

测定易挥发物质

至今还没有被普遍认同的方法来测定易挥发物质。当测定具有挥发倾向的物质时，可以使用有更多主体空间的封闭的测定容器。计算封闭容器的主体空间时要考虑缺少二氧化

碳的可能性。这个方法可以有所变化（见参考文献（4））。

必须尝试测定留在溶液中的物质的量，当分析用封闭容器来测定易挥发物质的结果时要非常小心。

极限测定

本测定方法描述的步骤中，极限测试用100毫克每升进行测定从而保证EC₅₀值大于此测定浓度。

如果测定物质的性质决定了100毫克每升的测定浓度无法达到，那么极限测试应用与测定物质的在介质中溶解度一致的浓度值进行（或者是形成稳定分散液的最大浓度值）（还可见1.6.1.1）。

极限测定至少进行三次，进行相同数量的对照实验。两种测定生长的方法（生物数量和生长速率）都要用于极限测定。

在极限测定中，如果在生物数量或生长速率上发现在极限测定与对照实验中有平均大于等于25%的减少，完成整个测定。

2. 实验数据和评估

将在测定培养以及对照实验中测得的细胞密度值与测定物质浓度和测定次数一起列表。每种测定物质浓度以及对照实验的细胞密度的平均值对时间（0-72小时）作图，得到生长曲线。

为了测定浓度/影响关系，应使用以下两种方法。有些物质能在低浓度下促进海藻生长，只考虑表明0到100%抑制的数据点。

2.1. 生长曲线的面积比较

在生长曲线与水平线 $N = N_0$ 之间的区域面积可以通过以下公式来计算：

$$A = (N_1 - N_0) / 2 \times t_1 + (N_1 + N_2 - 2N_0) / 2 \times (t_2 - t_1) + \dots + (N_{n-1} + N_n - 2N_0) / 2 (t_n - t_{n-1})$$

其中

A = 面积，

N_0 = 在 t_0 （测定开始）时的每毫升细胞数， o ，

N_1 = 在 t_1 时测得的每毫升细胞数，

N_n = 在 t_n 时测得的每毫升细胞数，

t_L = 实验开始后第一次测定的时间，

t_n = 实验开始后第 n 次测定的时间，

n = 实验开始后的测定次数。

每种物质的抑制生长的百分数 (IA) 通过以下公式计算：

$$IA = (Ac - At) / Ac \times 100$$

其中

Ac = 对照实验曲线与水平线 $N = N_0$ 之间的面积，

At = 不同浓度的测定曲线与水平线 $N = N_0$ 之间的面积，

IA = 对于相应浓度在半对数或半对数概率纸上作图得到的值。如果在概率纸上作图，用眼观察或计算回归得到一条合适的直线。

EC₅₀ 值可以从回归曲线上估计出，从与抑制50% (IA = 50%) 相对应的浓度读出。要清楚表示关于这个计算方法所得到的值，建议使用符号 E_bC₅₀，这个符号有必要与合适的接触时间一起引用，例如 E_bC₅₀ (0-72小时)。

2.2. 生长速率比较

以指数增长培养物的平均特定生长速率 (μ) 可以由以下公式计算：

$$\mu = (\ln N_n - \ln N_0) / (t_n - t_0)$$

其中 t_0 是实验开始的时间。

同样的，平均特定生长速率也可以从 $\ln N$ 对时间的回归直线的斜率推出。

每一测定物质浓度的特定生长速率的抑制百分数 ($I_{\mu t}$) 通过以下公式计算：

$$I_{\mu t} = (\mu_c - \mu_t) / \mu_c \times 100$$

其中

μ_c = 对照实验的平均特定生长速率

μ_t = 每种测定物质浓度 t 的平均特定生长速率

每种测定物质的平均特定生长速率的降低百分数与对照实验的比较，与浓度的对数值作图，EC₅₀ 值可从该图中读出。要清楚表示关于这个计算方法所得到的 EC₅₀ 值，建议使用符号 E_rC₅₀，必须指出测定时间，例如，如果该值是在 0-72 小时测定的，符号表示为 E_rC₅₀ (0-72 小时)。

注意：特定生长速率是对数值，生长速率的细小变化可以导致生物数量的巨大变化。所以 E_bC 和 E_rC 值不在数值上具有可比性。

2.3. NOEC 值的计算

没有观察到影响的浓度由合适的多样品对照 (例如对变化的分析以及 Dunnett 测定) 统计

步骤得到，使用单独的重复值，该值为生长曲线A（见2.1）下的面积或特定生长速率 μ （见2.2）。

3. 实验报告

如有可能，结果报告应包含以下内容：

- 测定物质：化学特性数据；
- 测定有机体：来源，实验室培养，品系号，培养方法；
- 测定条件；
- 测定开始以及最后的数据以及测定的持续时间；
- 温度；
- 介质组成；
- 培养仪器；
- 测定开始及最后的溶液pH值（如果观察到pH值变化超出1.5个单位，提供解释）；
- 所用的使测定物质溶解的载体和方法，以及测定溶液中载体的浓度；
- 光强度和质量；
- 测定的浓度（测得的或理论值）；
- 结果；
- 在每一测定点，每种测定细胞密度方法的每一容器的细胞密度；
- 平均细胞密度值；
- 生长曲线；
- 与浓度影响有关的图表表示；
- EC值和计算方法；
- NOEC值；
- 其他观察到的影响。

4. 参考文献

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag 'Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*', in: Rudolph/Boje: Bkotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
- 3) ISO 8692- Water quality -Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus*

subspicatus and *Selenastrum capricornutum*.

4) S.Galassi and M.Vighi -Chemosphere, 1981, vol.10, 1123-1126.

附录 1：培养海藻步骤示例

一般观察

培养的目的在于通过以下步骤获取用于毒性测定的海藻。

采取合适的实验手段避免海藻受到可能的细菌感染（ISO4833）。无菌的海藻固然需要，但最重要的是得到单种海藻。

所有操作都要在消毒过的环境下进行，避免被细菌和其它藻类污染。被污染的藻类样品应弃去。

获取藻类样品步骤

营养液的准备（介质）：介质可用储备液稀释获得。对于固体介质，加入 0.8% 的海藻。使用的介质应是无菌的。用高压灭菌器灭菌可能导致 NH_3 的损失。

储备物质：

储备物质是将一些小的藻类物质转移到新鲜的介质中作为起始测定物质。如果不是经常使用，可以用倾倒海藻试管法弃去这些物质。

储备物质在锥形瓶中用合适的介质培养（体积为 100mL）。在 20 照明一周后转移。

在转移过程中，“老”储备物质用无菌的移液管转移到装有新鲜的介质的烧瓶中，用快速生长的种类使得起始浓度增至原来 100 倍。

从生长曲线可得到样品种类的生长速度。得到这个数据后，就可以估计哪一种密度的储备物质应被转移到新鲜的介质中。当然，这一切必须在物质死亡之前完成。

预处理

预处理的目的在于给出用于接种测定物质合适的藻类数量。预处理过程通常在培养期后三天左右，实验条件同测定条件，同时伴随着藻类呈指数数量级的生长过程。如果藻类物质含有变形和不正常的细胞，应弃去。

附录 2

ISO8692 淡水质量海藻生长抑制试验，对 *Scenedesmus subspicatus* and *selenastrum capricornutum* 做了测定。16 个实验室联合试验的重铬酸钾给出了以下实验结果：

	平均 (mg/L)	范围 (mg/L)
E _r C ₅₀ (0-72 小时)	0.84	0.60 到 1.03
E _b C ₅₀ (0-72 小时)	0.53	0.20 到 0.75

C.4 完全生物降解度测定

第 I 部分 总则

I.1 引言

一般认为能用来检查在有氧含水的环境中化学物质是否易被生物降解的方法有六种：

- 溶解有机碳 (DOC) 消耗法(方法：C.4-A)
- 修正 OECD 屏蔽 DOC 消去法。(方法 C.4-B)
- 二氧化碳评估法 (修正 STURM 方法)(方法。C.4-C)。
- 呼吸计及测定压力法。(方法 C.4-D)
- 密封瓶法。(方法 C.4-E)
- MITI(Ministry of International Trade and Industry –Japan)(方法 C.4-F).

以上就是一般的和普通的考虑。部分 II 到部分 IV 是特殊的方法。附录包括定义，公式，和参考文献。

1988 年，完成的一项国际 OECD 试验比较测定，证明这些方法给出的实验结果是有效的可靠的。然而，由于考虑到测定的物质的物理性质不同。其中一种或几种测定方法会更为有效合适。

I.2 选择合适的方法

为了选择合适的方法，该化学物质的溶解性，蒸汽压，吸附性质，是必须要了解的。为了计算理论值，并且为了检查参数的测定值，我们必须知道化学物质的结构或化学式。

在水中的溶解度达到 100mg/L 的化学物可以用以上所有的方法来测定。只要它们无挥发性和吸附性。反之，若有挥发性和吸附作用，则按表格 1 选取合适的方法。附录 II 中有处理难溶于水以及挥发性化学物质的方法。只要容器有足够的空间(要有合适的塞子)，中等挥发性的物质可用 DOC 消耗法测定。在此种情况下，必须作无机性降解对照组实验

以防任何物理损失。

表 1 方法的应用范围

测定方法	分析方法	物质性质		
		难溶	挥发性	吸附性
DOC 消耗法	溶解有机碳	-	-	+ / -
修正 OECD 消耗法	溶解有机碳	-	-	+ / -
二氧化碳评估法	呼吸运动产生的 CO ₂	+	-	+
呼吸计测压力法	呼吸运动耗氧量。	+	+ / -	+
密封瓶法	呼吸运动，溶解氧	+ / -	+	+
M I T I	呼吸运动，耗氧量。	+	+ / -	+

测定物质中，主要组分的纯度和比例应该用来解释获得的实验结果，特别是当实验结果值偏小时。

测定物质对细菌的毒性可能对选择合适的测定浓度很有用，甚至对更正地生物降解值的解释有决定作用。

I.3 参考物质

为了检查步骤可靠性，建立生物降解里标准的参考化学物质应该放入合适的长颈瓶中和测定物作对比试验。

合适的化学物有苯胺(新蒸馏的)，醋酸钠，苯甲酸钠，这些物质用以上方法能全部降解，甚至不需要加入疫苗。

一般建议一个参考物质应该容易被生物降解，但只有加入疫苗后才会降解。有人建议邻苯二甲酸氢钾，但要作为一个参照物，还需要进一步的证据。

在透气性试验中，含氮化合物可能因为硝化作用而影响耗氧量。(见附录 II 和 V)。

I.4 测定方法原理

无机介质中的测定物溶液或悬浮液在黑暗中或散射光中被接种和培养。接种疫苗的 DOC

量要比测定物尽可能的小，差别是由于细菌内部活动造成的。可通过有疫苗无测定物的空白试验来校正。尽管有测定物存在时疫苗内部活动不和无测定物是精确相等。另外，做一个平行试验检查步骤的正确操作。

一般来说，降解程度决定于各种参数;如 DOC 产生量，二氧化碳产生量和氧气消耗量。足够的频繁测量次数以保证能分辨生物降解的开始时刻和结束时刻。用自动呼吸机可使测量无间隔进行。DOC 有时可测量另外一个参数，但是通常只在测验开始时和结束时。特殊的物质分析方法同样可用于估计测定物的生物降解。并同时测定中间物质的浓度(在 MITI 中此项是必需的)。

正常的话，测定持续 28 天，当然也可能比 28 天提前。如当生物降解曲线 3 次测量已达到高平台期。测定也可能超过 28 天，如曲线显示降解已开始但未达到高平台期。

I.5. 定量标准

I.5.1. 重现性

因为生物降解的活力以及混合大量细菌作为疫苗，测量必须有重现性。作为一个共同经验。开始时加入的微生物越多，实验结果的变动越小。同组实验也显示，不同实验室获得的实验结果可能有大的变动，但好的实验结果是由容易被生物降解的测定物得到的。

I.5.2 测定的有效性

一个测定是有效的，如果它满足：在测定结束时，高平台期，和 10 天观测期时，各组实验化学物质的变化的极差小于 20%。或是参考物在 14 天内生物降解百分数达到易分解水平。如任一条件没有满足，因为该方法的严密性，测定必须重复。低值不意味着在该环境不能被生物降解，但它意味着以改做更多的工作来建立生物降解力。

如果要做一个毒性试验。测定物和参照物在 14 天内降解少于 35% (DOC 方法) 或少于 25% (Thod 或 ThCO₂)。则认为该物质有抑制作用。(见俘附录 IV)。如果有可能用其低浓度或高浓度 (不超过 30mg/L) 重复试验。

I.6. 一般步骤和准备工作

该实验的一半情况列于表 2。实验仪器和各个实验需要的特殊设备列在各实验标题之下。

表 2 测定条件

测定	DOC 消耗法	二氧化碳 评估法	呼吸计 测压力	修正 OECD	密封瓶法	MITI(1)
----	------------	-------------	------------	------------	------	---------

			法	法		
测定物浓度 (mg/L, mg DOC /L mg ThOD/L)	10-40	10-20	100 50-100	10-40	2-10 5-10	100
疫苗数量 (个/升, 大约)	≤30mg/L SS 或 100 mg 流出物/L (10 ⁷ —10 ⁸)		0.5mL 副 流出物/L (10 ⁵)	≤5mL 100 mg 流出物/L (10 ⁴ —10 ⁶)	30mg/L SS 流出物/L (10 ⁷ —10 ⁸)	
矿物培养液元素组成 (mg/L)						
P	116				11.6	29
N	1.3				0.13	1.3
Na	86				8.6	17.2
K	122				1.22	36.5
Mg	2.2				2.2	6.6
Ca	9.9				9.9	29.7

Fe	0.05-0.1	0.05-0.1	0.15
PH	7.4±0.2		最适宜 7.0
温度	22±2		25±1
DOC=溶解有机碳分解法。ThOD=理论需氧量。SS=悬浮固体			

I.6.1 溶剂水

要求去离子水或蒸馏水，防止有抑制物（如 Cu^{++} 离子）。测定物引进的有机碳不得超过 10%。更高纯度的水用来消除高的空白值是有必要的。杂质可能来源于不纯的样品，或是离子交换树脂，或细菌的溶解物。每次测定应用同一种水。即先用 DOC 方法分析，但这种分析对密封瓶是没有必要的。淡水的耗氧量必须比较低。

I.6.2 矿物元素储备液。

为了制备测定液，先必须制备合适浓度的储备液。制备好的储备液可用于各种分析方法（稀释不同倍数）：DOC 消耗法，修正 OECD 法，二氧化碳评估法，呼吸机测压力法，密封瓶法。

MITIDE 稀释倍数，特殊矿物介质的准备工作在每一个实验方法标题下给出。

储备液

用分析纯试剂制备下列储备液：

(a) KH_2PO_4	8.50g
K_2HPO_4	21.75g
Na_2HPO_4	33.40g
NH_4Cl	0.50g
溶于水，稀释到 1 升，pH 为 7.4	
(b) CaCl_2	27.50g
或 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36.40g
溶于水稀释到 1 升。	
(c) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.50g
溶于水稀释到 1 升。	
(d) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25g
溶于水稀释到 1 升。	

注意：为了避免使用前立刻准备以上溶液，每升溶液中加入一滴浓盐酸或 0.4 克 EDTA。

I.6.3 矿物质储备液

举例来说，如果溶解度超过 1g/L,可将测定物或参照物 1-10 克溶于去离子水，稀释到 1 升。

否则，在矿物质溶液中配置储备液，或直接将测定物加入矿物质溶液中。处理难溶物质的见附录 II,但对于 MITI 方法，溶剂和乳化剂都不得使用。

I.6.4 疫苗

疫苗可从多种途径得到：活化淤泥，下水道污水（未经氯化消毒），地表水以及泥沙，以上几个的混合物。对于 DOC 消耗法，二氧化碳评估法，和呼吸计法，如果使用了污泥，必须是从植物根部或是处理生活污水设备的泥土。从其他地方取回的已经发现实验结果有较高的分散度。对于修正的 OECD 粉末法，和密封瓶法，需要一些稀释过的没有经过污染的疫苗。更好的是从植物根部或处理污水设备的排出的污水。对于 MITI 测定，疫苗来自于各种资源，在该方法的标题下有描述。

I.6.4.1 活化污泥的疫苗

从通风透气长有污水处理植物的水槽或是实验室污水处理设备搜集活化污泥。如有必要用筛子除去粗的粒子，保证沉淀物在有氧环境中。

在过筛后可选择自然沉淀或是离心分离（例如：1000g 分离 10 分钟），抛弃表层物质，可用无机介质洗涤沉淀物，将浓的沉淀物悬浮于矿物环境，使之超过 3-5 克悬浮物/升，活化直到达到要求。

沉淀物必须取之于合适的普通的工作植物，如果沉淀物不得不采自于高处理效率的植物，或被认为可能携带抑制物，则必须洗干净。沉淀或离心，经完全混匀后，重新悬浮，去表面，再次在更大空间悬浮洗涤，直到污水没有催化剂或抑制剂。

在完全悬浮化完成后，或是未处理的沉淀，使用前先称量干重。

更进一步的处理方法，是纯化活化沉淀物（3-5g 悬浮物/升），在机械搅拌器中等速度处理沉淀物 2 分钟。沉淀搅拌后，澄清 30 分钟。或视情况更长。倒出其中的液体做疫苗使用。

I.6.4.2 疫苗的其他来源。

同样可以用处理植物的排放污水或是实验室污水处理设备得到疫苗，收集新鲜的疫苗，在运输时保证有氧活化。

澄清疫苗 1 小时或用粗糙滤纸过滤，活化滤液直到满足要求。这种疫苗可能每升矿物培养液中可能要用 100mL。

更进一步的疫苗是地表水，用此方法时，收集合适的地表水，例如：河流湖泊。保证活化直到满足要求，过滤或离心浓缩疫苗。

I.6.5 疫苗的预处理

疫苗可能预处理适应了实验条件，但不一定适应了测定物。预处理主要在矿物介质中氧化污泥或污水 5 到 7 天。预处理有时可将减少空白值，提高测定方法的精密度。而对 MITI 方法，预处理是没有必要的。

I.6.6 无机对照组

需修改如有需要，可检查测定物的无机降解（非生物降解），方法是通过测量无菌对照组的 DOC 消耗量，或二氧化碳评估法。无菌花可用膜过滤，或加入一定量的毒性物质。如果是用膜过滤，给样品消毒以保证无菌。除非测定物的吸附可能已被排除，否则检测样品的 DOC 变化。特别是用活化污泥中的细菌测量生物降解程度，必须包括一个无菌对照组。

I.6.7 长颈瓶数量

长颈瓶数量在每个实验标题下有描述。

下列类型的组合可能会用到：

- 悬浮测定组：包括测定物和疫苗。
- 疫苗空白组：只有疫苗。
- 步骤对照组：包括参照物和疫苗
- 无菌对照组：包括测定物，无菌
- 吸附对照组：包括测定物，疫苗，无菌设备。
- 毒性对照组包括测定物，参照物和疫苗。

对于悬浮组和疫苗空白组，必须是平行实验。建议在其他长颈瓶也采用平行实验。

但这不一定能做到。只要保证样本和仪器以确保 10 天观测期数据变化能读出。

I.7.实验数据和评估

为了计算 D_t ，我们使用了容器和疫苗的两个参数测量的平均值。特殊测定的公式在下节给出。降解的过程用图表形式表示，10 天的视察期也说明清楚。计算和实验结果报告 10 天观测期的百分数值，稳定期，测定结束时的值，也是合理应该的。

在呼吸计测定中，含氮化合物可能因为硝化作用影响耗氧量（见附录 II 和 IV）。

I.7.1.用 DOC 消耗法测定降解度

几个样品每次生物降解百分数必须分开计算，因为每个测定瓶含有测定物是使用的 DOC 测量平均值，以保证测定的有效性。Dt 可用下列公式计算：

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16[2C + 1/2(h - c1 - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} mg / mg$$

上式中：

Dt = %时间 t 生物降解百分数

C₀ = 在有测定物时代疫苗介质中开始时平均 DOC 浓度 (mg DOC/L)

C_t = 在有测定物时代疫苗介质中时间 t 时平均 DOC 浓度 (mg DOC/L)

C_{b0} = 在空白无菌矿物介质中起始 DOC 浓度 (mg DOC/L)

C_{bt} = 在空白无菌矿物介质中时间 t 时 DOC 浓度 (mg DOC/L)

I.7.2 测定生物降解度的特殊分析方法

当特殊分析方法数据是可靠的，可以从下式计算主要生物降解度：

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

上式中：

Dt = %时间 t 时生物降解度，正常为 28 天。

S_a = 实验结束时带疫苗介质中生育测定物的量。

S_b = 空白测定溶液中测定物之加入的量。

I.7.3 无机降解

如做了无菌对照组，可从下式计算无机降解百分数：

$$\% \text{无机降解百分数} = \frac{C_{S(0)} - C_{S(t)}}{C_{S(t)}} \times 100$$

上式中：

C_{S(t)} 天数为 0 时无菌对照组的 DOC 浓度。

C_{S(0)} 天数为 t 时无菌对照组的 DOC 浓度。

I.8.实验结果报告

测定结果报告应包括(如可能)：

— 测定物与参照物的浓度；

- 测定条件；
- 污泥中工业废物含量和性质，如果知道的话；
- 测定持续时间和温度；
- 对于难溶物的处理方法；
- 使用何种方法，如有修正给出科学解释和理由；
- 数据记录纸；
- 任何观察到的抑制现象；
- 特殊的化学分析数据，如果有的话；
- 中间物的分析数据，如有的话；

测定物和参考物生物降解百分数对时间作图，延迟阶段，降解阶段，10 天观测期，斜坡期能明显判断出。测定包括多个实验的有效数据，图中应使用生物降解百分数的平均值。

- 10 天观测期后，以及高稳定期，实验结束时的百分数变化。

II 部分 DOC 消耗法（方法 C.4-A）

II.1 方法原理

一定已知体积的疫苗矿物培养液，包含一已知浓度测定物(10-40mg/L)，微量的有机碳在黑暗中或散射光中 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 进行氧化。

生物降解由 DOC 方法在 28 天同一周期内极短时间间隔进行测定。降解百分数由 DOC 浓度进行表达和计算(经过疫苗空白组的校正)。总的生物降解百分数可由开始时和结束时化学物分析实验结果进行计算。

II.2.方法描述

II.2.1 仪器

- (a) 锥形瓶,如 250mL 到 2L。决定与需要进行的 DOC 分析的溶液体积。
- (b) 振摇机(摇动锥形瓶) ,或自动温度控制器或恒温房,保证足够的能量和所有瓶中富含氧气。
- (c) 过滤装置,合适的过滤膜。
- (d) DOC 分析仪。
- (e) 溶解氧测定仪。
- (f) 离心机。

II.2.2.无机矿物液的准备

为了准备储备液,见 I.6.2

用 800mL 水混合 10mL 溶液(a),加入 10mL 溶液(b)到(d)中,稀释到 1 升.

II.2.3 疫苗的准备和预处理:

疫苗可从各种途径获得:活化污泥,下水道污水,地表水,以及以上的混合物,

见于 I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 和 I.6.5 .

II.2.4 试剂瓶准备.

举例来说,将 800mL 无机培养液加入到 2L 锥形瓶,加入足量的测定物和参考物的储备液,使化学物质浓度相当于 10-40mg/L,检查并对 pH 值进行调节,有必要的,调至 7.4。锥形瓶中加入活化污泥或其他疫苗源,是最终溶液浓度不大于 30mg 悬浮物/升.同时准备疫苗对照组,无参照物或无测定物.若需要,用一个容器检验包含相当的测定物或参照物的矿物培养液的可能抑制作用.

同样,若有需要,进一步建立无菌组,检查测定物是否已被无机降解,方法使用测定物的无菌溶液 .另外,如怀疑测定无可能被玻璃,沉淀物严重吸附,预先做一个评估,以测定吸附的程度,然后决定该方法对此化学物是否合适(见表 1)。

将每个瓶用矿物培养液稀释到 1 升,混匀后,从每个瓶中取出样品,调试初始时 DOC(见附录 II.4)盖上锥形瓶,如用铝箔,这样可是空气自由流通.然后将容器放入到振摇机中开始测定。

II.2.5.典型流程使用试剂瓶

1 号瓶和 2 号瓶:悬浮测定.

3 号瓶和 4 号瓶:疫苗空白对照组.

5 号瓶:过程控制组(有必要的用此更好)

6 号瓶:无菌对照组

7 号瓶:吸附对照组

8 号瓶:毒性对照组

见 I.6.7.

II.2.6 测定步骤

整个测定中,在已知的时间间隔内重复测定 DOC 浓度.间隔要尽量短 ,保证测定 10 天观测起开始时和结束时的百分数变化 ,每次的测定取的溶液体积尽可能小。

为了防止取样时造成瓶中的液体挥发损失 ,有必要的 ,不加少量的水。取样时应混匀培养液 ,使粘附在瓶壁上的样品溶解或悬浮 ,取样后立刻用膜过滤或离心分离.在同一天内

分析过滤或离心的样品，否则存储在 2-4 度环境中，最多不超过 48 小时,或在低于-18 下保存更长时间。

II.3.实验数据和实验结果报告

II.3.1 实验结果处理

计算时间 t 生物降解百分数,按 I.7.1 方法(DOC 测定),或选择 I.7.2 方法(特殊分析)计算所有提供的数据.

II.3.2 数据的有效性

见 I.5.2

II.3.3.实验结果报告

见 I.8.

II.4 数据记录格式

后面有一个数据表格例子

DOC 消耗法测定

1. 实验室
2. 开始时的数据纪录.
3. 测定物

名称

储备液浓度:mg 化学物/L

培养液中起始浓度:mg 化学物/ L.

4. 疫苗

来源.

处理方法

预处理（有的话）

反应混合物中悬浮物的浓度 mg/L。 .

5 有机碳测定

有机碳分析：

	试剂瓶序号	N 天以后的 DOC(mg/L)				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x

测定物加疫苗	1	a1					
		a2					
		a(平均) $C_{a(t)}$					
	2	b1					
		b2					
		b(平均) $C_{b(t)}$					
无测定物的疫苗空白试验	3	c1					
		c2					
		c(平均) $C_{c(t)}$					
	4	d1					
		d2					
		d(平均) $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6 原始数据处理

试验瓶号		N 天后生物降解百分数				
		0	n1	n2	n3	n4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
平均 (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 和 D_2 如果条件不同不能取平均。

注意：毒性测定与参照物测定可用类似格式。

7 吸附对照组

	时间 (天)	
	0	T
无菌对照组 DOC 浓度 (mg/L)	$C_{S(0)}$	$C_{S(t)}$

$$\% \text{生物降解度} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. 特殊化学品分析(可供选择的方案)

在试验结束时, 初级降解化学品%试验的残余量 (mg/L)

无菌控制 S_b

接种试验 S_a

培养基

第 III 部分. 改进 OECD 筛选测定方法(方法 C.4-B)

III.1. 测定方法原理

一份已测定体积的矿质培养基(包含一种已知浓度的测定物质(10-40 mg DOC/L)作为其唯一的微量有机碳源)以每升培养基 0.5mL 的用量加入流出液,混合物在 22 ± 2 黑暗中或散射光下通气。

在 28 天的周期里,伴随着频繁的 DOC 分析,降解不断进行.生物降解度用以初始浓度百分比的形式表达的 DOC 浓度降低(空白培养液试验修正)来计算。也可以通过诱导期始末的辅助化学分析来计算生物降解度。

III.2. 测定方法描述

III.2.1. 仪器

- (a) 锥形瓶,根据 DOC 分析所需体积从 250mL 到 2L.
- (b) 振动机,可容纳锥形瓶,自动控温或恒温条件下使用,有足够功率维持所有锥形瓶的有氧条件
- (c) 带有合适的薄膜的过滤装置
- (d) DOC 分析仪
- (e) 溶解氧测定仪.
- (f) 离心机.

III.2.2. 矿质培养基的准备

储备液的制备,见 I.6.2.

将 10mL 溶液(a)用 80mL 水稀释,将 1mL 溶液(b)加入(d)中,用水稀释到 1L。

此方法只用 0.5mL 流出液/L 作为培养液,因此培养基可能需要用痕量元素和生长因子加强.可以在每升最后的培养基加入 1mL 以下溶液。

痕量元素溶液：

四水硫酸锰, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39.9mg
硼酸, H_3BO_3	57.2mg
七水硫酸锌, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42.8mg
钼酸铵, $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34.7mg
Fe-EDTA 螯合物(FeCl_3 已二胺四乙酸)	100.0mg
用水稀释至 1000mL	
维生素溶液:	15.0mg
酵母萃	

将酵母萃溶于 100mL 水,通过 0.2 微米膜滤菌,或新鲜制备。

III.2.3. 培养液的制备和预处理

培养液取自浓集植物的二次流出液或主要来自生活污水的试验值。见 I.6.4.2.和 I.6.5. 每升矿质培养基 0.5mL 用量。

III.2.4. 锥形瓶的准备

例如,将矿质培养基以每份 800mL 用量引入一些 2L 锥形瓶,将足量试验物质和参比物质储备液分别加入不同锥形瓶中(相当于 10-40mg DOC/L 的浓度).检验 PH 值,如有必要调至 7.4. 以 0.5mL/L 的污水流出量加入锥形瓶(见 I.6.4.2.).同时在矿质培养基中准备培养液调节剂但不加入试验或参比物质.

如有要求,用一个容器通过加入一份包含有矿质培养基中对照量试验物质和参比物质浓聚物的溶液来检验试验物质可能的抑制作用.

同样,如有必要的话,再准备一个无菌锥形瓶通过未接种的化学物质溶液来检验试验物质是否降解(见 I.6.6.).

另外,如怀疑试验物质显著地被玻璃,污泥等吸附,首先初步估计可能的吸收程度进而对该物质检验的可行性进行评估(见表 1).准备一个装有试验物质,培养液和杀菌剂的锥形瓶.

将所有装有矿质培养基的锥形瓶补足 1L,混合后从每一瓶中取样测定 DOC 的初始浓度(见附件 II.4).盖住锥形瓶 (如用铝箔),但允许与外界空气自由气体交换.然后将导管通入振动机准备开始试验.

III.2.5. 典型试验中的锥形瓶数

锥形瓶 1 和 2: 测定悬浮液

锥形瓶 3 和 4: 空白培养液

锥形瓶 5: 过程控制

最好和当有必要时:

锥形瓶 6: 非生物无菌对照

锥形瓶 7: 吸附对照

锥形瓶 8: 毒性对照

也见 1.6.7.

III.2.6. 进行试验

在整个试验中,每隔指定时间测定每个瓶中的 DOC 浓度两次,足够频繁以能够测定 10 天观

察周期的开始和 10 天观察周期末的减少百分数.每次测定取最少需要量的试验悬浮液.如有必要,加适量水稀释防止样品大量蒸发损失.取样前充分混合培养基并且保证附着在器壁上的物质溶解或悬浮.取样后立即薄膜过滤或离心(见附件 II.4).当天分析滤过或已离心的样品,否则在 2-4°C 保存不超过 48 小时,或低于-18°C 保存更长的时间。

III.3. 试验数据和结果报告

III.3.1. 数据处理

计算 I.7.1. (DOC 测定)给定的时间 t 时的降解百分数,或可选择的 I.7.2. (特效分析).

所以数据记录在提供的数据表上.

III.3.2. 试验结果的有效性

见 I.5.2.

III.3.3. 报告

见 I.8.

III.4. 数据记录表

以下给出一张数据记录样表.

改进 OECD 筛选试验

1. 实验室

2. 试验开始日期

3. 试验物质

名称:

储备液浓度: mg 试验物质/L

培养基初始浓度: mg 试验物质/L

4. 培养液

来源:

给定处理方法:

预处理(如有):

反应混合物中悬浮固体浓度:mg/L

5. 碳测定

碳分析器 :

	锥形瓶 nr		n 天后 DOC(mg/L)				
			0	n ₁	n ₁	n ₃	n _x
试验物质 加培养液	1	a ₁					
		a ₂					
		a, 平均 C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, 平均 C _{b(t)}					
无试验物质 的空白培养液	3	c ₁					
		c ₂					
		c, 平均 C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, 平均 C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. 原始数据评估

锥形瓶 nr		n 天后%降解率				
		0	n ₁	n ₁	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0				
平均(*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*)如 D₁ 和 D₂ 如差异显著,不能取平均.

[注]: 参考物和毒性对照物可用相似的格式.

7. 非生物对照(可选择)

	时间(天)	
	0	t
DOC 浓度(mg/L) 无菌对照物	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{非生物降解率} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. 特殊化学分析(可选择)

	测定未试验物质余额	%初级降解
非生物对照物	S_b	
已接种试验培养基	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

第 IV 部分 CO₂ 释放测定(方法 C.4-C)

IV.1. 测定方法原理

一份已测定体积的矿质培养基(包含一种已知浓度的测定物质(10-40mg DOC 或 TOC/L)作为其唯一的微量有机碳源)以受控速度在黑暗中或散射光下通入无二氧化碳空气.在 28 天里,伴随着生成二氧化碳的测定(氢氧化钡或氢氧化钠吸收二氧化碳,再滴定剩余碱或测定无机碳),降解不断进行.试验物质产生二氧化碳的量(空白培养液试验修正)以 ThCO₂ 百分率表示。生物降解度也可用通过诱导期始末的辅助 DOC 分析计算获得。

IV.2. 测定方法描述

IV.2.1. 仪器

- 锥形瓶,2-5L,各配一根进气导管(伸入近容器底部)和一出气口
- 磁力搅拌器,若估计有难溶物质
- 气体吸收瓶
- 气流测控仪
- 除二氧化碳装置,用于制备无二氧化碳空气;或正确比例(20% O₂: 80% N₂)混合的无 CO₂ 氧气和氮气(钢瓶气)
- 二氧化碳测定装置,滴定测定或无机碳分析仪

(g) 膜过滤装置(可选择)

(h) DOC 分析仪(可选择)

IV.2.2. 矿质培养基的准备

储备液的制备,见 I.6.2.

将 10mL 溶液(a)用 800mL 水稀释,将 1mL 溶液(b)加入(d)中,用水稀释到 1L。

IV.2.3. 培养液的制备和预处理

培养液可能有多种来源:活化污泥;生活污水;地表水;土壤或以上来源的混合物。

见 I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2.和 I.6.5。

IV.2.4. 锥形瓶的准备

例如,以下的体积和质量对应于 5L 锥形瓶包含 3L 悬浮物的取值.如减少体积,相应修改取值.但应保证生成的二氧化碳能被准确测定。

每个 5L 锥形瓶加入 2400mL 矿质培养基.加入适量体积已准备的活性污泥(见 I.6.4.1.和 I.6.5.)得一悬浮液(最终 3L 接种后混合物浓度不超过 30mg/L);另外,也可以首先稀释准备好的污泥,在矿质培养基得到 500 - 1000mg/L 的悬浮液,然后在 5L 的锥形瓶中加入一份等分试剂获得 30mg/L 浓度。以此确保更高准确度。其它来源的培养液也能用到.(见 I.6.4.2.)。

整夜向培养液混合物中通入无二氧化碳空气以排净体系中二氧化碳。

在平行试验的锥形瓶中分别加入已知体积的试验物质和参比物质储备液,得到浓聚物(加入化学物质(10 到 20mgDOC 或 TOC/L)的作用);一些锥形瓶不加化学物质留作培养液对照。难溶试验物质以一定质量或体积的基体直接加入锥形瓶或按附录 III 处理。

如有要求,用一个锥形瓶通过加入与其它锥形瓶同浓度的试验物质和参比物质来检验试验物质可能的抑制作用。

如有需要,在一个消过毒的锥形瓶加入未注射疫苗的化学溶液,来检查测试的化学物质是否发生非生物降解(见 I.6.6.)。可以通过加入适当浓度的有毒物质来消毒。

另加前述无二氧化碳曝气过的矿质培养基将悬浮液体积补足 3L。可选择地,样品可以不用进行 DOC 分析或其他详细的分析。在锥形瓶出气口接气体吸收瓶。

如使用氢氧化钡,接三个吸收瓶,每个装有 100mL0.0125M 氢氧化钡溶液。与每个 5L 锥形瓶对应,溶液必须无硫酸盐和碳酸盐沉淀,浓度必须即用即标定。如使用氢氧化钠,连接两个吸收装置,第二个作为对照验证所有二氧化碳被第一个装置吸收。配有血清瓶罩

的吸收瓶较为合适.每个瓶中加入 200mL0.05M 氢氧化钠(足够吸收试验物质完全降解放出的全部二氧化碳)。氢氧化钠溶液即使是新鲜制备也会含有痕量碳酸盐；可通过扣除空白试验中碳酸盐得以修正。

IV.2.5. 典型试验中的锥形瓶数

锥形瓶 1 和 2: 测定悬浮液

锥形瓶 3 和 4: 空白培养液

锥形瓶 5: 过程控制

最好和当有必要时：

锥形瓶 6：非生物无菌对照

锥形瓶 7：毒性对照

亦可参阅 1.6.7.

IV.2.6. 试验

将无二氧化碳空气以 30-100mL/min 鼓入悬浮液,周期性取样(二氧化碳吸收剂)分析 CO₂ 含量。推荐前十天每两三天分析一次,然后每五天直到第 28 天以便确定 10 天的观察周期。第 28 天,提取样品(可选择)进行 DOC 和/或特殊分析,测定悬浮液 pH 值并在每个锥形瓶中加 1mL 浓盐酸,整夜通气以除净试验悬浮物中二氧化碳.第 29 天最后一次分析释放的二氧化碳。

每到二氧化碳测量日,拆开与锥形瓶最近的氢氧化钡吸收器,用 0.05MHCL 滴定碱溶液,酚酞作指示剂。将余下吸收器移近锥形瓶并在末端补接一个含 100mL 新鲜 0.0125M 氢氧化钡的新吸收器.需要时进行滴定,如第一个吸收装置中有可见沉淀,第二个瓶中没有明显沉淀,或者最少每周一次.或以 NaOH 为吸收剂,用注射器在与锥形瓶较近吸收器中吸取少量氢氧化钠溶液样品(取决于碳分析仪特性)。将样品注入碳分析仪的 IC 部分直接分析释放的二氧化碳。

只在试验末分析第二个气体吸收器以修正气体带出的二氧化碳。

IV.3. 实验数据和结果报告

IV.3.1. 数据处理

滴定分析给出被气体吸收装置吸收 CO₂ 的量：

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0.5 \times V \times C_A) \times 44$$

其中：

V = HCl 滴定 100 mL 吸收液所用体积(mL),

C_B = 氢氧化钡溶液浓度(M),

C_A = 氢氧化钠溶液浓度(M),

如 C_B 为 0.0125M, C_A 为 0.05M, 滴定 100mL 氢氧化钡用 50mL 滴定剂, CO_2 质量为 :

$$\frac{0.05}{2} \times \frac{2 \times 44 \times \text{mL HCl 已滴定}}{\text{HCl}} = 1.1 \times \text{mL}$$

因此,此情况下,滴定 HCL 体积与生成 $mgCO_2$ 换算因子为 1.1。

以滴定值分别计算仅培养液和培养液加试验化学物质产生的 CO_2 ,其差值为仅试验化学物质产生的 CO_2 。

例如,仅培养液消耗 48mL 滴定剂, 培养液加试验化学物质消耗 45mL ,

CO_2 培养液 = $1.1 \times (50-48) = 2.2 \text{ mg}$

CO_2 培养液加试验化学物质 = $1.1 \times (50-45) = 5.5 \text{ mg}$

因此试验物质产生的 CO_2 质量为 3.3mg。

生物降解百分率计算 :

$$\% \text{降解率} = (\text{mg}CO_2 \text{ 生成} \times 100) / (\text{Th}CO_2 \times \text{mg 加入试验物质})$$

或,

$$\% \text{降解率} = (\text{mg}CO_2 \text{ 生成的} \times 100) / (\text{mg TO 试验中加入} \times 3.67)$$

3.67 为碳到二氧化碳的换算因子(44/12)。

将直到某测量日的每个测量日 $ThCO_2$ 百分数相加可获得每个测量日的降解百分率。

对于氢氧化钠吸收器,计算产生的二氧化碳量,以 IC(mg)表示(吸收液中 IC 浓度乘以吸收液体积)。

计算降解百分数:

$$\%ThCO_2 = (\text{mgIC 锥形瓶} - \text{mgIC 空白} \times 100) / (\text{MG TOC 作为试验物质加入})$$

计算 DOC 减少(可选择)如 I.7 所述.将以上所有实验结果记录在提供的数据表上。

IV.3.2. 实验结果的准确性

试验初矿质培养基中试验悬浮液 IC 含量必须少于 TC 的 5%, 且试验未空白培养基 CO_2 总释放量正常情况下不应超过 40mg/L 培养基。若大于 70mg CO_2/L , 应缜密检查数据和

试验技术。

也见 I.5.2.

IV.3.3. 实验结果报告

见 I.8.

IV.4. .数据记录表

以下给出一张数据记录样表.

CO₂ 释放测定

1. 实验室

2. 试验开始日期

3. 试验物质

名称:

储备液浓度:mg 试验物质/L

培养基初始浓度: mg 试验物质/L

加入锥形瓶的总 C 量:mgC

ThCO₂:mgCO₂

4. 培养液

来源:

给定处理方法:

预处理(如有):

反应混合物中悬浮固体浓度:mg/L

时间 (天)	试验生成 CO ₂ (mg)		空白生成 CO ₂ (mg)		累积生成 CO ₂ (mg)(试验- 空白平均)		ThCO ₂ $\frac{\text{累积CO}_2 \times 100}{\text{ThCO}_2}$		
	1	平均	3	平均	1	2	1	2	平均
	2		4						
0									
n ₁									
n ₂									

n ₃									
28									

注意:参比物和毒性对照物可用相似的格式.

6. 碳分析(可选择)

碳分析器：

时间(天)	空白 mg/L	试验物质 mg/L
0	C _{b(0)}	C ₀
28 ^(*)	C _{b(t)}	C _t
(*)或诱导期		

$$\% \text{ DOC 减少} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

7. 非生物对照(可选择)

$$\% \text{ 非生物降解率} = \frac{28 \text{天后无菌烧瓶中生成的 CO}_2 \text{ (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

第 V 部分 测压呼吸计法试验

V.1. 测定方法原理

一份已测定体积的矿质培养基(包含一种已知浓度的测定物质(100 mg/L 试验物质, 至少 50-100 mg TOC/L)作为其唯一的微量有机碳源)在恒定温度(±1 或接近)下在一密闭锥形瓶中搅拌 28 天。耗氧量可通过维持呼吸测定器体积恒定的需氧量(电解制备)或仪器中体积或压力变化(或两者都变化)进行测定。释放的二氧化碳被氢氧化钾或其它合适的吸收剂吸收。试验物质吸收氧气的量(以平行试验的空白培养液吸收量修正)以 ThOD 或 COD 百分率表示。生物降解度也可用通过诱导期始末的辅助 DOC 分析计算获得。

V.2. 测定方法描述

V.2.1. 仪器

- (a) 合适的呼吸测定计
- (b) 温度控制,波动维持在 ± 1 以内
- (c) 膜过滤装置(可选择)
- (d) 碳分析仪(可选择)

V.2.2. 矿质培养基的准备

储备液的制备,见 I.6.2.

将 10mL 溶液(a)用 800mL 水稀释,将 1mL 溶液(b)加入(d)中,用水稀释到 1L。

V.2.3. 培养液的制备和预处理

培养液可能有多种来源:活化污泥;生活污水;地表水;土壤或以上来源的混合物。

见 I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2.和 I.6.5.

V.2.4. 锥形瓶的准备

用储备液在矿质培养基中分批制备试验物质和参比物质溶液,通常相当于 100mg 化学物质/L 的浓度(至少 50-100 mg TOC/L)。

根据铵盐组成计算 ThOD,如果预先存在硝化作用,应根据硝酸盐组成计算(见附件 II.2.)。

测定 pH 值,如有必要调至 7.4 ± 0.2 。

难溶物质应加入一大容器(见后面)。

如需测定试验物质毒性,在矿质培养基中再制备一份试验物和参比物溶液,试验物与参比物浓度都与其单独存在的溶液相同。

如要求测定氧的物理化学吸附,制备通常相当于 100mgThOD/L 的浓度的试验物溶液(已加入合适毒剂杀菌,见 I.6,6.)。

将必要体积的试验物和参比物溶液分别引入至少两个锥形瓶中。加入另一些锥形瓶矿质培养基,试验物和参比物混合液和无菌溶液(如有要求)。

如试验物难溶,以一定质量或体积的基体直接加入大容器或按附录 III 处理。加入氢氧化钾,碱石灰或其它 CO_2 吸收剂。

V.2.5. 典型试验中的锥形瓶数

锥形瓶 1 和 2: 测定悬浮液

锥形瓶 3 和 4: 空白培养液

锥形瓶 5: 过程控制

最好和当有必要时:

锥形瓶 6: 非生物无菌对照

锥形瓶 7: 毒性对照

可参阅 1.6.7.

V.2.6. 试验

使容器达到所需温度,加入适量体积已准备的活性污泥得一悬浮液(最终 3L 接种后混合物浓度不超过 30mg/L).搭装置,开始搅拌并检查气密性,开始测定氧吸收.通常除了记录必要读数 and 每天检查正确的温度和充分搅拌是否保持之外,无需更多关注。

根据规律性的频繁读数使用仪器制造商提供的方法计算氧吸收量。在诱导期末,通常 28 天,测定瓶中 pH 值,尤其当氧吸收较低或高于 ThODNH_4 (对于含氮化合物)。

如有要求,试验始末从呼吸计中吸取样品进行 DOC 或特殊化学分析(见附件 II.4)。试验初提取时,应确保剩余试验悬浮物体积可知。当氧被含氮试验物质吸收,在 28 天中测定亚硝酸盐和硝酸盐的增量,计算硝化作用的耗氧量修正(附件 V)。

V.3. 实验数据和结果报告

V.3.1. 数据处理

按试验物质使用量划分在试验物质给定时间内的吸氧量(mg)(相同时间后空白培养液对照修正).可得以 $\text{mg O}_2/\text{mg}$ 试验物表示的 BOD:

$$\text{BOD} = (\text{mg O}_2 \text{ 试验物吸收} - \text{mg O}_2 \text{ 空白吸收}) / (\text{mg 瓶中试验物}) = \text{mg O}_2/\text{mg 试验物}$$

从下式计算生物降解百分率：

$$\% \text{ 生物降解} = \% \text{ ThOD} = \text{BOD (mg O}_2/\text{mg 化学物质)} \times 100 / \text{ThOD (mg O}_2 \text{ 化学物质)}$$

或者从

$$\% \text{ COD} = \text{BOD (mg O}_2/\text{mg 化学物质)} \times 100 / \text{COD (mg O}_2 \text{ 化学物质)}$$

应注意两种方法不一定给出相同实验结果;前者较好。

对于含氮试验物,使用恰当的 $\text{ThOD}(\text{NH}_4 \text{ 或 } \text{NO}_3)$ 根据已知或预期硝化作应是否发生(附件 II.2)。如硝化发生但不完全,根据降解百分数计算硝化耗氧量修正(如 I.7.所述)。

将以上所有实验结果记录在所附数据表上。

IV.3.2. 实验结果的有效性

28 天中空白培养液吸氧量通常为 20-30 $\text{mg O}_2/\text{L}$ 且不应高于 60 mg/L 。如高于 60 mg/L 应缜密检查实验数据和实验技术,如 pH 值超出 6-8.5 的范围和试验物耗氧量低于 60%,应降低试验物浓度重复试验。

见 I.5.2

V.3.3 实验结果报告

见 I.8

V.4 数据记录

下面给出一份数据记录的例子：

用压力计进行的呼吸运动计量法测定：

1. 实验室

2. 测定的起始日期

3. 参照物

名称：

储存溶液的浓度：mg/L

起始时的浓度， C_0 : mg/L

测定用的烧瓶体积 V : mL

ThOD 和 COD : mg 氧气/mg 参照物 (NH_4 或 NO_3)

4. 接种体

来源：

进行的处理：

之前的条件：

在反应的混合物中悬浮物的浓度： mg/L

5.氧气的吸收：生物降解能力

		Zeit(Tage)											
		0		7		14			21			28	
O ₂ upt (mg)	1												
	2												
	a 平均数												
测定物													
	3												

O ₂ upt (mg)	4												
	b 平均数												
空白的													
适当的	a ₁ -b _m												
	a ₂ -b _m												
BOD(mg)													
测定物中的	$\frac{a_1 - b}{C_0 V}$												
	$\frac{a_2 - b}{C_0 V}$												
BOD 每 mg													
降解率 %	D ₁ (a ₁)												
	D ₂ (a ₂)												
	平均数*												
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$													
V=测定中烧瓶中的体积													

*D₁ 和 D₂ 如果相差较大需取平均值

注：在相关的化学药品与毒性对照组中也会用到类似的形式。

6. 对硝化作用的修正（详见附录 V）

	0	28	两者之差
(1) 硝酸盐的浓度 mg N/L			(N)
(2) 相当于氧气(4.57 x N x V)(mg)	—	—	
(3) 亚硝酸盐的浓度 mg N/L			(N)
(4) 相当于氧气(3.43 x N x V)(mg)	—	—	

(2)+(4)一共相当于氧气 (mg)	—	—	
---------------------	---	---	--

7.碳的分析 (随机的)

碳的分析者：

时间 (天)	空白 mg/L	测定物 mg/L
0	(C _{bLo})	(C _o)
28*	(C _{bLt})	(C _t)
*或者在潜伏期结束之后		

$$\%移动的DOC = \left(1 - \frac{C_t - C_{bit}}{C_o - C_{bio}}\right) \times 100$$

8.特效的化学药品 (随机的)

S_b= 在物理化学 (无菌) 的对照组下 28 天后的浓度

S_a= 在接种的烧瓶内放置 28 天后的浓度

$$\%降解 = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9.非生物的降解 (随机的)

a = 28 天里氧气在消过毒的的烧瓶里的消耗量 (mg),

$$\text{每 mg 测定物中氧气的消耗量} = \frac{ax100}{C_oV}$$

(详见 第 1 和第 3 部分)

$$\% \text{ 无菌降解} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times ThOD}$$

第 VI 部分 密闭瓶子的测定 (测定方法 C.4-E)

VI.1 测定方法的原理

测定的药品在无机物介质中的溶解度通常在 2-5mg/L, 潜伏在相关的污染物中的微生物内。

密闭的瓶子恒温放于暗处, 在超过 28 天的时间里降解将会随着溶解的氧气的分解而进行, 氧气被测定物吸收的量可以修正为平行进行的空白接种体的吸收量, 可以用 ThOSD 或者 COD 的百分比形式表示出来。

VI.2 测定方法描述

VI.2.1 实验仪器

- a) 带玻璃塞子的 BOD 瓶子, 250-300mL
- b) 水浴或无菌操作, 在避光下保证瓶子的恒温 (上下偏差超过 ± 1)
- c) 2-5L 的大瓶子用来准备做盛装 BOD 的瓶子
- d) 氧气电极, 计算器。或其他用来做温克勒滴定的试剂和仪器

VI.2.2 无机物质的准备

存储液的准备, 见 I.6.2

混合 1mL 溶液(a)到(b)中, 用水稀释到 1L。

VI.2.3 接受物的准备

接受物通常来源于实验测量单位收到的居于国内的污水的中级流出物。接受物也可选择地表水。通常是从每升介质的滤液中提取 0.05-5mL。实验可能需要测算出所给的流出物的最佳体积。(详见 I.6.4.2 和 I.6.5)

VI.2.4 烧瓶的准备

将无机物质强烈暴露于空气中至少 20 分钟。用来源于同一批的无机物介质进行一系列的测定。

一般地, 介质在使用前需再在测定的温度下放置 20 小时。决定溶解的氧气的浓度以达到对照组意图, 20 时浓度应该在 9 mg/L 左右。进行所有的运输和空气饱和介质气泡自由的填充物的操作, 如虹吸管的使用。

准备几组平行的 BOD 瓶子，用来决定同时进行的一系列实验的测定物和参照物。聚集足够多的瓶子，也包括接受物空白，至少允许进行在期望的完全相同的时间间隔下的消耗量的测定，例如，0，7，14，21，28 天。为确保能够识别 10 天的窗口，我们可能需要更多的瓶子。

将强烈暴露于空气中的无机物质添加到大瓶子中，使瓶子大概 1/3 满。然后添加足够多的测试物和参照物的存储液以液封大瓶子，这样最后化学物的浓度一般不会超过 10mg/L。不要再加什么化学药品，以给包含在一支比较远的大瓶子的介质留出空白。

为了确认接受物的活动是不受限制的，在 BOD 瓶子中的氧气溶解度不得低于 0.5mg/L。这样就可以把测定物的浓度限制在 2mg/L 左右。虽然，低降解化合物和那些低 ThOD(5-10mg/L)的化合物可以使用。在一些情况下，建议使用测定物不同浓度的两种溶液做一系列的平行测定。比如，2 和 5mg/L 的两种溶液。通常，以氨基盐的形式计算 ThOD，如果知道要发生亚硝酸化的话，以硝酸盐的形式计算 ThOD (ThOD_{no3}；详见附录 II.2)。如果发生了亚硝酸化，但不完全，通过分析决定亚硝酸盐和硝酸盐浓度的变化。(详见附录 V)。

如果要研究测定物的化学毒性(这种情况下，比如，发现一种先前的低降解性)，我们还需要一系列的瓶子。

准备一系列含有在空气中暴露过的无机物质的瓶子(大约 1/3 体积满)，加上最后浓度的测定物和参照物，差不多与那些在其他大瓶子里的相同。

防止大瓶子里的溶液沾上中级流出物(下降或大约 0.05mL 到 5mL/L)或其他象来源与河水这样的水。最后，用在空气中暴露过的无机物质补足体积，用一个插到瓶子底部的橡皮管完成溶液的混合。

VI.2.5 典型操作中烧瓶的数量

典型操作中，需要下面的一些瓶子：

- 至少 10 个含有测定物和接受物(测定悬浮液)
- 知道 10 个只含有接受物(接受物空白)
- 至少 10 个含有参考物和接受物(步骤对照组)
- 需要的时候，6 个含有测定物，参照物和接受物(毒性对照组)。为确保能够识别 10 天的窗口,大约需要 2 倍数量的瓶子。

VI.2.6 测定的进行

用低于瓶口 1/4 (不是瓶底) 高的橡胶管把每个准备好的溶液分配到各自一组的 BOD 瓶子中, 这样所有的 BOD 瓶子就都装满了, 逐渐地轻打以赶走气泡, 立即用温克勒滴定或电极方法分析在零时刻氧气的溶解量。瓶子内的成分可以保存到一会添加 $M_n(II)$, 硫酸盐, $NaOH$ (第 1 温克勒试剂) 进行分析。放置好已经盖好玻璃塞的瓶子氧化出现棕色的 $M_n(OH)_3$. 10-20 在黑暗中放置不超过 24 小时, 之后完成温克勒滴定剩余的步骤。塞住剩余的同样的实验的瓶子, 以保证不让空气进入瓶中。20 下放置在黑暗中。为了确定接种空白介质, 每一系列都一定随同一平行的系列, 至少超过 28 小时的时间间隔 (至少间隔 1 星期) 撤消一系列溶解氧的分析的瓶子。

每周的样品都估计一下在 14 天时移动的百分比。尽管每 3-4 天的取样应当在 10 天的窗口鉴别, 这可能会需要双倍的瓶子。

为了做测定物的成分测定, 因亚硝酸化而引起的氧气的吸收应当也计算在内。

于是, 使用氧电极用来测定溶解的氧气的浓度, 然后撤消从 BOD 瓶中取的样品用来进行硝酸盐和亚硝酸盐的分析。通过计算硝酸盐和亚硝酸盐的浓度的增加量, 可以计算出消耗的氧气量 (详见附录 V)。

VI.3 数据和实验结果报告

VI.3.1 数据处理

首先, 从测定物消耗的氧气 (mg/L) 中减去从接种物那来的空白, 以计算出每个时间段结束后的 BOD, 用测定物的浓度 (mg/L) 除以这个修正过的消耗量, 得到明确的 BOD 每毫克氧气/每毫克测定物。然后通过划分确定的 BOD, 确定的 ThOD (可通过附录 II.2 算得), 确定的 COD (通过分析, 见附录 II.3), 计算出降解的百分比。

$$BOD = (\text{测定物吸收的氧气量 mg} - \text{空白吸收的氧气量 mg}) / \text{烧瓶中测定物的量 mg} = \text{每毫克测定物所含的氧气量 mg} - \% \text{降解率} = BOD(\text{氧气 mg}/\text{测定物质量 mg} \times 100) / ThOD(\text{氧气 mg}/\text{测定物质量})$$

或者
$$\% \text{降解率} = BOD(\text{氧气 mg}/\text{测定物质量 mg} \times 100) / COD(\text{氧气 mg}/\text{测定物质量})$$

应当提出的是, 这两种测定方法不一定给出相同的价值, 前一测定方法显然更可取一些。使用通过硝化得到的适当的 ThOD(NH_4 或 NO_3) 可以测定参照物种所含有的氮 (详见附录 II.2), 如果硝化不完全的话, 通过硝酸盐和亚硝酸盐浓度的变化计算硝化中氧气的消耗量。

VI.3.2 实验结果报告的有效性

28 天以后，接受物空白氧气的消耗量应当不超过 1.5mg 溶解的氧气/L.数值要比实验研究的要高。测定瓶中残余的氧气的浓度在任何时候都不应低于 0.5mg/L。只有在测定方法能够测定达到如此的精确度的溶解的氧气时，这样低浓度的氧气才是有效的。

详见 I.5.2

VI.3.3 实验结果报告

详见 I.8

VI.4 数据记录

下面给出一份数据记录的例子：

密闭瓶子的测定：

1. 实验室
2. 测定的起始日期
3. 参考物

名称：

储存溶液的浓度：mg/L

起始时瓶子内的浓度：mg/L

ThOD 和 COD：mg 氧气/mg 参考物

4. 接种体

来源：

进行的处理：

之前的条件：

反应的混合物的浓度：mg/L

5. 测定

测定方法：温克勒滴定/电极

烧瓶的分析：

潜伏的时间（天）	DO (mg/L)		
	0	n ₁	n ₂

空白（不含 化学药品）	1	C_1				
	2	C_2				
平均数	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
测定物	1	a_1				
	2	a_2				
平均数	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

6.硝化作用的修正

潜伏的时间（天）	0	n_1	n_2	n_3
(1)硝酸盐的浓度 mg/L				
(2) 硝酸盐的浓度变化 mg/L	—			
(3) 相当于氧气量 mg/L	—			
(4) 亚硝酸盐的浓度 mg/L				
(5) 亚硝酸盐的浓度变化 mg/L	—			
(6) 相当于氧气量 mg/L	—			

(3) + (6) 相当于氧气量 mg/L	—			
-----------------------	---	--	--	--

7. 损耗量：%降解率

	n 天之后的消耗量 (mg/L)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
烧瓶 1 : (m _{t0} -m _{tx}) — (m _{b0} -m _{bx})				
烧瓶 2 : (m _{t0} -m _{tx}) — (m _{b0} -m _{bx})				
烧瓶 1 : $\%D_1 = \frac{[(m_{t_0} - m_{tx}) - (m_{b_0} - m_{bx})] \times 100}{\text{测试的浓度} \times \text{物质的 } ThOD}$				
烧瓶 2 : $\%D_2 = \frac{[(m_{t_0} - m_{tx}) - (m_{b_0} - m_{bx})] \times 100}{\text{测试的浓度} \times \text{物质的 } ThOD}$				
平均 : $\%D_2 = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

m_{t0}=零时刻时烧瓶中的测量值

m_{tx}=t 时刻时烧瓶中的测量值

m_{b0}=零时刻时空白的平均值

m_{t0}=t 时刻时空白的平均值

对表 6 中 (3) + (6) 的硝化作用应用同样的修正

8 . 空白消耗量

空白消耗氧气： $(m_{b0}-m_{b28})$ mg/L.这个消耗量对测定的有效性是很重要的，应该小于1.5mg/L.

第 VII 部分 .M.I.T.I.测定 (测定方法 C.4-F)

VII.1 测定方法的原理

氧气被搅动的含在无机物质中的测定物溶液或悬浮液所吸收，经特别地培养，不能适应的微生物体在密闭的、呼吸运动温度 25 ± 1 条件下，在暗处放置超过 28 天之后会自动进行测量。含有的二氧化碳用碱石灰吸收。生物的降解能力可以用氧气吸收量（修正空白吸收量）与理论吸收量的百分比（ThOD）来表示。初级降解的百分比也可以从补充的特殊物质在潜伏开始，

结束时用 DOC 分析来进行分析，计算。

VII.2 测定方法描述

VII.2.1 实验仪器

- (a) 自动电子 BOD 尺，或带 6 个瓶子的呼吸运动计，每个 300mL，并带有含二氧化碳吸收装置的瓶子
- (b) 恒温槽，或者水浴保持温度在 25 ± 1 以内。
- (c) 过滤膜（随意的）
- (d) 碳分析仪器（随意的）

VII.2.2 无机物质的准备

准备下列储存液，用分析纯的试剂和水。

- (a) 磷酸二氢钾， KH_2PO_4 8.50g
磷酸氢二钾， K_2HPO_4 21.75g
十二水磷酸氢二钠 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 44.60g
氯化铵 NH_4Cl 1.70g
用水溶解后稀释到 1 升。pH 值保持在 7.2
- (b) 七水硫酸镁 MgSO_4 22.50g
用水溶解后稀释到 1 升。
- (c) 氯化钙 CaCl_2 27.50g
用水溶解后稀释到 1 升。
- (d) 六水三氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25g
用水溶解后稀释到 1 升。

取 (a)(b)(c)(d) 各 3mL 用水稀释到 1L。

VII.2.3 接受体的准备

从不少于 10 个的地方采集新鲜的样品，主要在那些经常使用，排放化学药品的地方，如废水处理工作，工业废水处理，河流，湖泊，海洋，采集 11 份煤泥，表面水土壤，水等样品，混合在一起。在除去漂浮的物质而且允许维持不变之后，用氢氧化钠和磷酸将浮在表面的 pH 值调整到 7 ± 1 ，用合适体积的浮在表面溶液的滤液填充并刺激装煤泥的容器，把溶液暴露在空气中 23 1/2 个小时。30 分钟后，丢弃大概 1/3 体积的溶液，加入等体积的各含有 0.1% 的葡萄糖，脲，磷酸一氢钾的溶液到固定的材料中，并重新开始透气。

每天重复一次这个过程，煤泥一定要按依照作好练习操作，污水一定是洁净的，温度要保持在 25 ± 1 ，pH 值保持在 7 ± 1 ，煤泥沉淀得很好，在空气中充分的暴露。以保证混合物时刻都是需氧性的。准备好杀原生动动物药，煤泥的活动能力至少每 3 个月要和参照物对照一次。至少在完成 1 个月的操作后，才可以把煤泥拿来作接受体，但这个时间也不要长于 4 个月。之后，每 3 个月，样品来自至少 10 个非常规的地方。

为了保持新鲜和旧的煤泥有相同的活动能力，混合过滤浮在表面的有活力的煤泥的溶液。使用相同体积的新鲜采集的 10 种来源不同的样品混合物的浮在表面的滤液，如上所述将液体混合，在此单元结束 18-24 小时后，把煤泥拿来作接受体。

VII.2.4 烧瓶的准备

准备如下的 6 只烧瓶：

Nr. 1: 测定物用水稀释到 100mg/L

Nr. 2,3,4: 在无机物质中的测定物 100mg/L

Nr. 5: 在无机物质中参照物（如苯胺）100mg/L

Nr. 6: 只含无机物质

在重量和体积的基础上，直接加入溶解度很差的测定物，或按照附录 III 所写的进行操作，溶剂或乳化剂都不可以使用。在所有的烧瓶里填加二氧化碳吸收装置，调整烧瓶里的 pH 值，接近 2.3, 从 4 到 7.0。

VII.2.5 测定步骤

用少量体积的接种体接种到烧瓶 2, 3, 4 (测定悬浮液)，烧瓶 5 (活性对照组)，烧瓶 6 (接种体空白)，悬浮液的浓度在 30mg/L。不要往提供物生命对照组的烧瓶 1 里加接种体。组装好仪器，检查空气密闭性，打开搅拌器，在黑暗的条件下开始测量氧气的吸收量，每天检查温度，搅拌器，库仑氧气吸收记录器，记录下烧瓶中组分颜色的变化，用合适

的方法直接读取 6 个烧瓶的氧气吸收量，比如：从一个 6 点的图表记录，可以画出 BOD 曲线。在潜伏期结束时，通常是 28 天，测量烧瓶中组分的 pH 值，以算出残余的测定物和中间介质的浓度、溶解度，以及 DOC 的浓度（详见附录 II.4）。要小心化学物质的挥发，如果有硝化作用，尽可能测算出硝酸盐和亚硝酸盐的浓度。

VII.3 数据和实验报告

VII.3.1 数据处理

在一段给定的时间后，用测定物来划分吸收的氧气量，用使用的测定物的质量来修正在相同时间内被受体空白对照组的吸收量。可以用 mg 氧气/mg 测定物来表示 BOD 的量：

$$\text{BOD} = \frac{\text{测定物吸的氧气 mg} - \text{空白吸收的氧气 mg}}{\text{烧瓶里测定物的重量 mg}} \\ = \text{mg 氧气/mg 测定物}$$

降解百分比可以用下式计算：

$$\% \text{ 降解} = \% \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg 氧气/mg 测定物}) \times 100}{\text{ThOD}(\text{mg 氧气/mg 测定物})}$$

对于混合物，可以通过元素分析来求算 ThOD,和简单的化合物一样。无论硝化在进行或是已经完全，都可以使用合适的 ThOD(ThOD_{NH4} 或 ThOD_{NO3})。如果硝化作用正在进行，但不完全，通过硝酸盐和亚硝酸盐浓度的变化，对氧气的消耗量进行修正（详见附录 V）。从特别的（母体）化学药品的损耗量可以算出初级降解的百分比（详见 1.7.2）：

$$D_t = \frac{S_a - S_b}{S_b} \times 100\%$$

如果烧瓶 1 中的测定物在测量物理化学的移动时有损失，记录下来，通过 28 天之后烧瓶内测定物（S_b）的浓度计算出降解的百分比。

当 DOC 的测量已经作好（随意的）时候，用下式计算最终的降解率：

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\%$$

如 I.7.1 所述。如果烧瓶 1 中的 DOC 在测量物理化学的移动时有损失，用 DOC 的浓度计算出降解的百分比。

在所附的数据表格中记录下来所有的实验实验结果。

VII.3.2 实验结果的有效性

受体空白的氧气吸收量通常在 20-30mg/L，在 28 天内不要超过 60mg/L。如果超过

60mg/L，需要对数据和实验操作做严格的检查。如果 pH 值超过了 6-8.5 的范围，而且测定物消耗的氧气量少于 60%，测定必须换用低浓度的测定物溶液重做。

详见 I.5.2

如果 7 天之后通过氧气消耗量计算的降解百分比未达到 40%，14 天之后未达到 65%，测定可能是有问题的。

VII.3.3 实验结果报告

详见 I.8

VII.4 数据记录

下面给出一份数据记录的例子：

MITI (I) 的测定：

1. 实验室
2. 测定的起始日期
3. 参考物

名称：

储存溶液的浓度：mg/L

起始时的浓度， C_0 : mg/L

反应混合物的体积，V：mL

ThOD: mg 氧气/L

4. 接受体

煤泥样品：

- | | |
|----------|-----------|
| 1) | 2) |
| 3) | 4) |
| 5) | 6) |
| 7) | 8) |
| 9) | 10) |

综合的污水的适应环境后活性泥中的悬浮液的浓度 =mg/L

煤泥在最后的介质中的浓度 = mg/L

5. 氧气吸收：降解能力

使用的呼吸运动计格式：

		Zeit(Tage)				
		0	7	14	21	28
O ₂ 吸收 (mg)	1					
	2					
	a 平均数					
测定物						
O ₂ 吸收 (mg)	b					
空白						
O ₂ 吸收的 修正(mg)	a ₁ -b a ₂ -b a ₂ -b					
每 mg 测定 物 中的 BOD	$\frac{a-b}{C_0V}$	烧瓶 1				
		烧瓶 2				
		烧瓶 3				
降解率 %		1				
		2				
		3*				

$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		平均数*					
-------------------------------	--	------	--	--	--	--	--

注：类似的格式在参考物质中也可能会使用到。

*如果复制品间存在可观的差距不要取平均值

6. 碳分析（随意的）

碳分析者：

烧瓶	DOC				% 转化的 DOC	平均数
	测量值		修正值			
水+测定物	a				—	—
泥+测定物	b ₁		B _{1-c}			
泥+测定物	b ₂		B _{2-c}			
泥+测定物	b ₃		B _{3-c}			
空白对照组	c		—		—	—

7. 特别的化学分析数据

	测定结束后剩余测定物的统计	% 降解
有水的空白测定	S _b	
接受体介质	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{降解} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

分别计算烧瓶 a₁, a₂, a₃ 的% 降解

8. 备注

如果需要的话，要附上 BOD 的时间曲线。

附录

缩写词和定义

DO:溶解的氧气 (mg/L), 水样中溶解的氧气浓度。

BOD:生物化学需氧量 (g), 是微生物分解测定化合物时所消耗的氧气量,可以用 g 氧气吸收/ g 测定化合物来表示(详见测定方法 C.5)

COD:化学需氧量 (g), 是测定化合物在被热的酸性重铬酸盐的氧化过程中消耗的氧气量(详见测定方法 C.6)

DOC:溶解的有机碳,溶液中溶解的有机碳,可以通过 0.45 μ m 的滤膜过滤或在 40000m/s² 下离心 15 分钟取上层悬浮液得。

ThOD:理论上的需氧量,完全氧化化学物所需的氧气总量,可以通过化学分子式来计算(详见附录 II.2),用 mg 氧气消耗量/ mg 测定化合物来表示。

ThCO₂:理论上的 CO₂ 需求。可以在化合物完全分解时从已知的或测量的化合物的成分,计算出产生的 CO₂ 量。用 mg CO₂ 生成/ mg 测定化合物来表示。

TOC:样品有机碳的总量,溶液中和上层悬浮液的有机碳量的总和。

IC:无机碳。

TC: 总碳,样品中无机和有机碳的总和。

初级降解:

物质化学结构变化,可以通过生物的变化反映在物质特别的损失上。

最终降解(完全暴露在空气中):

降解完成的程度,反映在测定化合物完全被微生物分解成 CO₂、水、无机盐和新的由细胞构成的微生物。

可能的降解性:

是对经过某种特定的终极降解测定的化学物的分类,这些测定非常严格,要求化合物必须在暴露在空气中的水生环境下完全降解。

本质可生物降解的: inherentLy biodegradabLe

一种化学物质的分类,指的是在被确证过的生物降解测定中有可靠证据的生物降解过程(低级的或终级的)的物质。

可处理性：

指的是各种物质在生物废水处理中被除去的可行性，该处理必须不对处理过程的正常实行造成不利影响。通常来说，易于生物降解的混合物质容易处理，但并非所有本质可生物降解的物质是这样。无机过程也可能被采用。

时滞

指的是在一个消亡测定中，从反应物注入开始到降解百分比升至至少 10%的时间。时滞通常很容易变化，并且很难再现。

降解时间

指的是从时滞最后开始到降解最大值的 90%已经实现的时间。

10 天视窗 window

指的是从降解完成 10%起接下来的 10 天。

附录

合适的即时参数的计算和测定

根据选取方法的不同，需要选择特定的即时参数。下面的部分描述了这些值的推导过程。不同的测定方法中参数的作用分别加以描述。

1. 碳含量

碳含量是从已知的基本组分中计算得到或者由被测物质的基础分析得到。

2. 理论需氧量 (ThOD)

理论需氧量 (ThOD) 可以计算出来，只要已知基本组分或由基础分析得到。对于下面的化合物而言：



不考虑氮的氧化，

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} mg/mg$$

或者考虑氮的氧化

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} mg/mg$$

3. 化学需氧量 (COD)

化学需氧量 (COD) 可由测定方法 C.6 得到。

4. 溶解有机碳 (DOC)

溶解有机碳 (DOC) 定义为水中能通过 0.45 μ m 过滤器的任何化学物质或混合物形式存在的有机碳。

使用合适的膜滤器可以使测定容器中的样品在过滤装置中迅速被回收过滤，前 20mL 滤液（如使用小过滤器可以更少）被弃去。10-20mL 的体积，如果通过注射会更少（体积多少取决于碳分析器的要求）被保存下来供碳分析之用。DOC-浓度由有机碳分析器测得。该分析器能准确测出的碳浓度可以相当于或低于测定中所使用的原始 DOC 浓度的 10%。过滤出的样品如果不能在同一工作日被分析可以保存在电冰箱中，2-4 可以保存 48h，或者在-18 以下保存更长时间。

评述：

膜滤器通常用表面活性剂来浸渍以确保亲水性。这样过滤器就可以容纳几毫克可容有机碳，这些物质会干扰生物降解能力的测定。表面活性剂和其他可容有机化合物可以通过在去离子水中煮沸三次，每次一小时，从而可以从过滤器中出去。然后，过滤器可以在水中保存一个星期。如果每次使用一次性过滤柱，必须仔细检查确定柱内不能释放出可容有机碳。

根据膜滤器种类的不同，测定物质可以通过吸附来保存。因而有必要确定测定物质并非是在保存在过滤器中。

在 40000 m.sec（4000g）下离心过滤 15min 可以用来辨别 TOC 和 DOC，而不需要过滤。这个方法在初始浓度小于 10mgDOC/L 下不可行，因为要么不是所有的细菌被除去，要么碳作为细菌液的部分又发生溶解。

参考文献

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am.Pub.Hlth.Ass., Am.Wat.Poll.Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P65.
- Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol.46, 139.
- DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Sunnarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H).
- Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschu

Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

- Gerike , P. , The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere* , 1984 , vol 13 (L) , 169.

附录

难溶物质生物降解能力的评估

在难溶物质生物降解能力的测定中，以下方面必须特别予以注意。

因为均匀液体很少带来采样问题，所以人们建议用合适的方法均化固体物质以避免因非均运行带来失误。当有化学物质组成的混合物或含有大量杂质的物质只需要几毫克典型试样时，必须特别加以注意。

测定中各种形式的搅拌都可能要用到。必须注意只要使用适量的搅拌来保证化学物质分散开，避免过热，过量起泡，过大的切向力。

一种乳化剂要被用来将化学物质稳定的分散开。它不能对细菌有毒害作用，也不能被生物降解或者在实验条件下导致泡沫产生。

跟乳化剂一样，溶剂也有相同的选择标准。

固体载体没有被建议用来做固体测定物质，但可能适于单纯的物质。使用辅助物质如乳化剂，溶剂，载体时，应当制作一张表包含辅助物质信息。

三种呼吸计测定 CO₂，BOL，MITI 的任一种可以用来研究难溶化合物的生物降解能力。

参考文献

- DE Morsier , A. et al. , Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere , 1987 , vol.16 , 833.
- Gerike , p. , The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere , 1984 , vol.13 , 169.

附录

怀疑对菌种有毒的化学物质生物降解能力的评估

当一种化学物质可以接受测定，并且表现为不能生物降解时，如果要求抑制与惰性二者的区别，有人提出下面的过程（Reynolds et al., 1987）。

类似的或独特的菌种应当被用来进行毒性和生物降解能力测定。

为了评估出可以进行生物降解能力测定的化学物质的毒性，可以使用下面一种或多种方法，污泥呼吸速率抑制（活化污泥呼吸抑制测定-Dir 87/302/EEC），BOD 以及增长抑制测定方法。

如果毒性抑制可以避免，可以考虑在生物降解能力测定中使用的被测物浓度应当低于由毒性测定得到的 EC_{20} 值的 1/10（或低于 EC_{20} 值）。 EC_{20} 值大于 300mg/L 的化合物不会在生物降解能力测定中出现毒性效果。

EC_{20} 值如低于 20mg/L 会给接下来的测定带来严重问题。低测定浓度应当被使用，快速灵敏的密封瓶测定或 ^{14}C -标记材料的使用从而成为必须。较高被测物浓度在菌种适合的情况下也能被使用。然而，在后一种情况下，已知生物降解测定的特定标准则失去了意义。

参考文献

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

附录

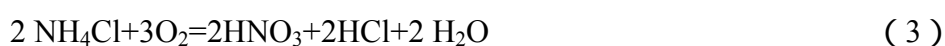
氮氧化对耗氧量干扰的纠正

不含 N 的被测物质在生物降解能力测定中耗氧量的评估中，即使试样与空白溶剂对比时发现介质中铵离子的氧化很不稳定，但氮氧化带来的误差很小（不大于 5%），可以不予考虑。然而，如被测物含 N 误差就会很大。

如果氮发生氧化但不完全，观测到的反应混合物耗氧量就要用氮氧化为亚硝酸和硝酸的耗氧量来纠正，如果亚硝酸和硝酸保温期间的浓度变化由下面几个方程式决定：



总反应：



方程(1)中，含氮 28g 的氯化铵(NH_4Cl)氧化为亚硝酸需氧 96g，即 3.43 的系数(96/28)。用相同的方法，方程(3)中，28g 氮氧化为硝酸耗氧 128g，即 4.57 的系数(128/28)。因为反应是连续的，由各种明确区分的菌种引发的，所以亚硝酸浓度可以上升或下降；后一种情况会产生浓度相等的硝酸。这样，硝酸形成过程中氧气的消耗为硝酸浓度的增加乘上 4.57。反之，参与形成亚硝酸的氧气为亚硝酸浓度的增加乘上 3.43 或者在浓度降低的情况下氧气的损失为浓度的降低乘上-3.43。

这就是说：

$$\text{硝酸生成耗氧量}=4.57 \times \text{硝酸浓度增加} \quad (4)$$

另

$$\text{亚硝酸生成耗氧量}=3.43 \times \text{亚硝酸浓度增加} \quad (5)$$

另

$$\text{亚硝酸消耗时耗氧量}=-3.43 \times \text{亚硝酸浓度降低} \quad (6)$$

综上

$$\text{氮氧化带来的耗氧量}=\pm 3.43 \times \text{亚硝酸浓度变化}+4.57 \times \text{硝酸浓度增加} \quad (7)$$

这样

$$\text{C 氧化带来的耗氧量}=\text{总耗氧量除去氮氧化的耗氧量} \quad (8)$$

或者，只要总的被氧化的 N 确定了，氮氧化的耗氧量可以做一级近似为 $4.57 \times$ 被氧化的 N 的增加。

C 氧化的耗氧量的修正值可以同 ThOD NH_3 比较，正如附录 中计算的。

C.5 生化降解需氧量

1. 测定方法

1.1 引言

该方法的目的是测量固体或液体有机物的生化需氧量 (BOD)。

这次测定中仔细确定的数据与水溶化合物有关，然而，至少在原则上，挥发性化合物和水溶能力差的化合物也可以被测定。

该方法只对测定浓度下对细菌无抑制作用的有机测定材料使用。如果测定浓度下被测材料不容，为了获得较好的分散效果就必须采取特殊措施，如超声扩散。

关于化学物质毒性的信息可能对低实验结果干扰以及测定浓度的选择有用

1.2 定义和单元

BOD 定义为指定体积的溶液中在指定条件下完成生化氧化的试样需要的溶解氧的质量。

实验结果表示为每克被测物的 BOD 克数。

1.3 参考物质

需要使用合适的参考物质来对照菌种的行为。

1.4 测定方法原理

预先确定一定量的物质，溶解或分散在充分通气的合适介质中，被注入微生物体内，在黑暗中一个固定的环境温度下培养。

BOD 只有测定开始和结束时溶解氧含量的区别来确定。测定时间至少 5 天，不能超过 28 天。

必须要做不含测定物质的平行测定作为空白对照。

1.5 定量标准

BOD 值的确定不能被视为物质生物降解能力的一个准确的确定，这项测定只能被认为是一项筛选测定。

1.6 测定方法描述

物质初步的溶解或分散被准备来获得一个与使用方法相符的 BOD 浓度。然后通过任何一种国家的或国际标准化测定手段得到 BOD 值。

2 实验数据和评估

按照选中的通常化的方法可以计算出包含在初步溶解种的 BOD 值，然后化为每克被测物的克数。

3 实验结果报告

测定方法应当总述一下

生化需氧量应当是至少三种正确测量的方法。

所有于实验结果解释有关的信息和实验结果报告都要被提出实验结果报告，尤其是与杂质，物理状态，毒性效果以及影响实验结果的物质固有组分有关的部分。

避免生物氧化的附加措施的使用也要在实验结果中报告。

4 参考文献

标准方法如下：

NF T 90-103：Determination of the biochemical oxygen demand

NBN 407：Biochemical oxygen demand

NEN 32355.4：Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The determination of biochemical oxygen demand , Methods for the examination of water and associated materials , HMSO , London。

ISO 5815：Determination of biochemical oxygen demand after n days。

C.6 化学降解需氧量

1. 测定方法

1.1 引言

该方法的目的是在固定实验条件下，在一种标准的任意选取的情形下，对固体或液体有机化合物化学需氧量（COD）的测量。

物质组分的信息将对测定的指导以及得到实验结果的解释有帮助（例如卤素盐，亚铁盐的有机化合物，有机氯化物）。

1.2 定义和单元

化学需氧量是一种测量物质被氧化能力的方法，表示为在固定实验条件下物质消耗氧化剂相当于氧气的量。

实验结果表示为每克被测物的 COD 克数。

1.3 参考物质

并非调查任何一种新物质时都要用到参考物质。他们时常被用来校准测定方法，并且可以比较不同方法做出的实验结果。

1.4 测定方法原理

与定量的物质溶解或分散在水中，在浓硫酸介质中使用硫酸银催化剂，用重铬酸钾氧化回流两小时。剩余重铬酸用标准硫酸亚铁铵来滴定。

考虑到含氯物质，加入硫酸汞（1）来减少氯化物干扰。

1.5 定量标准

由于测定有不确定性，COD 成为一种氧化能力指示剂，并且已经成为有机物测定的一种实用方法。

氯化物在测定中有干扰；无机还原剂或氧化剂也能影响 COD 测定。

一些环状化合物以及许多挥发性物质（例如低级脂肪酸）在测定中不能被完全氧化。

1.6 测定方法描述

测定物质初步溶解或分散为 250 到 600mg 每升用来测定 COD。

评述：

对于难溶的或无法分散的物质，要称量出相当于约 5mg COD 量的粉末或液体与水

(1) 使用完后，含汞盐的溶液必须经过处理来防止汞盐散布到环境中。

一起置于试验装置中。

化学需氧量 (COD) 通常用多种不同方法测量更有利, 尤其是对难溶物而言, 即, 在封闭体系中使用均压器 (H. KeLkenberg, 1975)。使用这种修正方法传统方法很难测定的化合物-例如乙酸-就可以被成功的量化。然而, 这种方法也会失败, 例如吡啶。如果重铬酸钾浓度按文献 (1) 中给出的, 升值 0.25N (0.0416M), 直接称 5-10mg 物质就很容易, 对于难溶于水的物质 COD 测定是必不可少的 (文献 (2))。

另外, COD 可以通过任何合适的国家或国际标准方法来测定。

2. 实验数据和评估

试验瓶中的 COD 可以通过有选择的标准化方法计算出来, 然后转化为每克被测物的 COD 克数。

3. 实验结果报告

实用的辅助方法应当被总述一下。

化学需氧量应当是至少三种测量的方法。所有与实验结果解释有关的信息和实验结果报告都要被提出实验结果报告, 尤其是与杂质, 物理状态以及影响实验结果的物质固有属性 (如果已知) 有关的部分。

为了尽可能减少氯化物干扰而使用的硫酸汞必须在实验结果中报告。

4. 参考文献

(1) Keikenberg, H., Z.von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol.8, 146。

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds.
Chemosphere, 1984, vol.13, 169。

标准方法如下:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15mg per Litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7 作为 pH 函数的非生物水解降解

1. 测定方法

该方法以 OECD Test GuideLine (1) 为基础。

1.1 引言

水解是非生物降解的一个重要反应。这个反应跟生物降解能力差的物质关系尤为重要；并且能影响物质在环境中的稳定性。

大多数水解反应是假一级反应，因而半衰期与浓度无关，通常可以由实验浓度下的实验结果向环境条件外推。

此外，文献(2)中举了几个例子显示，对几种化学物质从纯水和天然水得到的实验结果有令人满意的一致性。

测定前得到物质蒸汽压的初步信息是有用的。

该方法仅对水溶物质有用，杂质会影响实验结果。

化学物质的水解行为应当在环境中较常出现的 pH 值(4 到 9)下被测定。

1.2 定义和单位

水解指的是化学物质 RX 与水的反应，该反应可表示为基团 X 与 OH 的净交换：



RX 浓度减少的速率由下式表示：

$$\text{速率} = k[\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

因为水对化学物质来说是大大过量的，这类反应通常被描述为假一级反应，观测到的速率常数由下面的关系给出：

$$K_{\text{obs}} = k \times [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

该常数由一个 pH 值和一个温度确定，T，使用下面的表达式：

$$K_{\text{obs}} = \frac{2.303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

式中：

t = 时间

C₀ = 时间为 0 时物质浓度

C_t = 时间为 t 时物质浓度

2.303 = 自然对数和 10 为底对数的转化系数。

浓度用克每升或摩尔每升表示。

常数 k_{obs} 量纲为 (时间)⁻¹。

半衰期 $t_{1/2}$ 定义为被测物质浓度减少 50% 所需时间，即：

$$C_t = 1/2 C_0 \quad [5]$$

从表达式 (4) 和 (5) 可以导出：

$$t_{1/2} = 0.693 / k_{obs} \quad [6]$$

1.3 参考物质

并非调查任何一种新物质都要用到参考物质。他们时常被用来校正测定方法的实现情况并且可以比较不同方法做出的实验结果。

下面的物质被用来作为参考物质 (1)：

乙酰水杨酸 (阿司匹林)

硫代磷酸 O,O-二乙基 O-(6-甲基-2-(1-甲基乙基)4-嘧啶基)酯 (Dimpylate, Diazinon)

1.4 测定方法原理

低浓度时试样溶于水；pH 和温度加以控制。

任一种分析进程用来追踪试样浓度随时间的减少。

浓度求对数后对时间作图，如绘得一条直线，一级反应速率常数可以从斜率求出 (参看要点 2)。

当直接从一个特定温度求得速率常数不可行时，通常可以通过使用阿仑尼乌斯关系来评估该常数，因为它规定了温度跟速率常数的关系。从特定温度下得到的速率常数对数直线作为绝对温度 K 的函数，可以外推至不能直接得到的速率常数值。

1.5 定量标准

文献 (2) 中提出了 13 类组织结构的速率常数测法可以有很高的精确度

可重复性特别地取决于 pH 值和温度的调节，还可能受微生物存在的影响。在一些特别的情况下，还会受到溶解氧浓度影响。

1.6 测定方法描述

1.6.1 试剂

1.6.1.1 缓冲溶液

该测定在 pH 为 4.0, 7.0, 9.0 三个值下进行。

为了实现目标，必须准备反应物等级化学物质以及蒸馏过的去离子无菌水配成缓冲溶液，

附录中举出了一些缓冲体系的例子。

缓冲体系的使用会影响水解反应速率；如果有这样的迹象，必须有选择地使用缓冲体系。

文献（2）中建议使用硼酸或醋酸缓冲体系代替磷酸。

如果在测定温度下缓冲溶液的 PH 值未知，可以在所选温度下使用一个校正 pH 计，精确度为 ± 0.1 pH 单位。

1.6.1.2 测定溶液

被测物质应当被溶解在选择好的缓冲体系中，浓度不能超过 0.01M 或饱和浓度的一半中更低的一个。

在试样水溶性低时可以使用与水混溶的有机溶剂。

溶剂量应低于 1%，并且不能影响水解过程。

1.6.2 仪器

使用带塞玻璃瓶，但接缝处不能有油脂。

如果化学物质或缓冲体系是挥发性的，或者测定在高温下进行，应选用封闭管或含封闭隔膜的管子，液面上空不能暴露。

1.6.3 分析方法

必须采用特别的方法允许在测定溶液浓度下待测物的测定，该方法可以由几种合适的分析技术结合而成。

所使用的分析方法取决于物质的本性，还必须足够精确和灵敏以便探测到初始浓度 10% 的减少。

1.6.4 测定条件

测定必须在恒温控制的封闭装置内或者恒温浴装置在所选温度的 ± 0.5 以内进行，温度需要被保持并且 ± 0.1 也要能被检出。光干扰必须通过适当方法加以排除。

对于易氧化的物质，有必要除去溶解氧（例如在溶液准备前向其中鼓入氮气或氩气 5 分钟）。

1.6.5 测定步骤

1.6.5.1 初步测定

对所有试样来说，初步测定必须在 50 ± 0.5 下，在 pH 值为 4.0，7.0 和 9.0 时完成。必须做足量的测量以便能评估在 50 每个 pH 值下，半衰期（ $t_{1/2}$ ）是否低于 24 小时以及是否在五天后只有少于 10% 的水解发生。（在更具代表性的环境条件（25）下，可以评

估出这些值分别对应的半衰期低于一天或高于一年)。如果初步测定显示 50%或更多测定样品在 50 下, 24 小时内发生了水解或者五天后不到 10%样品发生水解对应于每个 pH 值 (4, 7, 9), 就没有必要进行进一步测定。

在其他情况下, 对于每个 pH 条件不能满足, 就执行测定 1。

1.6.5.2 测定 1

测定 1 在一个温度下进行; 最好是 50 ± 0.5 。并且, 如果可能的话, 使用无菌水, pH 值取那些在初测中显示有必要进一步测定的值。

在特定的 pH 值下, 要使用足够份数样品 (不少于 4 份) 以涵盖从 20-70%的水解程度, 从而测定假一级反应的行为。

对每个执行测定 1 的 pH 值, 要确定反应级数。

评估 25 时的反应速率常数。

能否从测定 1 中得出肯定结论, 即反应为假一级反应, 决定了怎样在实验条件下继续进行。

如果不能从测定 1 中得出肯定结论, 即反应为假一级反应, 就必须进一步执行测定 2 描述的过程。

如果可以从测定 1 中得出肯定结论, 即反应为假一级反应, 下一步执行测定 3 描述的过程。(或者, 在特殊情况下, 使用测定 1 的实验结果, 算出 50 的速率常数也许可以计算出 25 时的速率常数 (参看 3.2))。

1.6.5.3 测定 2

该测定在每个由测定 1 显示有必要的 pH 下被执行:

-或者在低于 40 的某个温度

-或者在高于 50 的两个相差至少 10 的温度

在测定 2 执行的每个 pH 值和温度下, 至少应选取六个被合适隔开的点以便水解度可以从 20%一直取到 70%。

对某一个 pH 值和温度, 测定要重复两次。当测定 2 在 50 以上的两个温度下执行时, 在其中较低温度下测定两次更好。

对测定 2 执行的每个 pH 和温度, 当有可能时需要给出半衰期 ($t_{1/2}$) 的图形评估。

1.6.5.4 测定 3

该测定在测定 1 显示有必要的 pH 下被执行:

-或者在低于 40 的某个温度

-或者在高于 50 的两个相差至少 10 的温度

对每个测定 3 执行的 pH 和温度，要选取 3 个数据点，第一点在时间 0 处，第二，第三点取在水解度大于 30%处；常数 k_{obs} 和 $t_{1/2}$ 应被计算出来。

2. 数据

对于假一级反应行为，测定中每个 PH 和温度下的 k_{obs} 值可以通过浓度求对数对时间作图得到，使用下式：

$$k_{obs} = -\text{斜率} \times 2.303$$

此外 $t_{1/2}$ 可以按照方程[6]计算得到。

适当的使用阿仑尼乌斯方程评估 25 下的 k 。

对于非假一级反应行为参看 3.1。

3. 实验结果报告

3.1 实验结果报告

如果有可能，测定结果报告将包含下面的的信息。

-试样的详细说明

-参比物得到的任何实验结果。

-所使用分析手段的原则和细节

-对每个测定：温度，pH 值，缓冲组分以及一张包含所有浓度-时间数据点的表格

-对于假一级反应， $t_{1/2}$ 的 k_{obs} 值和计算过程。

-对于非假一级反应，标出浓度求对数对时间作图实验结果

-所有对于实验结果处理有必要的信息和观察实验结果

3.2 实验结果处理

如果被测物同系物的活化能实验值已知，并且有理由假设被测物活化能是在同一数量级时，应当可以计算出可以接受的被测物速率常数（在 25 ）。

4. 参考文献

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C (2) 30 final.

附录：缓冲溶液

A. CLARK AND LUBS

下表所列出的pH值都已用Sorensen标准方程换算过了。实际的pH值比表中的要高0.04个单位。

成分	pH 值
0.1M 邻苯二甲酸氢钠+0.1M HCl (20 摄氏度)	
2.63 mL 0.1M HCl+ 50mL 邻苯二甲酸氢钠于 100 mL 水	3.8
0.1 M 邻苯二甲酸氢钠 + 0.1M NaOH (20 摄氏度)	
0.40 mL 0.1M NaOH + 50mL 邻苯二甲酸 于 100mL 水	4.0
3.70 mL 0.1M NaOH +50 mL 邻苯二甲酸 于 100 mL 水	4.2
0.1 M 磷酸二氢钾 +0.1M NaOH (20 摄氏度)	6.8
29.63 mL 0.1 M NaOH +50mL 磷酸于 100mL 水	7.0
0. 1M 硼酸于 0.1M KCl + 0.1M NaOH (20 摄氏度)	
16.30mL 0.1M NaOH+50mL 硼酸于 100mL 水	8.8
21.30mL 0.1M NaOH + 50mL 硼酸于 100mL 水	9.0
26.70mL 0.1M NaOH +50mL 硼酸于 100mL 水	9.2
B:KOLTHOFF AND VLEESHOUWER 成分 :	pH
0. 1M 柠檬酸一钾盐 +0.1 M NaOH (18 摄氏度)	
2.0 mL 0.1M NaOH +50 mL 柠檬酸 于 100mL 水	3.8
9.0 mL 0.1 M NaOH +50 mL 柠檬酸 于 100mL 水	4.0
16.3 mL 0.1 M NaOH + 50 mL 柠檬酸于 100mL 水	4.2

C : SORENSEN

0.05 M borax +0.1 M HCl

Composition		pH			
ml Borax	ml HCl	Sørensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Composition		pH			
ml Borax	ml NaOH	Sørensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12

C.8. 蚯蚓的毒性

人造土壤实验

1. 方法

1.1 引言

在这个实验中，测定物质被放到一种人造土壤中，蚯蚓已经在这个土壤中放置了 14 天。经过一段时期之后（一般是 7 天后）这种物质的对于蚯蚓的致命效果就基本验证了。这个实验提供了一种反映化学物质通过真皮和食物对蚯蚓短期影响的方法。

1.2 定义和单位

LC50: 在实验中，杀死 50% 的被测生物的被测定物质的浓度。

1.3 参考物质

参考物质一般是作为一种用于周期性确证测定系统的灵敏性没有明显改变的物质，推荐分析纯氯乙酰胺作为参考物质。

1.4 测定方法原理

土壤是可变的介质，因此一种详细说明的人工土壤是需要的。把成熟的赤子爱胜蚓放在选好的土壤中，并加不同浓度的测定物质溶液。从实验开始的 14 天后（也许 7 天后）整个容器的容量将浓缩成碟子的容量。并且蚯蚓在每个计算过的浓缩范围内都将继续存

活。

1.5 定量标准

这是一个被描述为尽可能再生的与测定物质和有机体有关的实验。实验结束时有机体的死亡率不能超过 10%，否则实验失败。

1.6 实验步骤

1.6.1 所需材料

1.6.1.1 测定培养基

一种有详细说明的人工土壤被用做基本测定培养基。

(A) 基本培养基 (下面是占培养基干重的百分数)

-10%石炭藓石炭块 (pH 值 5.5-6.0 之间包括一些不可见生物和精美土层。

-20%含有 50%以上高岭土的高岭黏土

-大约 69%工业用石英沙(50%以上的石英沙颗粒要在 0.05×0.2 mm 大小)如果石英沙不能完全溶解在水中, 每个测定容器中混合 10g 石英沙和测定物质。

-大约 1%化学纯碳酸钙, 研磨成粉, 用以调节溶液 pH 值至 5.5-6.5

(B) 测定培养基

测定培养基包括基本培养基, 测定培养基, 蒸馏水。

水的容量大约是基本培养基干重的 25%-42%。培养基中水的容量取决于 105 摄氏度培养基烘干恒重的质量。关键的标准是人造土壤必须干燥至没有固定水分。混合以获取培养基和测定培养基的分离过程是很值得注意的。由测定培养基制备培养基的过程必须记录下来。

(C) 调节培养基

调节培养基包括基本培养基和水。如果使用了添加剂, 则附加的调节培养基就必须包括相同数量的添加剂。

1.6.1.2 测定容器

容量一升的玻璃测定装入相当于 500g 干重的湿测定或调节培养基 (用带小孔的塑料盖或塑料碟盖上)

1.6.2 容器应该是一个有持续光照的保持温度在 18-22 度的气候性室。光照强度应该在 400 - 800 Lux。

实验时间是 14 天, 但有的时候死亡率在实验开始 7 天后就可以平定出来。

1.6.3 实验步骤

测定浓度

测定物质的浓度用每单位干重的基本培养基所含测定物质重量来表示。

范围找寻测定

在范围找寻测定中影响死亡率从 0%-100%的浓度范围取决与在最后的测定中浓度范围提供信息

测定物质应该用以下浓度溶液测定：1000，100，10，1，0.1 mg(测定物质)/mg(测定培养基)

如果最后的实验步骤已经确定了，那么每一批浓度中的每个浓度中放 10 只蚯蚓就足够做范围找寻测定了。

最后的测定

范围找寻测定结果用来选择至少 5 个浓度，这些浓度要求对生物的死亡率从 0%-100%成等比数列排列，并且他们应该有一个常量且不超过 1.8 的几何级数。

使用这一系列浓度的溶液测定 LC50 并且尽可能正确的评估它的可信任限度。

在最后的测定中至少有四批含有 10 只蚯蚓的测定浓度和四个调节培养基被使用。

这些浓度梯度溶液的测定结果也就被给予了背离理论情况的标准。

当两个比率为 1.8 的连续浓度给出的死亡率为 0%-100%，那么这两个浓度就足够显示出 LC50 应存在的范围了。

基本培养基和测定培养基的混合物

无论什么时候，测定培养基除了水以外不能加别的添加剂。就在实验刚开始的时候，把一种乳状液或是测定培养基的蒸馏水或其他溶剂溶液与基本培养基混合，也可以喷洒层离法或单纯的喷雾。

如果测定培养基不能溶解在水中，那么它就可以溶解在一种尽可能少体积合适的有机溶剂中（例如：正己烷，丙酮，氯仿）

溶剂完全挥发可能会引起测定培养基溶解，分散，或乳浊化。测定培养基在使用前一定会挥发的。挥发出的水的量必须补充上。对照物必须包括相同数量的添加剂。

如果测定培养基不溶解，分散或乳浊化于有机溶剂中，那么把 10g 石英砂与一定重量的测定物质的混合物与干重 490g 的测定培养基混合，制备干重 500g 的人工

土壤。

对于每个测定系列，要把相当于干重 500g 的湿的培养基放在一个玻璃容器中，并且迅速把 10 只在相似的潮湿的基本培养基中放置 24 小时的蚯蚓冲洗干净放在测定培养基的表面，剩下来的水放在过滤纸上。用带小孔的塑料盖盖好容器，防止培养基散失水分，然后在测定状态下保持 14 天实验要做 14 天（可能是 7 天）。培养基分布在玻璃或不锈钢的盘子上。蚯蚓就在这段时间被验证并决定了他们所能存活的数量。如果蚯蚓对一种温和的化学刺激物没有做出任何反映，那就认为他们已经死了。如果测定在 7 天内结束，那需要在容器中重新放入培养基，并且把原来的蚯蚓重新放在测定培养基的表面。

1.6.4 测定有机体

用于测定的有机体必须是成熟的 *Eisenia foetida* 蚯蚓，大约重 300-600mg（约两个月大）

2. 数据

2.1 实验数据和评估

记录：测定物质浓度以及相应的蚯蚓死亡百分比率

如果数据适当， LC_{50} 以及可信任范围（ $P=0.05$ ）应该决定于标准测定方法（Litchfield and Wilcoxon, 1949, for equivalent method）。 LC_{50} 的单位应该由每千克测定培养基（干重）中含测定物质的量来确定。

如果浓度梯度过大以至于不能计算 LC_{50} ，那么作图评估就显得很重要了。当两个比率为 1.8 的连续浓度给出的死亡率为 0%-100%，那么这两个浓度就足够显示出 LC_{50} 应存在的范围了。

3. 实验结果报告

3.1 实验结果报告

实验结果报告应尽可能包含以下内容

- 声明本测定与以上的测定标准相一致，
- 执行实验（范围找寻实验或最后的测定）
- 确切描述测定物质是怎样与基本测定培养基混合的
- 测定有机体的特征（种类，年龄，重量范围，养殖条件，供应厂商）
- 有关 LC_{50} 取决条件的测定方法
- 实验实验结果包括所有使用过的数据

——描述观察到的测定生物体在行为上的改变或征兆

——对照物的死亡率

——实验开始后 14 天，LC50 或 100%死亡率的最高浓度，以及 0%死亡率的最低浓度

——绘制浓度/灵敏度曲线

——包括参照物的实验结果，无论是现在实验的，或是以前品质控制活动中的

4 参考文献：

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.
- 2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, 331 pp.
- 3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de La Recherche Agronomique, 671 pp.
- 4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. PHarm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.
- 5) Commission of the European Communities, DeveLopment of a standardized Laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.
- 6) UmweLtbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, VerfahrensvorschLag "Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden', in: RudolpH/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

附录

实验之前蚯蚓的养殖

30-50 只成熟的蚯蚓应放到存有新鲜培养基的养殖箱中，14 天之后在取出，这些蚯蚓也许用于进一步的养殖。刚从茧孵化的蚯蚓等成熟后用于测定。（在指定的条件下 14 天）

养殖条件

气候条件：18-22 摄氏度，持续光照（强度：400-800 Lux）

孵化箱：合适的 10 到 20 升的浅容器

培养基：赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 可以在各种动物的排泄物中孵化。这就要求我们使用 50%石炭块，50%牛或马排泄物的混合物来作为孵化介质。这种介质的 PH 应该在 6-7 之间（一般包括碳酸钙）并且只有较低的离子传导性（小于 6 欧姆或 0.5%盐浓度）培养基必须是湿的，但不能太湿了

以上方法不是唯一的，希望您可以想出更好的方法

信息：赤子爱胜蚓包括两个种类，有些生物分类学者把他们分为两种生物。他们很相似，*Eisenia foetida foetida* 具有代表性的横断条，或是节状连接体。*Eisenia foetida andrei* 缺少以上特征但它有斑杂的红色。如果实验条件可以的话，*Eisenia foetida andrei* 可以使用，那么其他种类的就可以使用。

C.9.生物降解

ZAHN-WELLENS 实验

1. 测定方法

1.1 引言

实验目的是为了评估在静态实验条件下水溶液和无挥发性有机物质暴露在高浓度微生物环境中可能的生物终极降解能力。

对悬浮颗粒的物化吸附会发生，并且阐述实验结果时，它的影响也必须计算在内。

被研究物质与浓度相关联的量为，溶解的有机碳在 50-400mg/L 范围内或者需要的氧量为 100-1000mg/L 范围内。这些高浓度具有分析可靠性高的特点。研究物质与有毒物质结合将延缓或抑制降解过程。

在这种测定方法中，需要氧(COD)或溶解有机碳(DOC)的浓度的测量将用来评估测定物质最终生物降解能力。

实验同时，使用一种精确的分析方法会得出对研究物质（母级化学结构的消失）初级降解能力的评估

这种方法仅对符合以下条件的有机测定物质有效：

- 在实验指定的浓度范围之内
- 在实验条件下可溶于水
- 具有可以忽略的蒸汽压

- 对细菌没有抑制作用
- 只有在限制的范围之内可以被实验系统所吸附
- 不能使测定溶液形成泡沫逸出

关于测定材料主要组成部分相关比率的信息在阐明所得到实验结果时是很有用的，尤其在实验结果不太令人满意的情况下更是这样。

有关测定物质对微生物的毒性的信息对低实验结果的阐述以及合适的测定浓度的选择是很必要的。

1.2 定义和单位

在实验结束所得到的降解的数量应作为在 the Zahn-Wellens 实验中的降解能力记录下来，其中：

DT = 在时间 T 的降解百分比

CA = 实验开始三小时后在测定混合溶液中 DOC(or COD)测量实验结果。

CT = 取样时在测定混合液中 DOC(or COD)的测量结果

CBA = 实验开始三小时后空白处的 DOC(or COD)测量实验结果

降解范围围绕在满百分比附近

降解百分比以实验物质的 DOC(or COD)移动百分比为开端

实验开始三小时后的测量实验结果和初始测量实验结果的差别对于测定物质消失可以提供很好的指示。

1.3 参考物质

在一些情况下，忽略一些新的物质，参照物将变的很有用处，虽然现在还没有特别的参照物为人们所推荐。

1.4 测定方法原理

活性泥土，矿物营养素，测定材料各做为单一的碳资源与水溶液在通风的一至四升的玻璃容器中混合。把混合溶液放在黑暗的或只有散射光的屋子里，通风，并保持温度为 20-25 摄氏度 28 天。降解过程由每天或其他合适的时间间隔的过滤溶液 DOC(or COD)的测量值来监控。每个时间间隔后降解百分率或降解范围的测量值由实验开始三小时后 DOC(or COD)消失的比率来表达。实验结果绘制成时间对降解程度的曲线。

如果使用了一种精确的测量方式，归于生物降解程度的母体分子浓度的改变就可以测量

了（初级生物降解）

1.5 定量标准

这个实验的再现性已经在环状实验中得到证实

这种测定方法的灵敏度在很大程度上取决于空白处的多样性，在一些小的范围内也取决于溶解有机碳的测定灵敏度和溶液中化合物的测定水平。

1.6 实验过程描述

1.6.1 实验准备

1.6.1.1 反应试剂

测定用水条件：有机碳含量小于5mg/L的食用水。钙镁离子的总浓度不超过2.7mM/L；否则适当的稀释补加蒸馏水或其他稀释物是很必要的。

硫酸：分析纯

氢氧化钠溶液：分析纯

矿物质营养溶液：溶解于一升蒸馏水中。

氯化铵：分析纯

二水合磷酸二氢钠：分析纯

磷酸二氢钾：分析纯

混合物既作为营养溶液又作为缓冲溶液

1.6.1.2 实验仪器

一至四升的玻璃容器（例如：圆柱型容器）

用合适的玻璃或金属棒搅拌。（金属棒应在离容器底部5-10厘米处搅拌）也可以用7-10厘米带磁性的金属棒替代。

用内径为2-4毫米的玻璃管子通空气。管子的开端应该离容器底部大约一厘米

离心分离机（3550转）

pH计

溶氧测量仪

过滤纸

过滤薄膜设备

过滤薄膜，有0.45微米的孔隙。如果过滤薄膜既不能让碳通过也不能吸收过滤的物质，那么这种薄膜才是合适的。

测量有机碳含量和氧量的仪器

1.6.1.3 接种体的预备

用离心法或用以上准备的水冲洗从经过生物处理得到生物中得到的活性土壤

活性土壤必须放在一个合适的环境中。从用适当的工作废水处理过的生物处得来的土壤是可以使用的。为了得到尽可能多的不同种类的细菌，应该把不同来源的接种体混合。

（例如：经过不同处理的生物，土壤，河水等）。混合物就按以上描述的处理方式进行处理。

为了检查活性土壤的活性请看以下的“Functional control”

1.6.1.4 测定溶液的准备

向测定容器中加入500 mL 测定用水，2.5 mL/L 矿物质营养溶液和活性土壤形成混合物，再向混合物中相应的加入0.2-1.0g/L干物质。加足够的测定物质溶液使得混合物质的DOC浓度在50-400 mg/L之间。相关的COD浓度在100-1000mg/L之间。用测定用水总共配制1-4升溶液，总体积由测定DOC或COD所需样品数量所决定，并且这个体积对以后的分析过程是很重要的。

一般来说，两升的体积是合适的。至少测量容器的体积应和每一个系列相平行。在其中放入活性土壤和矿物质营养溶液，再加入相同体积的水。

1.6.2 实验步骤

20-25 摄氏度在黑暗或散射光照下，用磁棒或螺旋桨在测量容器中搅拌。如果需要的话，用被棉絮过滤器或洗瓶清洁过的压缩空气通气。但必须确保土壤没有下陷，并且氧气的浓度不小于 2 mg/ L。

如果需要，每天都必须检查 PH 值，确保 PH 值在 7-8 之间。

每次取样之前都必须要用蒸馏水补充上蒸发的损失，至需要的量。测定前在容器上标上液体应该到的体积是个很不错的方法。在每次取样之前都应该做上新的标记。第一个样品需要三个小时为了探测出活性土壤对测定材料的吸附性。

实验材料的减少是由每天或其他规则时间间隔 DOC 或 COD 的测量来监控的。从测定容器和空白处得到的样本通过一个仔细清洗干净的过滤纸过滤。最先过滤的 5 毫升溶液应该丢弃。难于过滤的土壤应该离心 10 分钟来祛除。DOC 和 COD 测量至少应该是原来的两倍。这个实验将持续 28 天。

注意：仍浑浊的样品用过滤薄膜来过滤。过滤薄膜必须不能吸附或释放任何有机物。

活性土壤的功能测定：

为了检验活性土壤的功能，应该用一个包含已知物质的容器和每一系列做平行实验，二甘醇被认为是做这个实验很好的材料。

适应：

如果每过一定时间（一天）做一次分析。那么适应就可以由降解曲线描绘得到。因此测定就不需要在周末之前马上开始了。

如果适应发生在最后阶段，那么测定应该延长直到降解结束。

注意：如果需要得到适应土壤行为的广泛知识，那么相同的活性土壤应该再一次以以下步骤暴露于测定材料中。

转换通风装置，并且允许活性土壤固定下来。清除表面液体，再用两升测定用水填充，搅动 15 分钟，再次允许固定。再一次清除表面液体后，用剩下来的土壤及和 1.6.1.4 和 1.6.2 相同的材料重复实验。活性土壤也可以用离心法代替沉降法分离。

合适的土壤可以和新鲜的土壤混合成一定浓度干重为 0.2-1 g/Litre 的溶液。

分析方法：

一般的，样品要通过仔细清洗的过滤纸过滤。（用蒸馏水清洗）

仍然浑浊的样本用过滤薄膜过滤。

DOC 浓度是用 TOC 仪器双份测量样品滤出液得到。如果滤出液当天不能测量，那么必须在冰箱中储存到第二天再测量。而且不允许长期储存。

COD 浓度的测量和 DOC 浓度的测量方法相同。

2. 实验数据和评估

DOC 和 COD 浓度应该用 1.6.2 的方法双倍测量。T 时刻的降解程度应根据 1.2 所给的公式计算。

降解的范围在最大的百分数左右，实验最后得到的降解数量记作“Zahn-Wellens 实验的生物降解能力”。

注意：如果在实验时间结束前已得到完整的降解过程，并且实验实验结果由第二天的第二次分析所证实，那么实验完成。

3. 实验结果报告

3.1 实验结果报告

如果可能，实验结果报告应宝库以下内容：

- 物质的最初浓度
- 测定物质，如果用了参照物和空白，他们的测定结果以及其他信息。
- 三小时后的浓度
- 生物降解曲线
- 取样的时间地点，适应状况，使用浓度。
- 实验过程改变的科学原因

3.2 实验结果说明

DOC 或 COD 一天天地减少说明测定物质正在进行生物降解。然而，在一些情况下，物理化学吸附可以发挥一定作用，并且表明 DOC 或 COD 完全或部分减少的时间，在开始的三个小时里，在意想不到的低程度中，控制和测量表面液体的不同仍然存在。

如果生物降解和吸附之间的差别很明显，那么进一步的实验是很必要的了。这可以有很多方法来完成，但最好的方法是用表面液体或土壤做为实验的接种体（透气性测定实验）在实验中给出很高的，没有吸附损失的 DOC(COD)值的测定物质应该被认为具有潜在的生物降解能力。部分的，没有吸附损失的 DOC(COD)表明化学药品受生物降解影响。很低或没有 DOC(COD)减少可以归于由实验物质引起的微生物的抑制作用，并且这可以由土壤的消散，浑浊的表面液体而显露出来。这个实验还应该用更低一点浓度的测定物质重复进行。

使用更高精确度的分析方法或由 ^{14}C 标记的测定物质可以得到更高的灵敏度。在用 ^{14}C 的情况下， $^{14}\text{CO}_2$ 的恢复可以确定发生了生物降解过程。

如果实验结果在初级生物降解过程中已经给出，那么，如果可能，给出化学药品结构改变导致的母系测定物质的反应丢失的解释。

分析方法的确认必须与空白测定过程中发现的反应相一致。

4. 参考文献

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, Official Journal of the European Communities, No 1 251, 19.9.1984.

附录：实验结果评估示例：

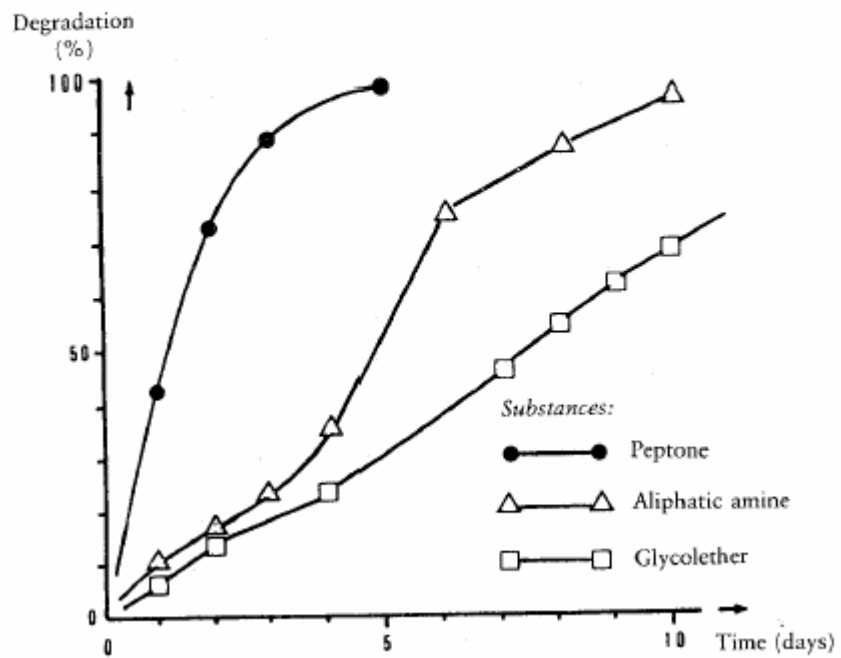
有机化合物	4-乙氧基苯甲酸
理论测定浓度	600mg/L
理论 DOC	390mg/L
接种物	脏水处理植物
浓度	每升一克干测定材料
适应状态	不适应
分析	DOC-测定
样品取量	3 mL
参照物质	
化合物的毒性	浓度小于 1000mg/L 无毒性

测定时间	参照物			降解程度 %	测定物		
	空白 DOCmL /L	DOC mL/g	DOC net mg/L		DOC mg/L	质 DOC net mg/L	降解程 度 %
0	-	-	300.0	-	-	390.0	-
3hour	4.0	298.0	294.0	2	371.6	367.6	6
1day	6.1	294.0	282.2	6	373.3	367.2	6
2day	5.0	281.2	276.2	8	360.0	355.0	9
5day	6.3	270.5	264.2	12	193.8	187.5	52
6day	7.4	253.3	245.9	18	143.9	136.5	65
7day	11.3	212.5	201.2	33	104.5	93.2	76
8day	7.8	142.5	134.7	55	58.9	51.1	87
9day	7.0	35.0	28.0	91	18.1	11.1	97

10day	18.0	37.0	19.0	94	20.0	2.0	99
-------	------	------	------	----	------	-----	----

Figure 1

Examples of biodegradation curves



Examples of biodegradation 生物降解示例

Degradation 降解

Substance 物质

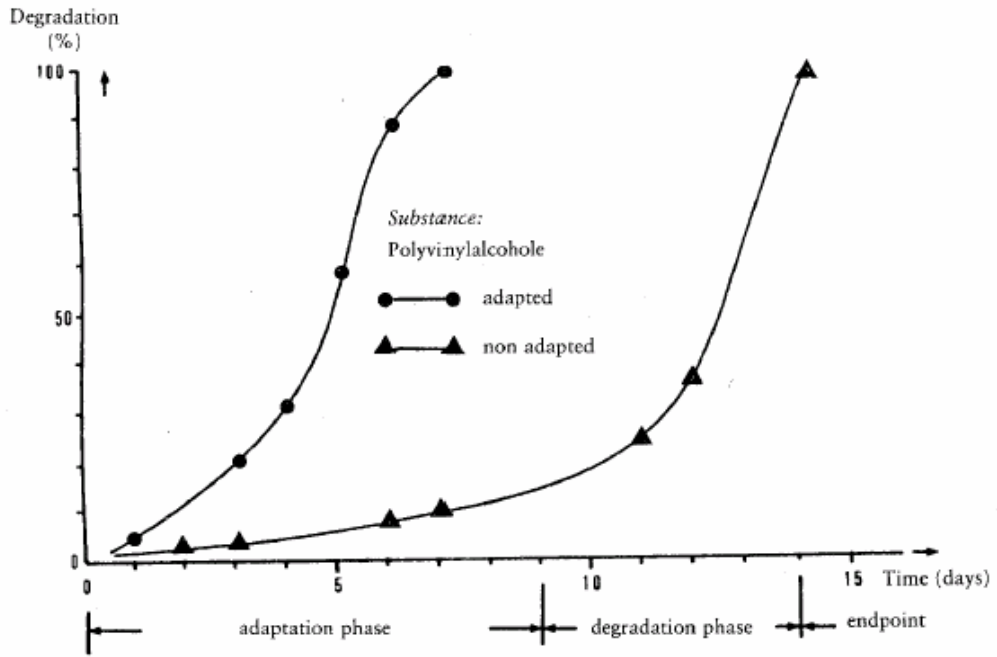
Peptone 胨

Aliphatic amine 脂肪胺

Glycolether 乙二醇醚

Time 时间

Figure 2
Examples of sludge adaptation



Examples of sludge adaptation 土壤适应性示例

Degradation 降解

Substance 物质

Polyvinylalcohol 聚乙烯醇

Adapted 适应

Non adapted 不适应

Adaptation phase 适应段

Degradation phase 降解段

Endpoint 终点

C.10. 生物降解

活性土壤仿真实验

1. 测定方法

1.1 引言

1.1.1 一般性叙述

本方法适用于在实验浓度范围内，符合以下条件的有机物质：

- 在水中的溶解度可以达到测定溶液浓度准备步骤中所必须的范围要求。
- 在实验条件下具有可忽略的蒸汽压
- 对细菌没有抑制作用

关于测定材料主要组成部分相关比率的信息在阐明所得到实验结果时是很有用的，尤其在实验结果不太令人满意的情况下更是这样。

有关测定物质对微生物的毒性的信息对低实验实验结果的阐述以及合适的测定浓度的选择是很必要的

1.1.2 最终生物降解能力的测定（DOC 或 COD 分析）

这种实验方法的目的是通过测定在 DOC 浓度大于 12mg/L 时,在 20mg/L 时比较适合，活性土壤样本的任意一种代谢物或测定物质的减少来测定最终生物降解能力。

测定材料的有机碳容量必须已经确定。

1.1.3 最初降解能力的测定

这种测量方法的目的是测定活性土壤植物样本中物质的初级生物降解能力，浓度大约在 20mg/L，并使用一种精确的测量方法（如果分析方法和毒性考虑允许，浓度范围可以适当放宽）。这允许对物质初级生物降解进行评估（不包括母体的化学结构）。这个实验方法的目的是不是对实验物质矿化的测量。

对测定物质而言，一种适当的分析方法必须是可行的。

1.2. 定义和单位

1.2.1 DOC/COD 分析

物质的降解程度由下式给出：

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\%$$

式中：

DR : 给出的平均保留时间内相对于试样的每 DOC/COD 中的降解程度。

T : 流入液中试样浓度, (以 mg DOC/L 或 mg COD/L 表示)

E : 测定单元流出液中 DOC(或 COD 浓度), 以 mg DOC/L 或 mg COD/L 表示

E_0 : 空白单元中流出液中的 DOC(或 COD 浓度), 以 mg DOC/L 或 mg COD/L 表示
在给定的保留时间内相对于试样降解, 以百分 DOC(或 COD)减少表示。

1.2.2 专门分析

在该给定的平均保留时间内被测物从水相(R_w)中的消除百分比

$$R_w = \frac{C_I - C_0}{C_I} \times 100\% \quad [1(b)]$$

式中:

C_I : 在流入测量单元中物质的浓度 (mg 物质/升, 由具体的分析决定)

C_0 : 在流出测量单元中物质的浓度 (mg 物质/升, 由具体的分析决定)

1.3. 参考物质

当研究一种新物质时, 参考物质也许是有用的; 然而, 这需视具体的参考物质而定。

1.4. 测定方法原理

对最终生物降解能力的测定, 在两个活化的沉淀引导单元 (OECD 试验指南单元或多孔瓶单元) 被平行运行, 试样被添加到单元的流入单元 (综合的或是家庭的污水), 而其他的只接受污水。在流入流出中用专门的方法对最初生物降解的分析中, 只有一个单元是有效的。

流出中的 DOC(或 COD)浓度是被测量的, 或者物质浓度由专门分析方法测定。

决定于试样的 DOC 不是被测量, 而是被简单陈述。

当 DOC(或 COD)测定进行时, 最开始的分子的浓度改变是能被测量的 (最初生物降解)。这些单元必须以双单元模式运行。

1.5. 定量标准

物质开始浓度决定于使用的分析类型和它的局限性。

1.6 测定方法描述

1.6.1 准备

1.6.1.1. 实验仪器

除非使用特殊的分析，需要一对同类的单元。使用两种设备：

OECD 试验指南测定：

仪器（附录 1）包含用于综合污水的储存管（A），抽水泵（B），通风管（C），分离器（D），空气筒（E），用于循环已活化的沉淀和管道（F）用于收集已处理的流出液。

管道 A 和 F 必须是玻璃或是合适的塑料，并且能容纳至少 24 升。泵 B 必须向通风管持续提供连续的综合性污水。在正常的操作中，分离器 D 的高度应该固定以使通风管中的体积为 3 升混和液。一个烧制的充气球（G）被悬挂在管（C）圆锥的末端，通过流量表监控充气装置鼓入的空氣的量。

空气筒 E 被放置以使来自分离器的活化的沉淀被连续的循环到通风管 C

“多孔瓶”

多孔瓶由可渗的多聚乙烯板（2mm 厚，最大孔径 95 μm ）制成。他们被做成锥底为 45° ，直径为 14 cm 的园柱体。多孔瓶被包含在不透水的管道中，其直径为 15cm，在圆柱体部分高度为 17.2cm 处有一出口，这一出口决定了壶内 3 升的体积。内管顶部有一硬的由合适塑料制成的支持环，可使内外管间有 0.5cm 的流出空间。

多孔瓶可被置于温度可控的水浴的底部。空气被充入有合适的扩散器的内管底部。

管 A 和 E 必须是玻璃制的或是合适的塑料材料，且至少可容 24 升。泵 B 必须向通风管提供持续的综合性污水流。提供这种要求的进入流和浓度的任何系统皆可使用。

空闲的内多孔瓶用于代替任何在使用中被堵塞者，被堵塞的多孔瓶应用次氯酸盐溶液 24 小时浸泡以疏通，并继以大量的自来水冲洗。

1.6.1.2. 过滤

孔径为 45 μm 的膜滤设备和膜滤器。在过滤过程中既不释放碳也不吸收物质的膜滤器是合适的。

1.6.1.3 污水

可使用适当的综合型供给或生活污水。

综合型供给污水水样

每升水中的溶解物：

消化蛋白质：160 mg

肉汁：10 mg

尿素：	30 mg
NaCl:	7 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	2 mg
K ₂ HPO ₄ :	28 mg

生活污水：

每日应从排放的主要生活污水处理厂的主要贮存水罐中收集。

1.6.1.4 测定物质的储备液

试样溶液的浓度，例如 1%，应在添加到测定单元中之前而准备好。这种物质的浓度应是确定的，以便于加入合适体积的溶液到污水中或者通过第二个泵直接加入，从而得到规定浓度的被测液。

1.6.1.5 细菌培养液

注意：当使用生活污水时，可能没有必要使用低浓度细菌培养液，但应使用活化的沉淀。可使用一种培养液。

给出三个合适的培养液的例子：

(a) 来自次级流入液的细菌

这种培养液应从来自处理主要生活污水的处理站的高质量的流液中获得，流出液在取样和使用的空隙中应保持在有氧条件下。为准备培养液，试样应从粗糙的过滤器中过滤出，抛弃开始的 200mL。滤出液应保持在有氧条件下直至使用。培养液应在收集的当天使用。至少 3mL 用于培养。

(b) 复合培养液

来自次级流入液的细菌

见以上的描述。

来自土壤的菌种：

100g 花园土（肥沃的，而非贫瘠的）置于 1000mL 不含氯的饮用水中。（含极大量陶瓷碎片，沙或者腐殖质的土壤不适合）搅拌后，悬浊液静置 30min。表层用粗糙的滤纸过滤，抛弃前 200mL。滤液立即置于空气中直至使用。培养液必须在当天使用。

来自表层水的菌种：

更多的部分培养液来自腐殖介层表层水。试样通过粗糙的过滤纸过滤，弃去开始的

200mL。滤出液置于空气中使用。培养液必须在收集的当天使用。

混合相同体积的三种部分培养样品，最终的培养液即来自混合液。至少使用 3mL 用于培养。

(c) 来自活性污泥中的细菌

一份（不多于 3 升）来自于生活污水主要处理厂露天储存罐的活化沉淀（达到 2.5g/L 的悬浊液）可用作菌种。

1.6.2 试验步骤

测定在室温下进行，即温度保持在 18 和 25 之间。

如果合适的话，测定应在较低温度下（低至 10° ）进行，如果待测物已降解则无需进行更多的准备，但是若其未降解，则测定应在 18 和 25 之间的连续温度下进行。

1.6.2.1 操作阶段：单元中沉淀物形成/稳定

沉淀物生长/稳定期是在活化污泥悬浊液和使用的操作条件下单元进展到稳定状态的时期。

操作阶段是从样品开始加入到它的降解达到一个平台（相对于常量），这一时期不超过 6 周。

评估期为 3 周的时间，从试样开始降解直至到达相对的稳定和通常的高值。对于那些在开始的 6 周内几乎不表现出降解的物质，评估期为接下来的 3 周。

刚开始时，用混合流入液的含菌液充满一个单元。

充气机（和 OECD 规定的检测单元中的空气筒 E）和抽水装置 B 开始运行。

没有待测物的流入液必须以 1 升每小时或者 1.5 升每小时的速度通过空气管(C)；这样就导致了 3 小时或 6 小时的平均保留时间。

充气速度应该被调节到管(c)中的氧气含量保持恒定在 2 mg/L.

必须以适当的方法防止起泡。一定不能使用抑制淤泥活化的防起泡试剂。

在通风管(c)的顶部（以及在 OECD 测定单元中沉淀管(D)基部和循环装置中）的污泥应通过刷洗或者其他的办法至少每天一次返回到混合液中。

当污泥不能沉降时，可以通过加入 2mL 5%三氯化铁的方法增加它的密度，如需要可以重复。

流出液在管(E 或 F)中收集 20 或 24 小时，样品可在混合后取出。管(E 或 F)应该被仔细清洗。

为了监控整个过程的效率,积累流出液滤出液中化学需氧量(COD)或者溶解有机碳(DOC)至少每周两次测量。滤过的流入液也同样(滤过时使用孔径为 0.45 μm 的膜,开始的 20mL 应被弃去)

当得到粗糙的正常每日降解时 COD 或 DOC 减少应该达到平衡。

露于空气中的罐中的含有活化沉淀的干燥物质应该每周测量两次(以 g/L 表示)。单元应该用以下两种方法之一运行:露于空气中的罐中的含有活化的沉淀的干燥物质应该每周测量两次,或者如果多于 2.5g/L,过量的活化的沉淀应被弃去;或者给出从每一个管中遗弃的 500mL 混合液六周的平均保留时间。

当两个单元足够稳定时的参数(过程中的效率(在 COD 或 DOC 降解中),沉淀浓度,沉淀沉降能力,流出液浑浊程度等)被测量或估算时,试样应被导入到其中一个单元的流入液中,正如 1.6.2.2.

或者测出物应该被加入到沉淀增长期的开始阶段,特别是当沉淀被作为细菌培养液加入的时候

1.6.2.2. 实验步骤

运行时期的操作条件应当被保留,足够的试样的储备液(接近 1%)应被加入到测定单元的流入液中以得到污水中试样(接近 10 到 20DOCmg/L 或者 40mgCOD/L)的浓度,这可由每日混合储备液到污水中或者利用单独的泵系统得到,这些浓度可以被逐渐得到。

如果试样对活化沉淀没有毒害效果,也可以测定更高的浓度。

空白单元仅由没有加入物的流入液构成,提取适当体积的流出液用于分析和通过膜滤器过滤(0.45 μm),开始的 20mL 应被弃去。

滤过的样品应在当天分析,否则它们必须以其他适当的方法保存,例如在每 10 毫升滤出液中使用 0.05mL 1%的 HgCl₂ 或者在 2 到 4 °C 下保存到 24 小时或者在低于-18 °C 下保存更长时间。

在运行期,对于添加试样,不应该超过六周,评估期不应该短于三周,即为了最后实验结果的计算应该得到 14 到 20 次测量。

复合单元模式

复合的单元应该以交换 1.5L 每天来自两个单元间的沉淀通风管混合液得到(包括沉淀)。在强吸收物质情况下,1.5L 仅来自于陈化管中的表层液被倾入到其他单元的活化后的沉淀管内。

1.6.2.3. 分析

根据不同物质的表现可采取两种不同的分析方法：

DOC 和 COD

DOC 浓度的测量应和附录 2 中的 C 分析或者 COD 值相同

专门分析

试样的浓度由合适的分析方法决定。当可能时，应进行对沉淀物中物质吸收的专门测量。

2. 实验结果和评估

2.1. 复合单元模式

当使用复合单元模式，每日降解程度，DR 由式 1.2.1 计算

每日降解程度 DR 由在菌种交换过程中的物质转运的 DR_c 修正，方程[2]用于 3 小时，方程[3]用于 6 小时平均保留时间。

$$DR_c = \frac{4}{3}DR - \frac{100}{3} \quad [2]$$

$$DR_c = \frac{8}{7}DR - \frac{100}{7} \quad [3]$$

由[4]式计算 DR_c 值序列的平均和标准偏差

$${}^s DR_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR_c} - DR_{c_i})^2}{n-1}} \quad [4]$$

式中：

${}^s DR_c$ = DR_c 值序列的标准偏差，

$\overline{DR_c}$ = DR_c 值的平均，

n = 决定次数。

DR_c 序列的离群值是由合适的统计过程消除，例如 NaLimov (6)，在 95% 概率水平上平均值和离群值的标准偏差单独的 DR_c 集合是被重新计算的。

最终实验结果是由方程[5]计算

$$DR_c = \overline{DR_c} \pm \frac{t_{n-1; \alpha^s}}{\sqrt{n}} DR_c \quad [5]$$

式中：

$t_{n-1; \alpha}$ = 表值 E 和 E_0 的 n 个值对应的 t 和静态置信概率 P ($P=1-\alpha$), P 为 95% (1)

实验结果被描述为在 95%置信概率下的容许限的平均、相对标准偏差和数据的自由 DRc 数值集合中离群值数值的数目和离群值的数目等等。

DRc=98.6±2.3%DOC 消除，

S =4.65%DOC 消除，

n =18,

x =离群值的数目。

2.2.非复合单元模式

单元的表现可由下式来核对：

$$= \frac{COD_{或} DOC_{污水} - COD_{或} DOC_{流出}}{COD_{或} DOC_{污水}} \times 100$$

COD 或者 DOC 的消去百分比

这些每日的消除量可被绘制成图形以便揭示出变化趋势，例如环境适应性。

2.2.1. 使用 COD 或 DOC 测定

每日降解程度由 1.2.1 式计算

DRc 值序列的平均已经求得，此外它的标准偏差由下式计算：

$$^s DR = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

式中：

$^s DR$ = DR 值序列的标准偏差，

\overline{DR} = DRi 值的平均，

n = 决定次数。

DR 序列的离群值是由合适的统计过程消除，例如 NaLimov (6)，在 95%概率水平下平均值和离群值的标准偏差单独的 DRc 集合是被重新计算的。

最终实验结果是由方程[7]计算

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}^s}{\sqrt{n}} DR \quad [7]$$

式中：

$t_{n-1; \alpha}$ = 表值 E 和 E_0 的 n 个值对应的 t 值和静态置信概率 P ($P=1-\alpha$), P 为 95% (1)

实验结果被描述为在 95% 概率下的容许限的平均, 相对标准偏差和数据的自由 DR 数值集合中离群值数值的数目和离群值的数目等等。

DR = $98.6 \pm 2.3\%$ DOC 消除,

S = 4.65% DOC 消除,

n = 18,

x = 离群值的数目。

2.2.2. 使用特别的分析

水相 (R_w) 中试样的消除百分比由式 1.2.1 计算。

3. 实验结果报告

3.1 测定结果报告

如果可能的话测定结果应该包括以下几项:

- 给出的附录 3 的表格表示出了测定的操作条件,
- 选择的实验仪器 (OECD 试验指南中的或者多孔瓶),
- 选择的操作模式: 复合单元模式或者其他,
- 污水的种类: 综合性的或生活污水—在生活污水中应该表明试样的日期和位置,
- 使用的细菌培养液表明试样的日期和位置,
- 当使用专门的分析时, 关于分析测定方法描述,
- 绘制 COD 或 DOC 的相对时间, 包括操作期和估测期,
- 作为储备液中的 COD 或 DOC 的试样的分析性回收,
- 如果使用专门的分析方法时, 从水相的相对期 (包括运行期和估测期) 绘制试样的消除百分比,
- 试样的平均 DOC 或 COD 消除和平均偏差计算是来自于估测期和实验结果, 特别是当在连续的操作中有试样的稳定的消除,
- 相对期活化后沉淀浓度的图表,
- 关于活化后沉淀的评估 (过量沉淀的弃去, 气泡的出现, $FeCl_3$ 等),
- 测定中使用物质的浓度,
- 在沉淀上所做分析的实验结果,
- 试样和使用的参考物质的所有信息或实验结果,

— 实验过程中对任何变化的科学推理。

3.2. 实验结果的解释说明

来自水相试样的低消除可能是因为试样中有机物的抑制。这可由沉淀的消除和减少给出的浑浊的表层液和 COD 或 DOC 效率的减少所揭示。

物理和化学的吸收有时也可以起作用，在分子上的生物作用和物理的、化学的吸收的不同可由在沉淀上进行的合适的解吸附作用得到。

在生物降解（或者部分生物降解）吸附之间的差别明显的话，需要进一步的测定。

这可以由很多方法完成，但是最可信的方法是使用表层液作为设定背景的细菌培养液（测定透气性的方法更好）。

如果观察到了高的 COD 或 DOC 消除，它是来自于生物降解，而在低的降解中，在消除中的生物降解中的作用尚不清楚。例如，如果一种可溶的化合物表现出了常数为 98% 的高化学吸附，则过剩的沉淀的消耗量为 10% 每天，达到 40% 的消除是可能的；源于化学吸附和过剩沉淀的消除，剩余沉淀消耗率为 30%，可以达到 65%（4）。

当使用专门的分析时，应注意到物质结构和专门分析方法之间的关系，在这种情况下，观察到的现象不能被解释为物质的矿化作用。

4. 参考文献

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Annex V C9 Degradation Test -Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, Official Journal of the European Communities, No 1 251, 19.9.1984.
- 3) Painter, H. A., King, E. F., WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.
- 4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161 to 171.
- 5) Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, Official Journal of the European Communities, No 1 109, 22. 4. 1982, amending Council Directives 79/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, Official Journal of the European

Communities, No 1 347, 17. 12. 1973.

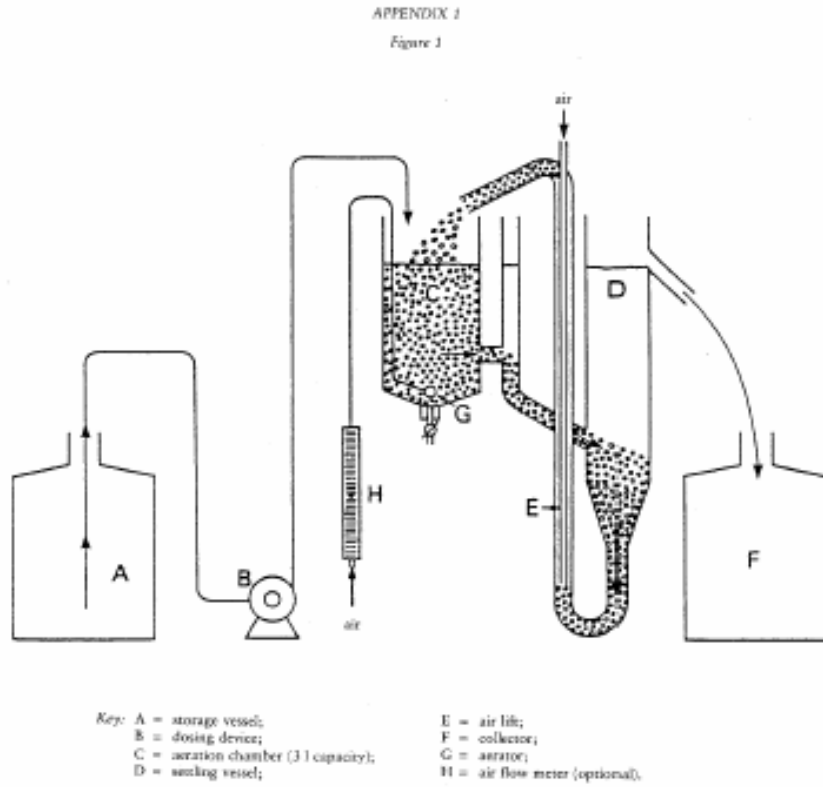
6) StreuLi, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden,

Fresenius-

Zeitschrift für Analytische Chemie, 303 (1980), pp. 406 to 408.

附录 1

图 1



A: 储存管 (storage vessel)

E: 空气筒(air lift)

B: 抽水泵 (dosing device)

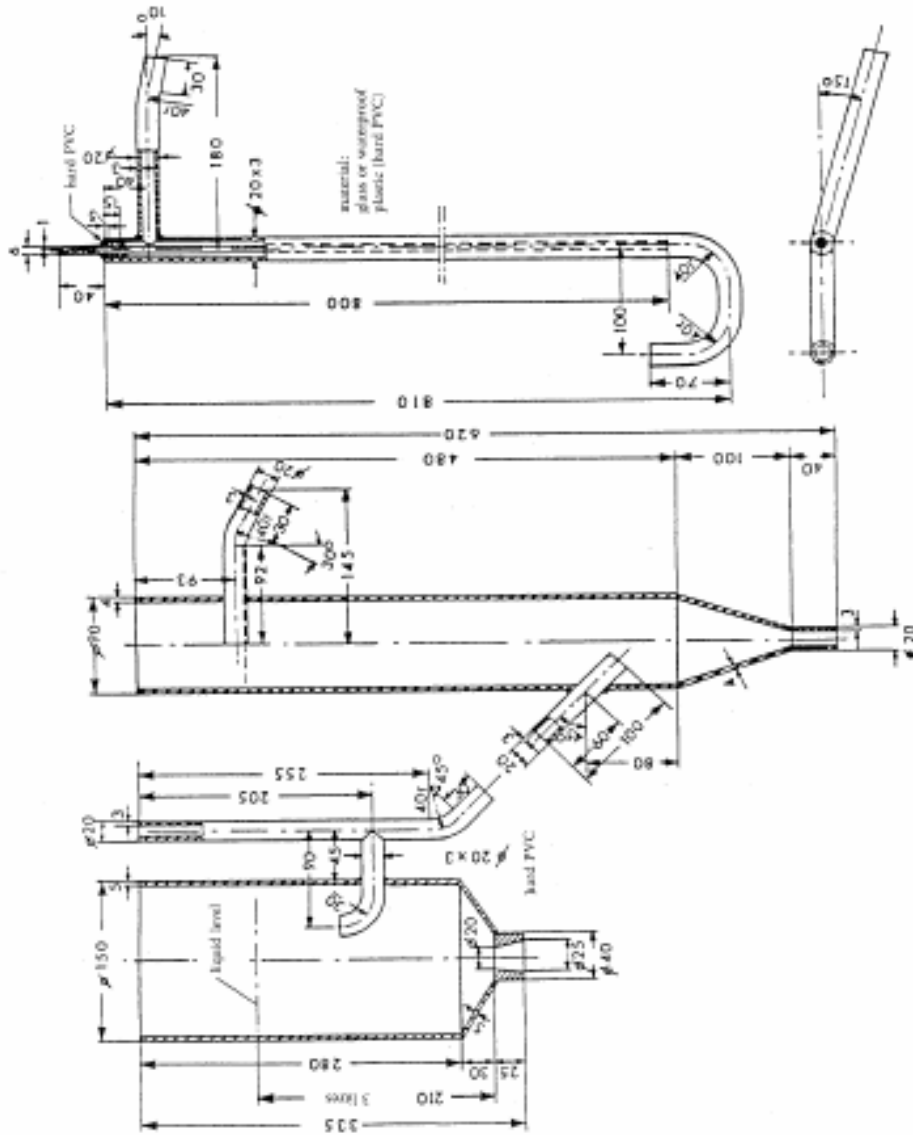
F: 收集器(collector)

C: 通风管(aerating chamber) (3 升容量) G: 充气机(aerator)

D: 陈化管(settling vessel)

H: 空气流量表(air flow meter) (选用)

Figure 2



Materials: glass or waterproof plastic (hard PVC)

物质：玻璃或者防水塑料（硬 PVC）

hard PVC

硬 PVC

图 1

用于测定生物降解的仪器

关键词：A=储存管 (storage vessel) E=流入液收集管(effluent collection vessel)
 B=抽水泵 (dosing pump) F=空气扩散装置(diffuser-stone aerator)
 C=多孔瓶(porous aeration vessel) G=空气流量表(rotameter) (选用)
 D=外部的防渗管(outer impermeable vessel)

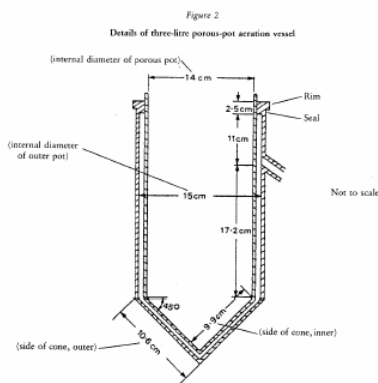
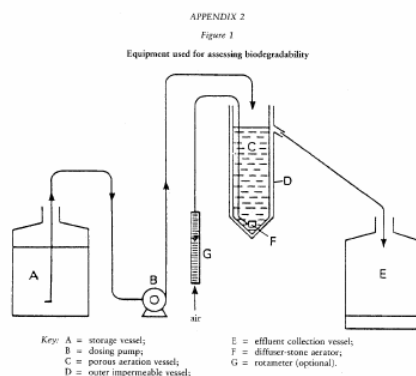


图 2 3 升多孔瓶通气管道详图

internal diameter of porous pot 多孔瓶内径

rim 边缘层

seal 密封层

internal diameter of outer pot 外瓶内径

not to scale 未按比例

side of cone, inner 内部锥体边长

side of cone, outer 外部锥体边长

C.11. 生物降解

活化污泥的呼吸抑制试验

1. 实验方法

1.1. 引言

这种方法通过测量在不同浓度下试样在给定的条件下的呼吸速率描述了评价试样微生物效果的方法。

此方法的目的是提供快速的筛分方法，识别能相反地影响好氧的微生物的处理，并且表现合适的在生物降解试验中使用的非抑制试样浓度的试样。

寻找浓度范围的试验应该在最终的实验之前完成。它提供关于在主要实验中使用的浓度的量程的信息。

没有试样的两种对照应该被包括在实验的设计中，一个在开始而另一个在实验序列的末尾。每一批活化的污泥也应该以参考物质核对。

这种方法已大量用于由于水溶性和低挥发性而易于留在水中的物质。

对于在实验介质中有有限溶解性的物质，测定 EC50 值是不可能的。

当试样有非偶合氧化磷酸化的倾向时，建立在氧气吸收上的结论可能导致错误的实验结果。

在进行实验时使用下列的信息可能是有用的。

- 水溶性
- 蒸汽压
- 结构式
- 试样纯净程度

建议

活化的污泥可能含有潜在的致病生物，应仔细加以处理。

1.2. 定义和单位

呼吸速率是在通气的污泥中水生微生物的氧气的消耗，大体上以毫克 O₂ 每小时每毫克沉淀表示。

为计算在特定浓度下试样的抑制效果，呼吸速度以两个对照呼吸速度的平均百分比表示：

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \text{百分抑制物}$$

式中：

R_s = 试样在被测浓度下氧的消耗速率

R_{c1} = 对照组 1 中的氧消耗速率

R_{c2} = 对照组 2 中的氧消耗速率

在这种方法中的 EC50 是在这种方法描述条件中的呼吸速率为 50 % 的试样的浓度。

1.3. 参考物质

推荐为 3,5 - 二氯酚，作为已知的呼吸抑制剂，常用于检查污泥的敏感性，在每次的活化沉淀中用作参考物和用于 EC50 实验。

1.4 测定方法原理

充满标准数量的综合性污水的活化沉淀的呼吸速率是在他们接触 30 分钟或者 3 小时后测量的。在其余标准条件下试样不同浓度的相同活化的沉淀的呼吸速率也是被测量的。在特定浓度下试样的抑制效果是以两个控制组之间的平均呼吸速度百分比表示的。EC50 值是由不同浓度下的测量计算得到的。

1.5 定量标准

实验结果在以下条件下有效：

- 两个对照呼吸速率互相相差在 15% 以内
- 3,5-二氯苯酚的 EC50 (30 分钟或者 3 小时) 在可接受的范围内，即 5 mg/L 到 30 mg/L

1.6 测定方法描述

1.6.1 反应物

1.6.1.1 试样溶液

试样溶液为在研究开始时使用储备溶液新鲜制备的。如果实验过程如下的话浓度为 0.5 mg/L 的储备液是合适的。

1.6.1.2 对照物溶液

例如 3,5—二氯酚的溶液以以下方法准备：0.5 g 3,5—二氯酚溶于 10 mL 1 M 的 NaOH，再用蒸馏水稀释至接近 30 mL，搅拌下加入 0.5 M H_2SO_4 (约使用 8 mL) 到开始的沉淀中，最后用蒸馏水稀释混合液到 1 升。此时溶液的 pH 值应在 7 到 8 的范围内。

1.6.1.3 综合性污水

综合型供给污水水样由在 1 升中溶解下列物质构成：

- 16 g 消化蛋白质
- 11 g 肉汁
- 3 g 尿素
- 0.7 g NaCl
- 0.4 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 2.8 g K_2HPO_4

注解 1：这种综合性污水为在 OECD 技术实验实验结果报告“综合清洗剂中表层液体生物降解的计划测量方法”(1976 年 6 月 11 日)的 100 倍浓度。

注解 2：如果准备好的介质没有立即使用，它应该在 0 到 4 下暗处保存，并且在它的组成不发生变化的情况下不多于一个星期。介质也可以在储存前先杀菌，或者在进行实验前不长的之内加入消化蛋白质和肉汁。使用前应将其混合好并且调好 pH 值。

1.6.2 实验仪器

测量仪器：精确的设计不是关键。然而，应该有颈部空间并且探针应该与测量瓶瓶颈紧密吻合。

普通的实验设备特别是下列设备是必须的：

- 测量仪器
- 充气装置
- pH 计和测量设备
- O_2 计

1.6.3. 细菌液的准备

来自处理主要生活污水的污水处理厂的活化的污泥被用作实验中的微生物培养液。

如果需要的话，带回到实验室后，大颗粒可以短期的陈化（例如 15 min）除去。倾出上层液中固体用于使用。或者，污泥以搅拌器混合几秒。

此外，如果认为出现了抑制性的物质，污泥应以水或者等渗溶液洗，离心后，倾出上层液（这一过程重复三次）。

干燥称量少量污泥。从这实验结果中，悬浮固体质量在 2 到 4g/L 的混合液中湿污泥的量可被计算。如果按照以下试验过程，这一水平给出了在 0.8 到 1.6 g/L 的试验介质的浓度。

时测量呼吸作用速率。

以 15 分钟的间隔分别对每个容器中的物质进行测量,以这样的方法每个容器中物质的接触时间是 3 个小时。

参考物质在每批微生物菌上用同样的方法试验。

当测量在接触 30 分钟以后进行时,不同的模式(例如超过一个氧测量仪)将是必要。

如果需要测量化学耗氧量,需要更进一步的容器,包含试样,合成污水养料和水,但是没有活性的沉淀物。在 30 分钟通气时间后测量并且记录氧消耗或 3 小时(接触时间)。

2.数据 and 评价

呼吸作用速率可从记录机在近似 6.5mg O₂/L 和 2.5mg O₂/L 之间的记录计算出,或当呼吸作用速率较低时从超过 10 分钟的时候计算。被测量了呼吸作用率部分的呼吸作用曲线应该是线性的。

如果两次控制的呼吸作用率不在对方值的 15%以内,或 EC₅₀(30 分钟或 3 个小时)参照物值不在接受范围(5 ~ 30 mg/L 对 3,5-二氯苯酚),试验是无效的并且必须重复。

每一试验浓度中抑制物的百分含量都要被计算(参见 1.2)。在普通对数纸(或概率对数纸)上用抑制物的百分含量对浓度作图,EC₅₀ 的值可以导出。

95%置信限的 EC₅₀ 值能使用符合规范的过程测量。

3.实验结果报告

3.1 实验结果报告

如果可能,试验实验结果报告将包含下列部分:

——试样:化学的鉴定数据,

——试验系统:来源,浓度,任何对活性沉淀物的预处理,

——试验条件:在呼吸作用测量前反应混合物的 pH,试验温度,试验持续时间,参考物质和它测量的 EC₅₀,无活性的氧吸收(如果有)。

——实验结果:所有测量数据,计算 EC₅₀ 的抑制曲线和方法,

EC₅₀,如果可能,具有 95%置信概率,EC₂₀ 和 EC₈₀,所有能影响实验结果的观察和任何偏离试验方法。

3.2.数据的解释

EC₅₀ 值应该也仅仅只能被认为是试样可能的对活性泥浆污水处理或废水微生物的毒性的指示,因为在环境发生的复杂的相互作用不能精确地在实验室中的试验模仿。另外,对

氨氧化有抑制作用的试样也可以产生不正常的抑制曲线。因此,这种曲线应该谨慎地解释。

4.参考文献

- 1) International Standard ISO 8192-1986.
- 2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11,1977, p. 165.
- 3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.
- 4) ETAD (EcoLogical and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, also described by:
- 5) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, p. 80.
- 6) Schefer, W., Textilveredlung 6,1977, p. 247.
- 7) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, Decision of the Council C(81) 30 final.

C.12. 生物降解

改良 SCAS 试验

1.方法

1.1 引言

这种方法的目的是估算水溶性的，不易挥发的有机物质长时间暴露在相对高浓度的微生物中时的最终降解的潜能。在这期间每天加入固定的污水养料维持微生物的生存能力。

(对周末要求，污水要在 4 存储。另外,OECD 的合成污水要使用确定的试验)

在悬浮的固体上的物理化学吸附作用可能发生并且当解释实验结果时，这必须考虑(参见 3.2)。

因为长时间的液相(36 小时),并且间歇性的增加养料,试验不模拟在污水处理装置中经历的条件。实验包含了各种试样，结果表明试验有高的生物降解潜能。

试验提供的条件对选择或改造对实验物质有降解能力的微生物很有利。(这个过程也可以被用来生产习惯于新环境的菌种在另外的试验中使用。)

用这个方法，测量溶解的有机碳的浓度可以用来判定试样最终的生物降解能力。这样可以在酸化和净化以后更好的测定而不用区分总碳和无机碳的差别。

特定的分析方法的同时使用可以对物质主要的降解做出评价(上一步化学结构的消失)。

这种方法仅仅对那些在试验中浓缩使用了的有机体的试样适用：

——在水里是可溶的(至少 20mg 溶解的有机体碳/升),

——有可以忽略的蒸气压力,

——不抑制细菌的,

——在试验系统内不存在显著地吸附的,

——不随试验溶液起泡而损失。

必须确定测定物质中有机碳的含量。

测定物质中主要成分的相对比例的信息对解释获得的实验结果将是很有用的，特别是对于实验结果较差或处于边缘的情况。对微生物毒性的信息也许对解释实验结果较低和选择合适的浓度是有用的。

1. 2 定义和单位

CT = 通气开始时，当时存在或加入澄清污水的测定有机碳的混合物的浓度
(毫克/升);

C_t = 通气结束时，在测定的澄清溶液中溶解的有机碳的浓度（毫克/升）；

C_c = 通气结束时，在对照物的澄清溶液中溶解的有机碳的浓度（毫克/升）。

生物的降解在这种方法中定义为消失的有机碳。生物的降解可表示为：

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} * 100 \quad [1]$$

1. 每天加入物质的总量的分解百分数 D_{da} ：

其中 D_{da} = 降解量/每天加入量。

2. 在每天的开始，存在的物质总量的分解百分数 D_{ssd}

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{t_i} - C_{c_i} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{t_i} - C_{c_i}} * 100 \quad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} * 100 \quad [2(b)]$$

其中 D_{ssd} = 降解量/每天开始时物质的量；

下标 i 和 $(i+1)$ 表示测量的日期。

如果废水可溶性有机碳每天的种类都不同，方程式 2 (a) 是值得选用的，而若废水可溶性有机碳每天的种类保持相对固定则可使用 2 (b)。

1.3 参考物质

一些情况时，如考察一种新物质，参照物质也许是有用的；然而这里没有推荐的参考物质。

主要给出了几种化合物用环试验估价的数据（见附录 1），因此可以不时地进行方法校正，当使用别的方法时可以与之实验结果相类比。

1.4 实验方法原理

将从废水处理装置中得到的活性污泥装入一个半连续的活性污泥 (SCAS) 装置。将试样和民用污水加入，向这混合物中通气 23 小时。然后停止通气让污泥沉淀，移去澄清液体。

保存在空气室中的污泥然后用进一步的等量试样和污水混合，重复以上循环。

生物降解通过测定澄清液体中溶解有机碳的含量来确定。所得值可以与从只装有沉淀废水的对照试管中获取的液体计算值相比较。

当使用特殊的分析方法时，根据生物降解的可测性改变母体分子的浓度（初级生物降解能力）。

1.5 定量标准

用这种基于移去溶解的有机碳的实验方法的再现性还未被确定。(当考虑初级生物降解时,从广泛被降解的物质中获得非常精确的数据)。

这种方法的灵敏度很大程度上取决于空白的多样性,较低程度上决定于测量溶解的有机碳含量的精度和每次循环开始时液体中试样的含量。

1.6 实验过程描述

1.6.1 准备

充分数目的干净通风装置,或者可以使用原装的 1.5 升 SCAS 的实验装置组装好每份试样和对照物的空气进口管(见图 1)。向实验装置中提供压缩空气,通过棉花的过滤装置,应有丰富的有机碳,用水预先饱和装置以减少蒸发损失。

一份混合的液体样本,每升含有 1 到 4 克悬浮固体,是从主要处理民用污水的装置中的活性污泥中获得的。每个通气装置中至少需要大约 150 毫升的混合液体。

用蒸馏水配制试样的储备溶液,浓度一般需要 400 毫克每升,以有机碳的形式表示,这可以在每次通气循环开始当生物降解还没发生时提供浓度为 20 毫克每升的试样。

只要对微生物的毒性在允许范围内可以用较高的浓度。

测量储备液中有机碳的含量。

1.6.2. 实验条件

实验必须在 20 到 25 °C 时进行。

使用高浓度的好氧微生物(1 到 4 克每升悬浮固体),36 个小时的有效延迟时间。在每次通气循环开始后的 8 小时内,污水加料中的含碳物质被广泛的氧化。此后在余下的通气时间内污泥内部进行呼吸作用,在这段时间内试样是唯一有效的底物直到其也被完全代谢掉。与以民用污水做为介质的每天加入料紧密相关的这些特征,为适应性和高度的生物降解提供了非常适宜的条件。

1.6.3. 实验操作

主要从合适的民用活性污泥装置或实验设备中获得混合的液体样品并在实验使用之前使它保持好氧性。在每个通气装置和对照装置中加入 150 毫升混合液体(如果使用原装的 SCAS 实验设备,将给出的体积扩大 10 倍),开始通气。23 小时之后,停止通气,让污泥沉淀 45 分钟。依次打开各容器的阀门,回收部分澄清溶液 100 毫升。加入 100 毫升使用前刚得到的沉淀民用污水样品到每个仍有污泥的通气装置。重新开始通气。在这一阶

段不加入试样，每天只把民用污水加入装置直到可从沉淀中得到澄清液体。这通常要花费两个星期的时间，在这段时间内澄清液体中有机碳的含量在每次通气循环结束时接近固定值。

在这段时间结束时，混合单个沉淀物，在每个装置中加入 50 毫升最终合成的污泥。

在对照组中加入 95 毫升的沉淀污水和 5 毫升水，在实验组中加入 95 毫升沉淀污水加 5 毫升试样的储备液（400 毫克每升）。再次开始通气并持续 23 小时。然后让污泥沉淀 45 分钟，倒出澄清液体，分析其中溶解的有机碳的含量。

在实验中，每天重复以上“加入—倒出”过程。

在沉淀之前，有必要将容器壁清洗干净以免在液面以上有固体聚集。每个容器都要使用各自的刮壁器或刷子以免交叉污染。

理论上，虽然较少的分析频率是允许的，但澄清溶液中溶解有机碳的含量要每天测量。

在分析之前，液体要通过 $0.45\mu\text{m}$ 的过滤薄膜或离心机进行过滤。只要能保证过滤薄膜在过滤过程中既不会释放碳又不会吸收物质就是合适的。当在离心机中时，样品的温度不能超过 40°C 。

当试样表现出很少或没有生物降解能力时实验的长度是不能确定的，但根据经验，一般至少 12 周，但不要超过 26 周。

2. 数据和计算

将试样和参照物装置中澄清液体里溶解有机碳的值对时间作图。

随着生物降解的完成，试样中的水平将趋近参照物。一旦两者水平之差在连续的三次测量中保持恒定，象这样之后的测量已足够对数据进行统计，而试样的生物降解百分数也

可计算出 (D_{da} 或 D_{ssd} ，参见 1.2)

3. 实验结果报告

3.1. 实验结果报告

实验结果报告应包含以下几点：

- 污水种类的所有信息，装置的种类和与试样有关的实验实验结果，使用的参考物质和空白实验，
- 温度，
- 描述降解的曲线，计算的方式（参见 1.2）
- 活性污泥和污水取样的数据和地点，适应的状况，浓度，等等，

—对实验产物变化的科学解释，

—典型现象和数据。

3.2.实验结果的解释

由于这种方法测定的物质将不容易被生物降解，仅仅取决于生物降解的任何溶解的有机碳的减少将随时间逐渐变化，除非适应性出乎意料，表现为几星期后发生突然消失。

然而，物化吸附有时将起重要的作用；这表现为在开始时加入溶解的有机碳的完全或部分的消失。随后发生的将取决于吸附的程度和废弃的废水中悬浮固体的浓度等因素。一般地，参照和实验澄清液体中溶解的有机碳的差异将从最初的较低值逐渐增加，并且这种差异将在剩余的实验过程中保持在一个新的值，除非适应性发生变化。

如果要进一步得知生物降解（或部分生物降解）与吸附的差别，需要进一步实验。这可以有多种方法，但最方便的是用澄清液体或污泥，象菌种在基础设备的实验（最好是测定呼吸的实验）。

试样在实验中给出高的无吸附的 DOC 消减应该被认为是潜在的生物降解。部分的，无吸附的消减表明化学物质至少是受到一些生物降解的。

溶解的有机碳减少很少或不减少可能是由于试样对微生物的抑制作用，也可解释为污泥的溶解或损失，得到了浑浊的浮液。这样实验应该用较低浓度的试样重做。

使用特殊的分析方法或使用¹⁴C 标记的试样将大大提高灵敏度。如果使用的¹⁴C 标记的化合物，回收到的¹⁴CO₂ 将证实生物降解的发生。

当实验结果给出的是初级生物降解时，要尽可能对化合物结构的变化导致相应试样母体的减少作出解释。

必须由空白实验得出实验结果对这种分析方法的有效性进行验证。

4.参考文献

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

附录 1

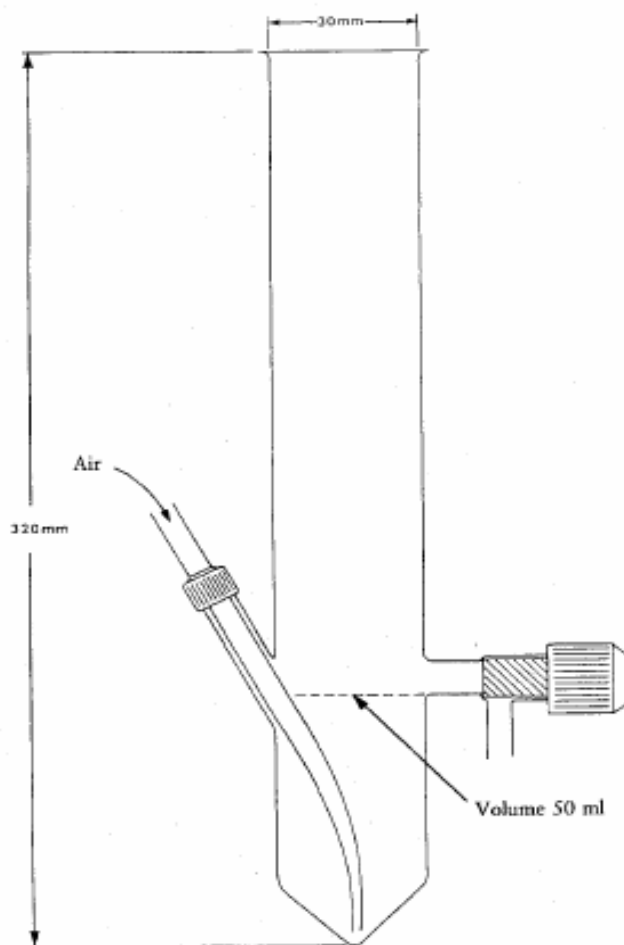
SCAS 实验：试样实验结果

物质	C_T (mg/ l)	$C_t - C_c$ (mg/ l)	生物分解 的百分比	实验持续时间
4- 醋酸苯胺	17.2	2.0	85	40

磺酸盐				
四丙烯磺酸盐	17.3	8.4	51.4	40
4-硝基苯酚	16.9	0.8	95.3	40
二乙基乙二醇	16.5	0.2	98.8	40
苯胺	16.9	1.7	95.9	40
四羧基环戊烷	17.9	3.2	81.1	120

附录 2

实验装置图 图 1



C.13 生物聚集：流动鱼的测定

1. 方法

这个生物聚集实验是OECD TG 305 (1996) 的翻版

1.1. 引言

这个方法描述了流动条件下鱼的生物聚集能力，虽然流动测定的变化特征是更好的，但是假如确实性标准满足的话，半静止的变化特征也是可以的。

为了满足不同的实验环境和各种特征的测定物质，这个方法给了足够的细节以便于给予实验者足够的自由去改变实验设计。当 $\text{Log } P_{ow}$ 在1.5到6之间时，这种化学药剂是最好的。

(1) 但是极亲脂性的试剂也可以 ($\text{Log } P_{ow} > 6$) 生物富积因子 (BCF) 有时用 K_B 表示。对于这种极亲脂性的试剂我们测得的 K_B 数值应该会比稳定状况下的生物富积因子 (BCF_{ss}) 要大。预计我们用 *BINIEIN* 公式的话测得的生物富积因子的 $\text{Log } P_{ow}$ 值会有9.0 那么大。影响生物聚集能的参数有吸收率常数 (K_1)、释放率常数 (K_2) 和稳定状况下的生物富积因子 BCF_{ss} 。

用放射性物质标记可以使测量定量时更加方便。只要测出最终剩余的放射性物质 (例如：氧化或组织增溶)， BCF 是由母体化合物、保留的代谢物和吸收的碳所决定的。 BCF 并不是完全依赖于放射性剩余，可以用获得的 BCF 与母体化合物进行比较组作为特别的化学分析。

整理一下过程，我们用放射性标记测定 BCF ，母体化合物和主要的代谢物如果需要的话应该被标记。我们还可以分析和识别鱼组织中的残余物质，并进行生物聚集的研究去组成对鱼代谢物的研究。

1.2. 定义及单位

生物聚集即实验物质在器官 (特别在组织中) 浓度的增加与物质在环境中的浓度有关。

生物富积因子 (BCF 或 K_B) 在这个聚集实验的吸收阶段的任何时候都是与测定物质在

鱼或组织的周围浓度有关的。这个浓度是被周围的化学物质所分割的。

稳定状态的生物富积因子 (BCF_{SS} 或 K_B) 在延长的时间里并没有明显的改变, 在这段时间里, 周围测定物质的浓度是恒定未变的。

当鱼中的物质浓度 (C_f) 曲线开始平行于时间轴, 这时达到了平台期或者叫做稳态。取三次样, 每次至少相隔两天, C_f 数值彼此相差在20%以内, 并且鱼周围的环境没有什么明显的变化时, 我们说鱼中的物质稳定和平衡了, 当分析合并样本时, 至少需要四个连续的分析。对于吸收慢的物质我们最好需要七天。

可以直接从动力学比例常数 (K_1/K_2) 计算得出动力学富积因子 (BFC_k)。

辛醇-水分配系数 (P_{ow}) 是平衡时正辛醇在水中的溶解比率。水生生物体的生物聚集潜力用 P_{ow} 的对数来标记。

吸收阶段是鱼在暴露在测定物质中的时间。

吸收率常数 (K_1) 是鱼暴露于测定物质中时鱼中的测定物质的浓度的增长速率的数字表达 (单位: 天^{-1})。

释放阶段是将鱼从含有测定物质的环境中转移至不含测定物质的环境中后, 对外释放测定物质的阶段。

释放率常数 (K_2) 是将鱼从含有测定物质的环境中转移至不含测定物质的环境中后鱼中的测定物质的浓度的减小速率的数字表达 (单位: 天^{-1})。

1.3. 原理和实验方法

实验分为两个阶段: 聚集阶段和释放阶段。在聚集阶段过程中, 分开的各组同类鱼放在至少两种浓度的测定物质中, 然后把它们转移到一个没有测定物质的环境中去进行释放阶段。只要聚集阶段中在生物体内的测定物质的聚集是比较明显的 ($BCF > 10$), 那么就需要进行释放阶段。在两个阶段时生物体内的测定物质都要进行测量。除了两种实验浓度, 我们还要有一组鱼放在一个没有测定物质但其他条件都和两组实验组相同的环境下, 用来作为“背景”。

在没有证明平衡早已达到前聚集阶段需要进行28天, 附录3的公式可以推导出聚集阶段至少需要的天数。将鱼转移到另一个没有测定物质但其他环境相同的容器里释放阶段就开始了。生物富积因子可以用两种方法计算,

一种是周围测定物质的浓度与生物体内测定物质的比值；或者水中浓度与动力学生物富

积因子的比值。 $BFC_k = \frac{K_1}{K_2}$ ，是满足动力学第一定律的。如果明显不符从动力学第一定律，那么我们就用更加复杂的模型了（附录5）。

如果28天都没有达到平衡，那么聚集阶段就应该延长，如果直到60天也没有达到平衡，那么就中止聚集阶段，而进入释放阶段。

聚集率常数、释放率常数、生物聚集因子都可以从一个把鱼和水中的测定物质浓度描述的很好的模型中计算出来。

BCF 可以用鱼的总湿重的一个函数表示。另外，当有特殊目的时，我们还可以把鱼分成肉和内脏两部分。对于许多有机物质，生物聚集能和和亲脂性有着明显的关系，测定物质的生物聚集和鱼的脂肪体积也有着一致的关系。为了减少实验结果中变量的影响，我们使用高脂性的（ $\text{Log } P_{ow} > 3$ ）物质，生物聚集就和鱼的总重和脂肪体积有关。条件允许的话，我们应该用相同的生物材料和脂肪体积来决定测定物质的浓度。

1.4. 测定物质及性质

在测定生物聚集能前，我们应该了解测定物质下面的一些信息：

水中的溶解度；

辛醇-水分配系数（ P_{ow} ）；

水解作用；

水中的折射率；

表面张力；

还有以下信息需要知道：实验中测定物质对鱼种的毒性强度，最好是渐进的 LC_{50} 。一个合适的分析方法，要准确且精确，用于对实验实验结果和生物材料中测定物质定量化，对样品的细节进行准备。还要知道水和鱼中的测定物质的最小探测限度。当用 ^{14}C 进行标记时，应该要知道放射性物质的百分比与杂质的关联。

1.5. 实验的注意事项

为了保证实验正确有效地进行，以下几个方面要注意：

温度的变化要小于2℃；

水中溶解氧的浓度不能低于饱和浓度的60%；

在聚集阶段容器中测定物质浓度的测量值应该保持在上下20%；

实验结束时鱼的死亡率要低于10%；当实验延长几周或几个月时，每组鱼的每月死亡率不能超过5%，总死亡率不能超过30%。

1.6. 参考物质

我们可以用已知生物聚集能的参考物质检测实验进程。这里不推荐特别的化合物。

1.7. 实验方法描述

1.7.1. 仪器

我们要避免使用任何部分会被溶解、吸收，或对鱼有不利作用的仪器。我们可以用矩形或圆柱形的用化学惰性材料制得的仪器，要有一定的容积和装载率。软塑料管的使用要减小到最小。可以用聚四氟乙烯（Teflon）、不锈钢或玻璃管。经验证明：可以使用有高吸附系数的材料，如硅化玻璃。在这种情况下仪器才不会在实验结束后就被丢掉。

1.7.2. 水

在实验中使用的天然水必须是无污染且取自相同的来源的水。稀释的水必须要使被选用进行实验的鱼存活并且不出现不正常的现象和行为。应该来说，我们要先验证鱼在这种水中可以生存、生长、繁殖。这种水有适当的pH、硬度、总固体、总有机含碳量、最好还有氨基盐、亚硝酸盐、碱度，对于海种鱼，还要有含盐量。如果很好的了解了这些参数是最好的，附录1推荐了海水和淡水这些参数的最高浓度。

在实验的过程中水应该有恒定的性质。pH值应该在6.0到8.5之间，但是给定条件的实验中应该变化在上下0.5pH之内。为了保证稀释水不会不恰当的影响实验实验结果，或者对参照的鱼有不利的影响，样品应该被隔离分析。要测定重金属含量（铜、铅、锌、汞）主要的阳离子和阴离子（Ca、Mg、Na、K、Cl、SO₄），农药（总的有机含磷量和总的有机含氮量）总的有机含碳量和悬浮固体。水的相对质量每三个月要测量一次，如果水的质量在一年内保持不变，检测的频率和时间就可以适当放宽（六个月一次）。

水的自然粒子常数总的有机含碳量应该越小越好，防止测定物质在有机物质上的吸附而

降低它的生物有效性，最大值可允许为5mg/L。对于特殊的材料（干物质直径最小要大于0.45 μm）总的有机含碳量要小于2 mg/L。如果需要，水在使用前还应该先过滤。鱼和食物残渣造成的水中有机碳含量应该减小到越小越好。整个实验过程中容器中水中有机含碳量不要超过实验开始时测定物质的有机碳含量，如果超过，可以用溶解药剂。

1.7.3. 实验溶剂

先制得适当测定物质浓度的实验溶剂。实验溶剂应该只是将稀释水和测定物质搅动混合。不推荐用溶剂或分散剂；虽然有时它会产生合适的浓度。溶剂可以用乙醇、甲醇、甘油、乙二醇单甲基醚、乙二醇二甲基醚和N，N-二甲基甲酰胺。分散剂可以使用CrmopHor RH40，Tween 80，甲基纤维素0.01%和HCO-40。使用这些药剂时要注意它们可能会使实验时细菌繁殖造成实验上的问题。测定物质应该用放射性标记，且应用最高的纯度（纯度>98%）

在实验中应有一个持续分配和稀释测定物质的储存溶液。每天每个测试通道至少改变5次量。应该选择流动的模式，但确定性标准满足的话半静止模式也是可以的。每天的前后48小时应对储存溶剂和稀释水进行测定，实验结果相差应该保持在20%以内。

1.7.4. 种类的选择

鱼的种类应该满足（1）易获得的；（2）大小合适；（3）可以满意地保存在实验室。其他标准还有：可以有观赏性的、有商业用途的、符合生态的、有较好的反应能力的、以及以前有过成功用途的等。

附录2给出了推荐的鱼种。其他种类的鱼要是在实验中使用就要有适应的环境。鱼的选择应该参照实验方法。

1.7.5. 鱼的保存

在实验过程中用足够的食物和一样的环境以及实验的温度使储存的鱼适应实验的环境。

在48小时的安排时间里，记录下死亡率，以及满足以下的标准：

一周内鱼的死亡率高于10%：抛弃全部的一组；

一周内鱼的死亡率在5%到10%之间：让这组鱼多适应7天；

一周内鱼的死亡率低于5%：接受这一组，但如果在接下来的7天内鱼的死亡率高于5%抛

弃全部的一组。

保证实验中使用的鱼没有可见的疾病或不正常的现象。抛弃有疾病的鱼。在实验过程中或实验前两周内不要对鱼进行治疗。

1.8. 实验过程

1.8.1. 预备实验

进行一个预备实验去完善决定性实验的实验条件是很有好处的，比如，选择测定物质的浓度，聚集阶段和释放阶段的持续时间。

1.8.2. 放入的条件

1.8.2.1. 聚集阶段

实践的经验可以预测聚集阶段的持续时间（如从先前的实验中），或者利用含水的溶解度或者辛醇-水分配系数。（附录3）

在没有证明平衡早已达到前聚集阶段需要进行28天。如果到了28天平衡还没有达到，就将聚集阶段延长，再进行进一步的测量，直到达到平衡或60天。

1.8.2.2. 释放阶段

释放阶段持续一半时的时间对测定物质在身体中由于氧化作用而减少一般是合适的（比如95%）（附录3对估计进行解释）。当达到95%释放量需要的时间是不切实际的长时，超过比如聚集阶段的两倍（超过56天）我们可以用少一点的时间（直到测定物质少于平衡时的10%）。然而有些物质对于比“单间”鱼模型有着更加复杂的聚集和释放模式的物质，不能象模型那样产生一阶动力学常数，需要用更长的释放阶段来确定损失速率常数。这个时期鱼体内的测试物质浓度高于分析方法的检出限，释放阶段的时间受该浓度的控制。

1.8.2.3. 测定鱼的数目

每次采样每个浓度的样品至少要有4条鱼。如果要更有力的统计实验结果，就需要更多的鱼。

如果用成年的鱼，必须记录它们的雌雄、或者都在实验中使用。如果都在实验中使用，那么在聚集阶段之前就必须把不同性别的鱼的脂肪体积记录下来；把雌鱼和雄鱼一起实验是必要的。

在任意一个实验中，应选用体重相似的鱼进行实验，最小的鱼不能小于最大的鱼的2/3。因为鱼的体重和年龄对BCF有很大的影响（1），所以所有的鱼应该是相同年龄的，并且是有相同的来源的。这些细节应该被准确记录下来。我们推荐在实验前将半样品鱼称重以便于对实验中鱼的体重对实验的影响进行评估。

1.8.2.4. 装载

鱼的密度应该尽量大，以减少实验开始时 C_w 对鱼的影响和避免溶解氧的浓度的下降。装载率对实验鱼种要是合适的，这一点非常重要。在任何情况下，每天每公升装载0.1-1.0克的鱼的装载率是不错的。如果测定物质的浓度可以保持在上下20%，并且溶解氧的浓度不低于饱和时的60%，那么装载率是可以的。

在选择合适的装载容器时，应该依据不同生活环境的鱼进行选择。比如生活在水面的鱼比生活在深海的鱼需要有更大的顶部的鱼缸。

1.8.2.5. 饲养

在适应和实验阶段，合适的鱼食应该有以下特征：要知道蛋白质和脂肪的总含量，要让鱼能保持一个健康状况和保持体重。实验过程中鱼每天要喂食量大约是体重的1-2%；这样才能保证鱼的脂肪含量在整个实验过程中保持恒定。喂食的总数应该被重复计算，比如每周一次以保证鱼的脂肪含量在整个实验过程中保持恒定。计算时，每个容器中鱼的体重都应该把鱼取出计算，不要在容器中称重。

在喂完食后一段时间（0.5-1小时）就应该对容器里的未吃完的食物和排泄物进行清扫。容器中应保持清洁使得有机碳含量越低越好。防止有机碳对测定物质的生物聚集产生影响。

1.8.2.6. 光线和温度

光照时间应该在12-16小时，温度应该适于测定鱼种。（上下2 °C）（附录2）要知道照明光的特点。要小心测定物质在光照下的光照反应。应避免非自然光对鱼的照射，有时

可以用一个过滤器以防止低于290nm的光线照射。

1.8.2.7. 实验浓度

实验中至少要有两种浓度进行实验。高浓度经常用敏感渐进的LC₅₀的1%。至少要是可测得浓度的10倍。

最高实验浓度应该可以被一个敏感的急性/慢性比率，用96h LC₅₀相除而获得（一些化学物质的比率为3到100），如果可以，再选择其他的浓度以便于与这个浓度区分。如果1%的LC₅₀标准和分析下限的限制，应该考虑用十以下的因数限制或用¹⁴C标记测定物质。

使用溶解药剂时所有的容器中浓度应该相同并大于0.1mg/L，它和测定物质对所有有机碳的影响是不知道的。因此，我们应该尽一切努力去避免使用这些材料。

1.8.2.8. 控制

与稀释水的控制有关的，如果证实一种溶解药剂对实验鱼种没有影响，那么我们就可以使用它。

1.8.3. 水质量的测量频率

实验过程中，所有容器中的溶解氧，TOC，pH值和温度都应该事先测量，如果可以，总硬度和含盐量也应该测量。溶解氧和含盐量至少应该在聚集阶段开始、中间、结束时测量，在释放阶段至少每周测一次。TOC应该在测定开始时（聚集阶段前24或48小时前）在放入鱼之前和聚集和释放阶段每一周进行测量。温度应该每天测量，pH值在每个阶段开始和结束时进行测量，硬度每次实验进行测量。温度应该被连续的监测。

1.8.4. 鱼和水的取样分析

1.8.4.1. 鱼和水的取样步骤

在加入鱼之前、聚集阶段和吸收阶段时，将在实验容器中取出的用于测定物质浓度的水取样。水取的样至少是与为喂食的鱼等重的。在聚集阶段，检测测定物质的浓度以判断是否符合有效性标准。

在聚集阶段时，鱼至少在五种情况下要取样，在释放阶段时，有四种情况要取样。在一

些情况下要从这些取样的数字上来精确计算 BCF 的值是很困难的。简单的净化动力学表明，我们应该更加频繁的进行取样（附录4）。如果那些数据在第一次的分析中证明是与预计的 BCF 的计算是不符的，我们就要用这些增加的数据进行计算。

附录4中给出了一个可以接受的抽样例子。用假想的 P_{ow} 值可以计算暴露时间占到聚集时间95%的值。

在聚集阶段一直取样直到28天后达到平衡阶段后。如果28天后还是没有达到平衡阶段，就取样到60天或到平衡阶段。在开始释放阶段时要将鱼放到干净的容器中。

1.8.4.2. 采样和样品准备

供分析的水样可用某种方法获得，如从桶中央静止水虹吸。如果不经常用过滤和离心分离生物不可利用的碎片和生物可利用的物质（如对某些超级脂溶性物质， $\text{LogPow}>5$ ）(1)(5)。样品可能不适用该步骤。另外，测量时应尽量保证水槽干净。其中有机碳必须在吸收期和持续期被监测。

每次取样是从实验桶中取出合适数量的鱼与水（一般至少4条）。用水快速擦干，用合适人道的方法杀死鱼，立刻称重。

更可靠的方法是取样后立刻分析鱼和水，这样可避免降解和损失，然后在实验同时计算大概的吸收率和富集率。但达到稳态应立刻分析，测定时应避免拖延。

当无法做到立刻分析时，样品应用合适方法保存。研究开始时，特殊测定物质贮存合适方法可用如低温，深度冻结，保持4度等。

1.8.4.3 分析方法质量

因为总的过程在很大程度上由测定物的分析方法的准确度，精密度，灵敏度决定，为满足化学分析的精密度和重现性，以及保证水和鱼中被测物质的回收率，应使用特定的实验检测方法。同时，要进行检查，不能在作为溶剂的水中检测被测物质。

如有必要,获得的 C_w 、 C_f 值可用回收组和空白组数据进行校正.鱼样和水样用此方法处理是为了防止污染和损失.(如采样仪器的吸附等).

1.8.4.4. 鱼样的分析

如果使用了放射性标记,那么就可分析放射性标记物的总量(如原放射物或衰变物),否则清理样品,单独分析原放射物。同时,无论快慢,主要产物可在静止状态或吸收末期测定。如果放射性标记物残余总量 1000%,以 BCF 表示是可取的。对某些特定类型化学物质,例如杀虫剂等,强烈推荐使用 BCF,以确定并且量化其降解大于稳态下鱼组织内总沉淀的 10%。如果在鱼测定中已确定并且量化降解大于稳态下鱼组织内总沉淀的 10%,那么也建议确定且量化水中的降解。

同样推荐用定量方法确定水中的物质降解。对于每条称重的鱼应经常测定,测定化学物质的浓度,如果不可能做到,每次采样时,集中样品可以完成但限制了应用数据的数字化步骤,如果特殊的数字步骤是重点因素的话。测定(6)和(7)中必须包含充足数量的鱼,以供测定使用。

BCF 应表示为总的湿重和脂含量的函数。如可能在实验开始时测定鱼的脂含量.应用合适的方法测脂含量。(参考文献 8 和 2,附录 3),用三氯甲烷或甲醇萃取实质的推荐的好方法(9)。各种方法给出的实验结果不同(10),所以给出方法的细节是很重要的。有条件的话,脂类分析最好和测定物分析使用相同的萃取剂.因为脂类在做色谱分析时常常不得不从萃取剂中分离出。鱼中的脂含量在实验结束时与开始时相比不得超过± 25%,组织中固体部分也应实验结果报告以便将浓度从湿重转化成干重。

2. 数据

2.1. 实验结果处理

测定物在鱼(或特殊组织)中的含量对吸收期不同时间作图,可以得到吸收曲线。如果曲线达到高稳定期或者曲线已大概逼近时间轴,稳态时 BCF_{ss} 可有下式计算:

$$C_f(\text{稳态平均值})$$

$$C_w(\text{稳态平均值})$$

如果没有稳态,也许可以采用“平衡是 80%(1.6/ k_2)或 95%(3.0/ k_2)这一冒险评价来获得足够精确的实验结果。

同样,富集因子(BCF_k),作为两个一级动力学常数,可以测量得到。释放速率常数 k_2 经常从释放曲线(如测定物随时间减少的曲线图)测得。聚集速率常数可以由 C_f 和 C_k 值(从

聚集曲线得来,见附录 5)更好的获得 BFC_k 、 k_2 和 k_1 的值是在电脑上用非线性评估的方法。或者也可以用作图来求 k_2 和 k_1 的值。如果释放曲线明显不是线性的,可用更复杂的模型。(附录 3)或寻求生物统计学家的意见。

2.2. 实验结果的解释

当测定浓度达到分析方法的极限时,应小心解释实验结果。

清晰定义的吸收和损失曲线是高质量的生物富积数据的标志。两个测定浓度聚集/释放速率常数的差别应小于20%。如有重大差别应记录下来,给出可能的解释。据先进的研究表明, BCF_s 确信极限可达到20%。

3. 实验结果报告

实验结果报告应含有下列信息:

3.1. 测定物质

物理性质和相关的物化性质;

化学特征数据(如果可以应包括有机含碳量);

如果使用放射性标记,被标记的放射性原子的精确位置和放射性物质和其他组分各占的百分数。

3.2. 测定种类

学名,血统,来源,预想,适应性,年龄,尺寸范围等等

3.3. 测定情况

使用测定步骤(如流动法或半静止法);

光源的类型、性质、光周期;

测定设计(如数量、测定容器的大小、换水速率、平行实验组数、每个实验中的鱼的数目、测定浓度、聚集阶段时间、鱼和水的采样频率);

储备液的准备和更新方法(如用溶解药剂,必须记录它们的浓度和有机碳含量);

测定物质的浓度,测定平均值和它们的标准偏差以及获得数据的方法。

稀释水的来源，预处理的描述，鱼在水中存活的现象，水的性质，pH，硬度，温度，溶解氧的浓度，残余氯水平，总的有机碳含量，悬浮物，以及作的任何测量与实验结果。

测量容器中水的量，pH，硬度，TOC，温度，溶解氧的浓度。

喂养鱼的细节（例：食物种类、来源、组成——至少是脂类和蛋白质，喂养的量和频率）；鱼和水样的处理信息，包括准备的细节，存储，萃取，分析过程，脂含量。

3.4. 实验结果

任何研究实验结果；

对照组鱼的死亡率和任何不正常行为；

鱼的脂含量（如果有测定的话）；

显示鱼身体中化学物质的聚集和释放曲线（包括任何测量数据），直到平衡状态；

所有取样时 C_f 和 C_w 值（标准偏差、变化范围）湿重、对照组的 C_w 值（包括空白、背景组）；

平衡期生物富积因子 BCF_{ss} 和/或 BFC_K ， k_2 和 k_1 的值（包括空白组和背景组），95%的确信度。（以上均为相应的总湿重，或特殊部分湿重表示）置信度和标准偏差，每次使用计算实验结果/数据分析的方法。

若使用放射性标记，如有需求，任何可观测到的中间代谢物累计应被记录，描述。

测定中任何不正常现象，任何与步骤的偏差，任何相关信息；

预先测定方法和仪器设计的最低检出限以对实验结果做最低估计，因为无法检出的实验结果是无法用于计算速率的。

4. 参考文献

Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 117-156.

Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). NonLinear dependence of fish bioconcentration on

n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.

OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental

Health

and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.

Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived

from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document

for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600

Fisher.s Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research

Triangle Park, N.C. 27711.

Compaan H. (1980) in .The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation. Ch. 2.3, Part II.

Government

Publishing Office, the Hague, The Netherlands.

Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.

Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected Lipid

methods for Normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431-1436.

CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test

Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests

with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

附录 1

有效稀释水溶液的化学特性

	试样	极限浓度
1	颗粒物	5mg/L
2	有机碳总量	2mg/L
3	未离子化的氨	1 μ g/L
4	残余的氯	10 μ g/L
5	有机磷农药总量	50ng/L
6	有机氯农药总量和多氯联苯	50ng/L
7	有机氯总量	25ng/L
8	铝	1 μ g/L
9	砷	1 μ g/L
10	铬	1 μ g/L
11	钴	1 μ g/L
12	铜	1 μ g/L
13	铁	1 μ g/L
14	铅	1 μ g/L
15	镍	1 μ g/L
16	锌	1 μ g/L
17	镉	100ng/L
18	汞	100ng/L
19	银	100ng/L

附录 2

FISH SPECIES RECOMMENDED FOR TESTING

建议测试鱼样

Recommended Species 建议测试鱼种类

Recommended range of test temperature () 建议测定温度范围 ()

Recommended total Length of test animal(cm) 建议测定鱼样总长度 (cm)

1 *Danio rerio*(1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan)

Zebra – fish 20 – 25 3.0 ±0.5

2 *Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)

Fathead minnow 20 - 25 5.0 ±2.0

3 *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus)

Common Carp 20 - 25 5.0 ±3.0

4 *Oryzias Latipes* (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck andSchLegel)

Ricefish 20 - 25 4.0 ±1.0

5 *Poecilia reticulata* (Teleostei, PoeciLiidae) (Peters)

Guppy 20 - 25 3.0 ±1.0

6 *Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque)

Bluegill 20 - 25 5.0 ±2.0

7 *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum)

Rainbow trout 13 – 17 8.0 ±4.0

8 *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus)

Three-spined stickLeback 18 - 20 3.0 ±1.0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

不同的江鱼和海鱼在不同国家使用名称不同，举例：

Spot *Leiostomus xanthurus*

Sheepshead minnow *Cyprinodon variegatus*

Silverside *Menidia beryllina*

Shiner perch *Cymatogaster aggregata*

English sole *ParopHrys vetulus*

Staghorn sculpin *Leptocottus armatus*

Three-spined stikleback *Gasterosteus aculeatus*

Sea bass *Dicentracus Labrax*

BLeak *ALburnus aLburnus*

总结

以上在表格中列出的鱼种是在淡水中容易养活的和/或能存活整一年的，反之，深海的或在海入口出的鱼种被各个国家部分的限制着。它们可以在实验室或渔场培养，在控制生病或寄生的条件下，测定动物可以有一个健康和已知的来源。这些鱼可能来自于世界的各个地方。

附件 3

吸收和释放阶段持续时间的预测

1. 吸收阶段持续时间的预测

在开始这项测定之前, k_2 的估计值和相应的回到某种程度稳态的时间需要通过 k_2 与辛醇/水分配系数 (P_{ow}) 或 k_2 与水溶性的经验关系获得。

k_2 (天⁻¹) 的估算值可以这样得到: 例如, 从下列一些经验的关系(1):

$$\text{Log}_{10} k_2 = 0.414 \text{Log}_{10}(P_{ow}) + 1.47 (r^2=0.95) \quad [1]$$

其它的关系式见参考文献(2).

如果分配系数 (P_{ow}) 是未知的, 可以将物质的水溶性代入下式来作估算(3)

$$\text{Log}_{10}(P_{ow}) = 0.862 \text{Log}_{10}(s) + 0.710 (r^2 = 0.994) \quad [2]$$

这里,

$$s = \text{溶解性 (mol/L)} : (n=36)$$

这种关系只适用于 $\text{Log}P_{ow}$ 值在 2 到 6.5 之间(4).

达到某种程度稳态的时间可以这样求得: 利用 k_2 的估算值, 通过通用的动力学方程来描述吸收和释放(一级动力学):

$$\frac{dc_f}{dt} = k_1 \cdot c_w - k_2 \cdot c_f$$

或者如果 C_w 是常数:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot c_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [3]$$

当稳态被无限接近时 ($T \rightarrow \infty$), 式[3]可以被化简为(5)(6):

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot c_w \quad \text{或} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

此时 $k_1 / k_2 C_w$ 是鱼中浓度稳态的近似。

[3]式可以转化为:

$$C_f = C_{fs} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{或} \quad \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t}$$

利用[4]式，只要事先用式[1]或[2]就估算出 k_2 ，就可以预计达到某种程度稳态的时间。作为一个指导原则，为产生统计上理想的实验数据 (BCF_k)，吸收阶段在统计上最理想的持续时间，是需要为鱼的测定物质的浓度的对数曲线时间达到中点的时间，或 $1.6/k_2$ ，或 80% 的稳态，但是至多 $3.0/k_2$ 或 95% 的稳态。(7)

达到80%稳态的时间是：

$$0.80 = 1e^{-k_2 t_{80}} \text{ 或 } t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad [5]$$

类似的，达到 95% 稳态的时间是：

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2} \quad [6]$$

例如，对于一种 $\text{Log}P_{ow} = 4$ 的检测物质的吸收阶段持续时间为（利用式 1, 5, 6）

$$\text{Log}_{10}k_2 = -0.414 \cdot (4) + 1.47 \quad k_2 = 0.652 \text{ 天}^{-1}$$

$$\text{或 up (80 \%)} = 1.6/0.652, \text{ 也就是 } 2.45 \text{ 天}(59 \text{ 小时})$$

$$\text{up (95 \%)} = 3.0/0.652, \text{ 也就是 } 4.60 \text{ 天}(110 \text{ 小时})$$

相似的，对于一种 $s=10^{-5} \text{ mol/L}$ ($\text{Log}(s) = -5.0$) 的检测物质，持续时间为：利用式 1, 2, 5, 6)

$$\text{Log}_{10}(P_{ow}) = 0.862(-5.0) + 0.710 = 5.02$$

$$\text{Log}_{10} K_2 = 0.414 (5.02) + 1.47$$

$$k_2 = 0.246 \text{ 天}^{-1}$$

$$\text{up (80 \%)} = 1.6/0.246, \text{ 也就是 } 6.5 \text{ 天}(156 \text{ 小时})$$

$$\text{或 up (95 \%)} = 3.0/0.246, \text{ 也就是 } 12.2 \text{ 天}(293 \text{ 小时})$$

另外，表达式：

$$t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55.31 \text{ (小时)}$$

可以用来计算达到有效稳态的时间。（4）

2. 释放阶段持续时间的预测

把身体负担降到某种初始浓度的时间的预测，可以通过描述吸收和释放阶段持续时间的普适方程中得到。（一级动力学）（1）（8）

对于释放阶段， C_w 可以认为是零，方程化简为：

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ 或 } C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

这里 $C_{f,0}$ 是在释放开始阶段的浓度，达到 50% 释放的时间 (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{或} \quad t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

类似的达到 95% 释放的时间:

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

如果 80% 的吸收阶段用在第一阶段 ($1.6/k_2$), 而且 95% 损失在释放阶段 ($3.0/k_2$), 那么释放阶段的时间大约就是吸收阶段的两倍。

但是重要的是要指出, 这种估算基于吸收和释放模式都要遵循一级反应动力学。如果明显的不服从, 则需要引入更复杂的模型。

参考文献:

Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* 1, pp 309-320.

Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1), pp 4-10.

Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of Lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res* 22 (6), pp 701-707.

Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), pp 785-792.

Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* 55, pp 614-622.

Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) *Toxicokinetics in fish: Accumulation and*

Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, 9, pp 3-19.

附件4

对 $\text{Log}P_{ow} = 4$ 的检测物质

种群密度测定采样时间的理论实例

鱼样品	采样时间表		水样数	每个样品的 鱼数
	所需的最小 频率	附加的样品		
吸收阶段	- 1 0		2* 2	加 45 - 80 条鱼
第一	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
第二	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
第三	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
第四	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
第五	4.7		2	6
释放阶段				把鱼样制成 无水化学物 质
第六	5.0	5.3		4 (4)
第七	5.9	5.7		4 (4)
第八	9.3	11.2		4 (4)

第九	14.0	17.5		6 (4)
----	------	------	--	----------

* 去最小的三倍容积以后的样品水

括号里的值表示如果附加的样品也做使用水或鱼的样品数。

注：预先测验表明，对 $\text{Log}P_{ow} = 4$ 的 k_2 估计为： 0.652 天^{-1} 测定的总持续时间为： $3.6 \times$

4.6 吸收时间 = $3.6 \times 4.6 \text{ 天} = 14 \text{ 天}$ ，“吸收时间”的估算见附件 3。

附件 5

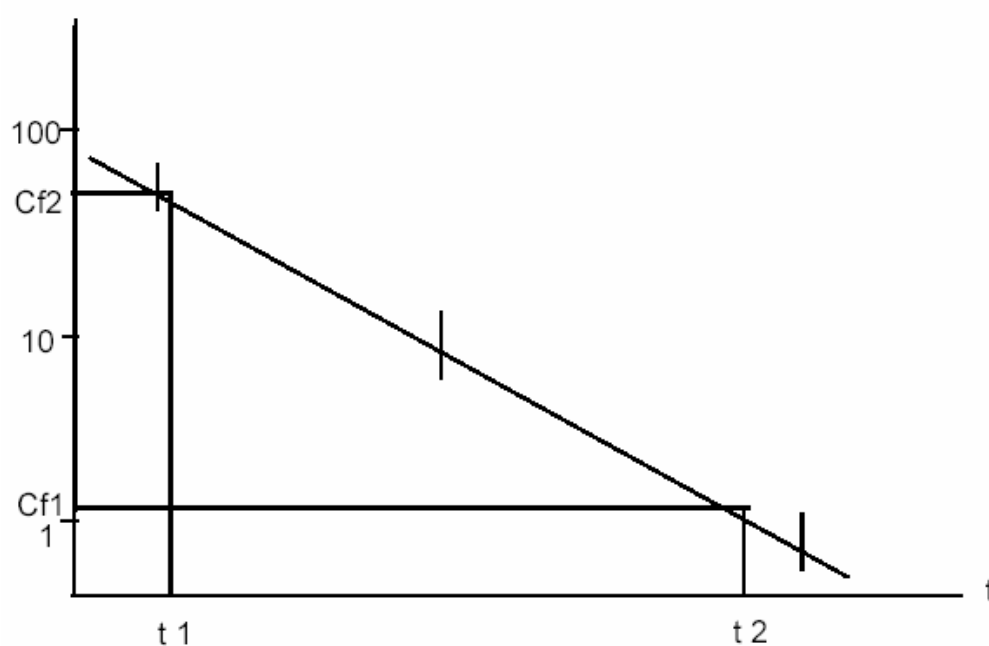
模型描述

多数生物浓度试验数据已经被认为是合理的描述为一个简单的二维模型，就像近似鱼中浓度的直线所表示的，在释放阶段中，当这些点被画在半对数坐标纸上。（这些点不能被描述为直线时则需引进更复杂的模型，例如，参见Spacie和Hamelink，附件3中参考文献1

当 k_2 为常数时，释放率的作图描述法

以每份样品中检测物质的浓度对采样时间描点作图，在半对数坐标纸上作图，直线的斜率是 k_2 。

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



注意到偏离直线可能表示一种比一级反应更复杂的释放模式。为解决释放偏离一级反应动力学，可能需要采用另一种作图方法。

当 k_1 为常数时，释放率的作图描述法。

给出 k_2 ，计算 k_1 如下：

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x (1 - e^{-k_2 t})} \quad [1]$$

将浓度的对数对时间作图（在算术坐标系），描一条平滑的吸收曲线，从曲线的中点数据读出 C_f 的值。

计算机方法求吸收和释放阶段比例系数

求生物浓度因子和 $k_1 k_2$ 的比例常数的参考方法是在计算机上用非线性参数估算法。这些步骤求 k_1 和 k_2 的值只要给出一系列连续的时间浓度数据和以下模型：

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [2]$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [3]$$

上式中 t_c 是吸收阶段结束的时间。

这个过程提供 k_1 和 k_2 的标准偏差估计方法。

因为 k_2 在多数情况下可以从吸收曲线相对较精确地估计出来，而且因为如果 k_1 和 k_2 被同时估算出来，它们之间的联系十分紧密，可能较为明智的做法是先仅用释放数据求出 k_2 ，然后利用吸收数据和非线性回归求 k_1 。

C.14. 幼鱼的生长测定

1. 方法

这里的毒性测定方法取自经济合作与发展组织(OECD) TG 215 (2000)

1.1 引言

这一个设计用来进行长期暴露在化学药品下对幼鱼生长的影响的测定。这种方法在欧盟发展出来并经过其检测 (1)(2)。为估定在流通条件下的化学药品对幼年的虹鳉鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 的生长效果。其他的被证明良好的种类也可能使用。举例来说,从 zebrafish (*Danio rerio*)² (3)(4) 和 ricefish (medaka, *Oryzias Latipes*) (5)(6) 的生长测定已经得到经验 (7)。

参见总引言第 C 部分。

1.2 定义

最低可观测有效浓度(LOEC)：是某种检测物质和对照组相比可观察到明显作用 $p < 0.05$ 的最低浓度。

无可观测有效浓度(NOEC)：检测浓度低于 LOEC。

EC_x：在这种检测手段下指与对照组相比使鱼生长变化的 x%的检测物质浓度。

装载率：单位体积水中鱼的湿重。

数密度：单位体积中鱼的条数。

单个鱼特定生长率：表示单个鱼相对于原始体重的生长率。

整个容器平均特定生长率：在同一浓度下整个鱼缸中鱼群的平均生长率

伪特定成长率：表达个别鱼的生长率与每缸鱼平均初始体重。

1.3 检测方法的原理

在称重后,将处于指数增长期的幼鱼放入检测室中,暴露在将检测物质溶于水中达到非致死浓度的溶液中,最好是流动相,若不能,就在接近半静态(静态更新)条件下。检测持续 28 天。期间鱼食物供应很差,按照初始重量投食,可能在 14 天后重新计算食物供应量。在检测结束后,重新称量鱼的重量。生长率的效果用回归模型来计算生长率变化 x% 的浓度。即: EC_x (例如, EC₁₀, EC₂₀, EC₃₀)

2 Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The pHyLogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental Biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

换句话说，用实验数据与对照组比较来计算 LOEC 和 NOEC。

1.4 检测物质的信息

一个急性中毒的测定（参见测定方法 C.1.）更适宜实现这个测定中物质的选择，应该可以采用。这暗示检测物质的水溶性和蒸汽压是已知的，而且要一个达到已知和报道中的精度和检出限的可靠分析方法用于检测溶液中物质的定量测量。

结构公式，物质的纯度，在水中和光照下的稳定性， P_{ka} ， P_{ow} 以及预备生物降解的结果都是有用的信息。

1.5. 检测的有效性

为使测定有效，应用下列条件。

- 对照组的死亡率在测定结束的时候不能超过 10%;
- 必须充分增加对照组的平均重量，以使增长率的最小检测量比较显著。鉴定测定表明在28天中，虹鳟鱼对照组体重的增长必须至少一半（50%）于其初始重量。例如，初始重量1g/条（= 100%），28天后重量： ≥ 1.5 g/条（ $\geq 150\%$ ）
- 整个测定中水中溶解氧的浓度必须至少是空气中饱和值 ASV 的 60%。
- 在测定期间水温变化不能超过 ± 1 ，测定容器的温度浮动在任何时候都须在 2 范围内，这是物种要求的温度范围。（见附件 1）

1.6 测定方法描述

1.6.1 仪器

使用通常的测定设备，尤其是以下几种：

- 氧气和 pH 计；
- 测定水硬度和碱度的设备；
- 适当的控温仪器，最好能连续监控；
- 用化学惰性的材料制成的容器，容积要考虑到装载率和数密度（见 1.8.5 节和附件 1）
- 适当精度的天平（就是说精确到 0.5%）

1.6.2 水

只要检测鱼的种类能够长期生存并生长的水都可以作为测定用水。它在此测定期间的水质应该是不变的。水的 pH 值应该在 6.5 到 8.5 之间，但是在一个具体的测定中，pH 值的浮动不能超过 ± 0.5 个单位。推荐硬度在 140mg/L 以上。为了保证稀释液不过度的影响测

定结果（例如检测物质中的配合物影响），用于分析的样品水必须间隔采样。重金属元素（如 Cu, Pb, Zn, Hg, Cd 和 Ni），主要阴阳离子（如 Ca, Mg, Na, K, CL 和 SO₄），农药（如总有机磷和有机氯农药），总有机碳和固体悬浮颗粒都要作测定，例如，每三个月中稀释液的质量要保持相对恒定。如果能够证明水质在至少一年内无变化，检测可以不必如此频繁，间隔可以扩大（例如每六个月测一次）在附件 2 中列出了一个可接受的稀释液的一些化学的特性。

1.6.3 检测溶液

选定浓度的检测溶液由储备液稀释制得。

储备液必须用化学方法（如搅拌和超声破碎）由检测物质和稀释液用简单的混合、搅拌等方法精确配制。为获得适当浓度的浓缩的储备液可用饱和度柱（溶解度柱）。

为了制备合适浓度的储备液，溶剂或分散剂的使用有时有所要求。适当的溶剂例子如丙酮，乙醇，甲醇，二甲亚砷，二甲基甲酰胺，二缩三乙二醇。适当的分散剂如 CremopHor RH40, Tween 80, 甲基纤维素 0.01 % 和 HCO-40。如果用容易生物降解的物质（如丙酮）或容易挥发的化合物则需要小心照顾，因为这些物质在流动相中可能造成细菌生长的问题。当一种溶液使用时，必须注意它对鱼的生长没有明显的影响而且与只加溶剂的对照组相比对于幼鱼没有明显的不利作用。

对于流动测定测定，必须要有一种连续的分配与稀释储备液的系统（如计量泵，比例稀释器，饱和器系统）来向容器传递一系列的浓度的溶液。储备液和稀释液的流动速率要经常核对，最好是每天，在整个测定过程中，变化不能超过 10%。鉴定测定（2）表明，对于虹鳟鱼，测定中鱼每天的换水频率在 6 升/g（见 1.8.2.2 节）。

对于半静态（可更新的）测定中，介质更新的频率依赖于检测物质的稳定性，但是推荐每天换水。在初步稳定性测定中（见 1.4），如果检测物质浓度在更新过程中不稳定（变化范围在标定的 80-120 % 以外，或跌至测过的初始浓度的 80% 以下）时，就要考虑用流动相。

1.6.4 种类选择

推荐使用虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)，因为在检测（1）（2）中在其上获得的经验最多。当然，其它有良好实证的种类也可以使用，只是测定结果要被转换为提供的适当测定条件。例如，对斑马鱼 zebrafish (*Danio rerio*)(3)(4) 和 ricefish (medaka, *Oryzias Latipes*)(5)(6)(7)的经验也是可用的。如果这样，选择鱼的种类和测定方法原理在都需要

实验结果报告出来。

1.6.5 养鱼

测定用鱼要从同一容器中的鱼群中选出，最好是一批卵生的。测定前将此鱼在与测定条件相同的水质和光线中养两周。在整个测定期间喂食量至少使其每天增重 2%，最好每天 4%。放置 48 小时预备期后，按照下列标准记录死亡率。

- 若七天中死亡率超过 10%，不要使用这批鱼。
- 若七天中死亡率在 5% 到 10% 之间，让鱼再适应 7 天，如果后七天中仍然超过 5%，放弃这批鱼。
- 死亡率在 5% 以下，可以使用这批鱼。

鱼在这测定前的两周内和测定中不能接受疾病治疗。

1.7 测定设计

测定设计与数字的选择和测定浓度的间隔有关，数字是指在每个浓度上的容器的个数和每个容器中的鱼的条数。理想的测定选择应遵循以下规则：

- 研究目的
- 使用的统计分析方法
- 实验原料的可用性和实验花费。

如果可能的话，客体的描述要指定一种统计方法，这种方法用来检测变异的给定大小（例如生长率），或者说要求估计 EC_x 的精度（例如 $x = 10, 20, 30$ ，最好不要小于 10）。没有这，就不能给出研究规模的严格规定。

要指出的是，最优化的统计分析手段设计（资源的最有效利用）并不一定在其他情况下优化。那推荐用于 LOEC/ NOEC 的估计值的设计来在回归分析中并不因此同样是适用的。

在大多数的情况下，回归分析比方差的分析好，原因由 Stephan 和 Rogers 讨论过(8)。然而，当没有发现适当的回归模型 ($r_2 < 0.9$) 的时候应该用 NOEC/ LOEC。

1.7.1 回归分析的设计

用于回归分析的测定设计应该考虑下列重要条件：

有效浓度（举例来说 $EC_{10,20,30}$ ）和涵盖测定物质的影响范围的浓度应该被包含在测定中的浓度范围中。当效应浓度在被测定的浓度范围的中央的时候，估计效应浓度的可能做到的精密度可能将会最好。一个初步的范围测定在选择适当的测定浓度方面可能是有帮

助的。

为了使满意的统计模型可用，测定至少应在一个对照容器和五个附加容器中在不同浓度下进行。在适当处，当使用溶剂时在检测系列之外，一个对照组应使用最高溶剂浓度(见第 1.8.3 节和 1.8.4)。

可能要使用适当的几何级数和对数级数 (9)(见附件 3) 检测浓度在对数空间更好。

如果超过六个容器是有效的，加添的容器应该要么用来提供复件要么用来内插在浓度间隔中使其更小。这两种方法都是值得的。

1.7.2 NOEC/LOEC 的方差分析设计 (ANOVA)

最好每个浓度都有个备份，而且统计分析应该是在整个容器层次水平上的 (10)。如果没有备份缸，就不能得到超越不同鱼之间的不同缸之间的变化。但是经验 (11) 表明在测定条件下不同缸间的差距比缸中鱼间的差距是非常小的。因此，一个相对可以接受的选择是不同鱼间层次上的统计分析。

按照惯例，在在一个含有不超过 3.2 的因子的几何级数中至少应使用五个浓度。

通常当备份缸做测定时，备份对照缸和其中鱼的数量在每个浓度上都应是两倍，浓度的大小应该是相等的 (12)(13)(14)。相反，如果没有备份组，对照组中鱼的条数每个浓度上应该相等。

如果 ANOVA 是基于容器层面上的而不是单个鱼 (这个测定要求每条鱼做标记或者使用第 2.1.2 节中提到的“伪”特定增长率)，就需要足够的备份缸来求缸内不同浓度的标准偏差。这意味着方差分析误差的自由度应至少为 5 (10)。只要对照组是平行测定的实验结果误差变化就可能偏倚，因为问题中生长率的平均值可能变化。既然随着增加的浓度生长率可能降低，这将导致变化率的过高估计。

1.8 测定步骤

1.8.1 对测定用鱼的选择和称重

在测定前将鱼的体重的个体差异减小到最低限度是十分重要的。不同鱼种间推荐允许的个体大小差异在附件 1 中给出。测定开始时整批鱼的单个体重差异最好能在平均值的 10% 内，无论如何最多不能超过 25%。在测定前，最好对鱼的子样品进行称重，从而估计平均重量。

在测定前 24 小时对鱼群停止供应食物。用鱼必需随机选择。用全身麻醉剂 (例如, 100mg/L 的 tricaine methane sulphonate (甲基偶氮) (MS 222)，用两倍计量的碳酸氢钠中和)，

每条鱼都要按照附件 1 称量湿重（用吸水纸洗干），重量在预计范围内的鱼应予以保留，然后随即分配到检测容器中。记录每个容器中鱼的总湿重。麻醉剂的使用和处理操作（如擦干和称重）会对幼鱼产生威胁和伤害，特别是小的鱼种。因此对幼鱼的处理操作必须最大限度的小心以防止对测定动物的威胁和伤害。

在测定中的第 28 天对鱼再次称重（见 1.8.6）。但是，如果认为有必要重新计算食物定额，可以在第 14 天重称（见 1.8.2.3）。其它方法如照相可以用来测定鱼的大小从而调整食物定量。

1.8.2 暴露条件

1.8.2.1 持续时间

测定的持续时间要 ≥ 28 天。

1.8.2.2 装载率和存储密度

适当的装载率和存储密度对检测种类的鱼是非常重要的（见附件 1）如果存储密度太高，就会产生过于拥挤的压力使鱼生长速率降低，还有可能使鱼生病。如果太低，会产生领地行为也会影响鱼的生长。装载率必须足够低以使氧气浓度可以在不通气的条件下达到 60%ASV。检验测定（2）表明对于虹鳟鱼，在 40 升的缸中放 16 条 3 - 5g 的鳟鱼是比较合适的。推荐换水频率是 6 升/克鱼/天。

1.8.2.3 喂养

必须给予喂养适当的食物（附件 1），采用适当的投放率以使获得适当的生长率。小心照顾不要使水中有微生物繁殖和浑浊。对于虹鳟鱼每天 4% 的生长率是可以满足这些条件的（2）（15）（16）（17）。每天的食物定量可以分成两等份，分两次投放，间隔至少 5 小时。定量时按照测定中每缸鱼的初始总重。如果 14 天后鱼的重量重称了，则重新计算食物定量。

称量前 24 小时不喂食。

对于没有吃掉的食物和排泄物应每天用抽水泵吸容器的底部，小心清理出缸。

1.8.2.4 光线和温度

光周期和水温应适合鱼种的生长（附件 1）。

1.8.3 检测浓度

通常，即使不考虑测定设计（1.7.2），也需要五组检测物质的浓度。预知检测物质的毒性（如通过急性中毒测定或范围测定研究）有助于选择合适的检测浓度。如果少于五组数

据应给出正当理由。最大浓度不能超过检测物质在水中的溶解度。

如果在准备储备液时用到辅助溶剂，最终浓度不应高于 0.1mL/L 而且最好每缸浓度都相同（见 1.6.3）。但是，必须尽一切努力避免使用这种物质。

1.8.4 对照

稀释液对照组的数量依赖测定设计（见 1.7-1.7.2 节）。如果使用溶剂，那么同样数量的溶剂对照组像稀释液一样也要包含进来。

1.8.5 分析测定和测量的频率

在测定中，检测物质的浓度应遵循以下规则的间隔。

在流动相测定中，稀释液和毒剂储备液的流速要按时检测，最好每天一测，在整个测定中变化不能超过 10%。检测物质的浓度变化不能超过标定值的 $\pm 20\%$ （即 80% - 120%，见 1.6.2 和 1.6.3），建议至少在测定开始时然后每周一次的定期分析检测物质的最高和最低浓度。如果在测定中检测物质的浓度不能保证保持在标定值的 $\pm 20\%$ 以内（有赖于检测物质的稳定性数据），就有必要把每个检测浓度都要作测定，但是注意要遵循同样方法。在检测物质的浓度能够保持在 $\pm 20\%$ 标定值内的半静态（可更新的）测定中，建议至少在重新准备之前和以后的每周定时分析最低和最高检测浓度。对于不能保证检测物质浓度保持在 $\pm 20\%$ 标定值范围内的测定中，就有必要遵循同样方法把每个检测浓度都作测定，即使是更稳定的物质。

强烈建议测定结果基于测量过的浓度。但是，如果有证据证实整个测定中溶液中测定物质的浓度令人满意的保持在 $\pm 20\%$ 标定值或测量过的初值范围内，实验结果可以基于标定值或测量值。

样品需要先被过滤（如用 0.45 微米孔径筛），推荐用离心过滤法。但是如果物质不被过滤器吸附，渗滤也是可以接受的。

测定中，每个缸的溶解氧的浓度，pH 值，和温度都要测量。在对照组和浓度最高的一缸中总硬度，碱度，盐度（如果相关）要测。溶解氧，盐度（如果相关）至少要测三次（开始，中间，结束各一次）。在半静态测定中，建议溶解氧的测定要更加频繁，最好每次换水或者每周测一次。pH 值要在开始结束时和每次换水时测量，在流动相测定中每周一次。硬度和碱度每次测定测一次。水温最好在一缸中持续监控。

1.8.6 观察

重量：在测定结束时，测量每只存活的鱼的湿重（吸水纸擦干），可以整缸一起测，也可

以单个测。整缸测比单个测好因为单个测意味着每只鱼都要做标记。如果测量单个体重从而计算个体增长率，要选好标记技术避免使动物紧张（改用冷冻标记物是很好的，如使用优质的有色鱼线）。

测定中每天都要观察鱼，任何外部的反常现象（如出血，变色等）和反常行为都要记录，死鱼要尽快取出。死鱼不要更换新的，装载率和储存密度要足够满足使每缸鱼的数量减少不至于产生影响。但是，喂食量要作调整。

2 实验数据和实验结果报告

2.1 实验结果的处理

既然测定设计到很多变量如缸数，检测浓度数，和鱼数等，建议统计员参与测定的设计和分析测定。鉴于测定设计的选择权，统计过程的具体指导不在这里列出。

如果整缸鱼的死亡率超过 10%，那么增长率就不要计算了。但是在所有的测定浓度中都要给出死亡率。

不管用什么方法来分析实验数据，核心概念是时间 t_1 和 t_2 之间的增长率 r 。根据鱼是否是单个称量的和是否要求计算每缸平均值， r 有多种定义方法。

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\overline{\log_e w_2 - \log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

这里

r_1 = 个体鱼的特定生长率

r_2 = 每缸平均特定生长率

r_3 = “假”特定生长率

w_1, w_2 = 特定的鱼在时间 t_1, t_2 时特定的重量。

$\text{Log}_e w_1$ = 在测定开始时单个鱼体重的对数值。

$\text{Log}_e w_2$ = 在测定结束时单个鱼体重的对数值。

$\overline{\text{log}_e w_1}$ = 在测定开始时每缸中的鱼平均体重的对数值

$\overline{\text{log}_e w_2}$ = 在测定结束时每缸中的鱼平均体重的对数值

t_1, t_2 = 测定起止时间 (天)

r_1, r_2, r_3 可以以 28 天为周期来测, (如果 14 天时测了), 就可以按合适的 0 - 14 和 1 - 28 天为周期来测。

2.1.1 实验结果的回归分析 (浓度响应模型)

生长率和浓度之间符合一个适当的数学关系, 从而可以估计 EC_x 也就是说任何要求的 EC 值。用这种方法就不必要给单个鱼求 $r (r_1)$, 分析可以基于整缸鱼 r 的平均值 r_2 。后面这种方法更好。它也更适用于最小种类的鱼。

将每缸的特定生长率 (r_2) 对浓度作图, 来观察浓度响应关系。

为表达在 r_2 和浓度之间的关系, 应该选择一个适当的模型, 而且它的选择一定要有适当的推理支持。

如果在每个容器中存活鱼数是不相等的, 那么适用模型的过程中, 不管是简单还是非线性, 都要容许组的大小的不同。

套用模型的方法必须使 EC_{20} 和它的方差 (不管是标准偏差还是置信区间) 的估算能够推算出。适用的模型的图形轨迹必须表示出与数据相关, 使对模型的适合可以看出来 (8) (18) (19) (20)。

2.1.2 求 LOEC 估计值的实验结果分析

如果测定包括了各个浓度的备份缸, LOEC 的估计可以基于用一种特定方法 (如 Dunnett 或 Williams 的测定 (12)(13)(14)(21)) 对每缸平均特定增长率的方差分析 (ANOVA) (见

2.1), 这种方法是每个浓度的生长速率与对照组比较, 得出产生 0.05 可能性量级上的明显不同的最低浓度。如果参数法要求的设想不能满足 - 非正态分布 (如在 Shapiro-Wilk 的测定中), 或异质性方差, (Bartlett 的测定), 需要考虑在做 ANOVA 前将实验数据转换成同质性方差, 或进行称重的 ANOVA。

如果实验每个浓度不包括多个水槽, 一个建立在水槽上的结论 ANOVA 是不可能、无意义的。在这种情况下, 一个令人接受的折中办法是将 ANOVA 建立在鱼个体 '假的' 具体生长率为 r_3 。

平均每个浓度的 r_3 要和对照实验的 r_3 作对比。如前 LOEC 可以决定一致。可以承认这种方法不宽容, 也不保护, 不同水槽间变化大, 此外再鱼个体之间有变化的理由, 尽管如此, 经验显示, 水槽间变化性比水槽内变化性 (即鱼和鱼个体之间) 小。如果分析中未包括鱼个体, 那要提供外侧鉴别法及其使用理由。

2.2 实验结果说明

实验结果中将对需要在已知的分析方法测量水平范围内的有毒浓度, 或要在半稳态实验中, 何时实验物质的浓度会减少到新制备溶液和将更新溶液之间作出告戒。

2.3 实验结果报告

2.3.1 实验结果报告

实验结果报告必须包括下列信息:

- 物理性质和相关的物理-化学性质;
- 化学鉴别数据, 包括纯度及对合适的实验物质定量分析的方法;

2.3.2 实验种类

- 学名, 可能性;
- 血统, 尺寸, 供给者, 预想等等;

2.3.3 实验条件

- 习惯上的实验步骤 (例如: 半稳态/更新实验, 流通法, 装样, 生殖浓度);
- 实验预想 (如实验容器数量, 实验浓度, 更新的实验每个容器中, 鱼的数量);
- 繁殖溶液的准备方法和更新的频率 (溶质及其浓度在使用时必须给出);
- 标准实验浓度, 测量值, 测量方法和明确的容器及方法上的测量误差, 及使用方法所需的涉及实验物质在真实溶液中浓度的测量方法的证据;
- 溶剂水的性质: pH, 硬度, 碱度, 温度, 水中溶解的氧气的浓度, 残余氯元素的级

别(如已测),所有含碳有机物,悬浮的土壤,实验环境的含盐量和其他可测定的物质;

——容器水的性质:pH,硬度,温度,水中溶解的氧气的浓度;

——饲养的详细信息,(例如:食物种类,来源,所给数量和频率)。

2.3.4 实验结果

——控制有效生存标准,在每个实验浓度发生的死亡率的数据;

——使用的统计分析法,建立在重复实验或鱼身上的统计处理数据的方法及使用此法的理由;

——个体的表格数据和鱼在0、14、28天时的平均含水槽的重量或假定的在0——28天或0——14、15——28天的生长率(如适当);

——更好的表格及LOEC和NOEC或EC_x的表格或图表统计数据的实验结果(及回归分析和ANOVA),可能的时候,找出明显的错误;

——任何鱼不平常的反应迹象和任何由实验物质导致的明显可见的影响。

3. 参考文献:

- (1) Solbe.J.F.de LG(1987).Environmental Effects of Chemicals(CFM 9350 SLD).Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S.,Mallett M.J. and Grandy N.J.(1990).EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O.(1985). A Method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth . Chemosphere ,14, pp 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Hofte B.B.(1991).Effect of 3,4-dichloroaniLine on the Early Life stages of the Zebrafish (*brachdanio rerio*):results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ .Safety, 21 pp 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in Biological fieLd. Medaka (killfish) Biology and strains. Keigaku Publish .Tokio ,Japan
- (6) Holcombe, G.W.,Benoit D.A., Hammermeister, D.E.,Leonard, E.N. and Johnson, R.D.(1995). Acute and Long-term effects of nine chemicals on the Japanese

- medaka(*Oryzias Latipes*).Conta.Toxicol.28, pp 287-297.
- (7) Benoit,D.A.,Holcombe,G.W. and Spehar ,R.L.(1991).Guidelines for conducting Early life toxicity with Japanese medaka (*Oryzias Latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063.U.S. Environmental Protection Agency, Duluth , Minesota.
 - (8) Stephan C.E. and Rogers J.W.(1985).Advantage of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium. ASTM STP 891 ,R C Bahner and D J Hansen,Eds., American Society for Testing and Material,Philadelphia, pp 328-338.
 - (9) Environment Canada(1992). Biological test method: toxicity tests using Early life stages of salmonid fish (rainbow trout ,coho salmon, or atlantic salmon).Conservation and Protection,On tario ,Report EPS 1/RM/28,81 p.
 - (10) Cox D.R.(1958).Planning of experiments. Wiley Edt.
 - (11) Pack S.(1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4,OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology. WRc Medmenham,UK, 10-12 December 1991.
 - (12) Dunnett C.W.(1995). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc 50,pp 1096-1121.
 - (13) Dunnett C.W.(1964). New tables for multiple comparisons with a control .Biometrics, 20, pp 482-491.
 - (14) Willians D.A.(1971).A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27,pp 103-117.
 - (15) Johnston,W.L., Atkinson, J.L.,GlanciLLe N.T.(1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determinnne food intake by individual rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, pp123-133.
 - (16) Quinton, J.C. and Blake, R.W.(1990).The effect to feed cyCling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss*.Journal of Fish Biology,37,33-41.
 - (17) Post , G.(1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish .Chapter 1X in Testbook of Fish Health .T.F.H. Publications,Inc. Neptune City ,New Jersey,USA.288 P.
 - (18) Bruce, R.D. and versteeg D.J. (1992). A statistical procedure foe modeling continuous

toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11,1485-1494

- (19) Degraeve,G.M.,Cooney, J.M.,Pollock,T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O.(1998).Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study . rport EA-6189(American Petroleum Institute Publication,n.4468.Electric power Research Institute, Palp alto ,CA.
- (20) Norbert_King T.J.(1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the Icp approach. Us Environmental Protection Agency.Environmental Research Lab.,Duluth ,Minesota.Tech.Rep.No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center,Sept.1988.12 pp.
- (21) Willams D.A.(1972).The comparison of several dose levels with a zero dose control .Biometrics 28,pp 510-531.

附件 1

实验可接受的鱼的种类和合适的实验条件

Species 实验种类	Recommend Test temperature 可接受的实 验温度	Photoperi od (hour) 光 照 时 间 (小时)	Recommende d Rage for initial fish weight(g) 可 接受的鱼的 开始湿量 (g)	Required Measurem ent Precision 要求测量 精确度	Loading Rate(g/L)装样比 率	Stocki ng Densit y(per Litre) 储 备 密 度 (每 升)	Food 食 物	Test duration (days) 实 验 时 间 (天)
Recommende d Species: 可 接 受的 实 验 种 类								
Oncorhynchus mykiss Rainbow trout 虹 鲑	12.5-16.0	12-16	1-5	To nearest 100 mg 接 近 100mg	1.2-2.0	4	Dry propriet ary salmoni d fry food	≥ 28
Other well documented Species: 其 他 可 接 受 的 实 验 种 类								
Danio rerio	21-25	12-16	0.050-0.100	To nearest	0.2-1.0	5-10	Live	≥ 28

Zabrafish 斑马鱼				1 mg 接近 1mg			food (brachio nus artemia)	
Oryzia Latipes Ricefish (Medaka)	21-25	12-16		To nearest 1 mg 接近 1mg	0.2-1.0		Live food (brachio nus artemia)	≥ 28

附件 2

一些可接受的溶于水的化学物质

SUBSTANCE 物质	CONCENTRATION 浓度
Particulate matter 颗粒状物质	<20mg/L
Total organic carbon 总有机碳	<2mg/L
Unionised ammonia 未离子化的氨	<1 $\mu\text{g} / \text{L}$
Residual chlorine 残余氯元素	<10 $\mu\text{g} / \text{L}$
Total organophosphorus pesticides 全部含磷有机农药	<50ng/L
Total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls 全部含氯有机农药 及多氯联苯	<50ng/L
Total organic chlorine 全部含氯有机物	<25ng/L

附件 3

毒性实验浓度对数表格(9)

纵列 (10 到 100 或 1 到 10 的浓度的数字)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	16	22	27	32
1.0	4.6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	6.3	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

可以选择 5 个浓度为一组。第 x 列的中点可在 2x+1 列找到。列出的值明确的描绘了重量百分含量 (mg/L 或 $\mu\text{g/L}$)。如合适，数值可以乘或除 10。如果对毒性级别无法确定就必须使用第 1 列。

C.15 鱼在胚胎期和幼苗期的短期毒性实验

1. 方法

这个短期的毒性实验是重复 OECD TG 212 (1998) 上的。

1. 1 引言

这个鱼在胚胎期和幼苗期的短期毒性实验是一个将生命从受精卵到幼苗期这段时间暴露在危险中的短期实验。在胚胎期和幼苗期没有饲料提供，而实验将这样终止，但是幼苗仍将从卵囊中继续培养。

本实验打算划定在测定的特殊时期和种类中足以致死的和非致死的化学物质。这个实验将提供许多有用的信息包括：a、是一座架在致死和非致死间的桥梁；b、可以作为一个对不完全初期生物时期或慢性毒物的审查性实验；c、对在某处耕作技术还未充分发展到可以包括内部生长到内部饲养改变时期的物种做测定。

可能认为只有混合鱼生命循环中所有周期的实验才可能对慢性毒物对鱼的影响作出一个准确的评估，而且那些在生命各时期方面减少的暴光度可能会减少敏感度而因此低估了慢性毒物。为此预计胚胎期和幼苗期实验特别是在一些高亲脂性化合物及有特殊毒性效果的化学物质方面不如全程生命实验敏感。尽管如此，可能在 2 个实验中有一些不特殊的有麻醉效果的物质在敏感性上有更微小的差异 (1)。

在发表这个实验之前，这种胚胎-幼苗期实验的经验多以一种叫 *Danio rerio* 的淡水鱼（硬骨鱼，鲤科，普通名称斑马鱼）。更多关于这个系列的实验演示的详细指导在附件 1 中给出。这个并未避开使用其他可用的经验（表格 1）。

1. 2 定义

最低观测影响浓度(LOEC):是一种被观测物质在对比于对照实验有明显影响(当 $p < 0.05$) 的情况下在测定的最低浓度。

无观测影响浓度 (NOEC): 是实验浓度中低于 LOEC 的浓度。

1. 3 实验原理

胚胎和幼苗期的鱼被暴露在一系列不同浓度的溶有实验物质的水中。在草案中，可能要在半稳态实验和流动法实验中做出一个选择。而这个选择取决于实验物质的性质。这个实验始于将受精卵放入实验扩展槽中而终于在任一实验扩展槽中的卵黄被幼虫全部同化之前或饥饿死亡率超出对照之前。将致死和非致死影响与对照实验对比、评估，并测出 LOEC 和 NOEC。相互地，也可以用回归分析来估计浓度而导致的百分比影响(即 $1LC/Ex$ ，

这里 x 定义为影响百分比)。

1.4 实验物质信息

一个精确的毒性实验结果能更好的显示出对实验的选择，是可利用的。这个实验结果可以用在选择早期生命实验中可处理的实验浓度范围。还要知道实验物质在水中的溶解性（包括在实验用水中的溶解性）和实验物质的饱和蒸汽压。在一个已知的、精确实验结果报告并且限量探测的实验方案中一个可靠的物质定量分析方法是有效的。

结构公式，物质的纯度，在水中和光照下的稳定性， P_{ka} ， P_{ow} 以及预备生物降解的结果都是有用的信息。

1.5 实验的有效性

对一个有效的实验，应当遵循以下几点：

所有对照实验中相关的继续存活的受精卵及相关在仅溶的容器中的量不少于附件 2、3 中所定义的限制；

在整个实验中溶解的氧气浓度必须在空气饱和含量的 60%~100%之间；

在实验扩展槽或整个实验中任何连续几天时间水温变化不超过 \pm ，并且在一系列实验中指定的温度范围内（附件 2、3）。

1.6 实验方法描述

1.6.1 实验扩展槽

可以使用任何玻璃或其他任何化学惰性容器。容器的尺寸应大至足够允许满足投放比率（见章节 1.7.1.2）。要求实验扩展槽在实验地区的某一随机位置。当存在实验室系统误差时，一个对每个分步骤处理方式的分步骤预想对完全随机方案是有好处的，并能够进行适当控制。分步骤，如使用，要注意随后的数据处理，而实验扩展槽要小心防备以外干扰。

1.6.2 鱼品种的选择

可接受的鱼的品种在表格 1A 中已给出。这里不能避免使用其他种类（例如：在表格 1B 中所列出的），但实验步骤上可能不得不提供更好的实验条件来适应实验步骤。在这种条件下实验结果报告出了选择的基本原则和实验方法。

1.6.3 养殖鱼种类的选择

关于养殖鱼种类的细节可在 OECD TG 210 和参考文献 (2) (3) (4) (5) (6) 中找到。

1.6.4 胚胎和幼苗的处理

在主容器中，胚胎和幼苗是暴露在外的，在小点的容器中侧面和底部安装网使得容器里允许实验的水流动。那些计划好的悬浮在臂状物上的小容器使得容器上下摇动会产生不狂暴的水流流过小容器，但总能保持有机体浸没在水中。在使用一个虹吸系统。鲑鱼的受精卵被放在有足够幼鱼孵化后离开的孔的网或架子上。巴斯德移液管的用处是适当地将胚胎和幼苗移到半稳态实验中并每日都重复（见章节 1.6.6）。

在大容器中放有卵的格子或网是卵的容器。这些限制可以在幼苗孵化后移除，但要保留一些以阻止鱼逃跑。如果有需要迁移幼苗，它们就不能暴露在空气中且网不应用来将鱼从卵容器中放出来（对于一些易碎种类如鲤鱼，这个警告不必要）。

对于这个迁移而安排的时间随种类而改变而且迁移并不一定是必要的。对半稳态技术，如必要也可使用烧杯或浅底容器，并在其底部上方装一个纱网且比烧杯底略微提高一点。如果这组容器足够满足装样要求，那迁移胚胎和幼苗是没必要的。

1.6.5 水

类似列在附件 4 的符合可接受的稀释物的化学性质的任何水和那些在附件 2、3 中描述的可以且可能好的展示实验效果的水都是合适的实验用水。在整个实验过程中水的性质要不变。而 pH 则只能在 ± 0.5 单位内波动。为保证稀释水不会不正当地影响实验实验结果（例如与实验物质生成配位化合物），或反之影响繁殖用的卵的演示。在不同区间取样进行分析。重金属（如 Cu、Pb、Zn、Hg、Cl、Ni）主要的阴离子、阳离子（如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} ）农药（如全部含磷、含氮的有机物）全部含碳有机物和悬浮的土壤的含量都要准备好。例如每 3 个月测定一次以保证稀释水的性质是不变的。如能证明水质至少一年保持不变，测定可以不必太频繁，周期可长一些（如每 6 个月一次）。

1.6.6 实验溶液

选择浓度的实验方法是由繁殖溶液的稀释来决定的。单纯地通过机械方式（如搅拌机和超声波）简单的混合或摇动实验物质可以更好地为繁殖溶液做准备。饱和柱（溶解柱）可用来完成一个浓缩的繁殖溶液。尽可能地避免使用溶剂或分散剂（溶解药剂）。尽管如此，在一些情况下也可用该类物质制备适合繁殖的合适浓度的储备液，的例如丙酮、乙醇、甲醇、DMF、和三甘醇二甲醚都是较好的溶剂。而 cremophor RH40、Tween 80、0.01% 甲基纤维素和 HCO40 是较好的分散剂。当使用易为生物分解的药剂（如丙酮）和那些在流通实验中因易挥发而导致细菌组合出问题的药剂时要特别注意。当使用一种溶解剂的

时候，它绝对不能对鱼的生存构成威胁或产生在早期生命时期可观测到的不利影响。尽管如此，在使用类似材料时尽可能避免产生任何影响。

对半稳态技术，要进行 2 个不同的重复步骤(i)要么为新的实验准备干净的容器并在不接触空气条件下将生存的卵和幼苗从原来的旧溶剂中迁移到新容器；(ii)要么将有机体保持在容器中同时换一定比例（不少于 3/4）的实验用水。更新的频率取决于实验物质的稳定性但每天换水是必要的。如果通过初步稳定性实验发现实验物质浓度再更新期间不能稳定（即：超出标准浓度 80%~120%的范围或低于 80%），则考虑使用流通法进行实验。无论如何，在水更新操作要小心，以免压迫幼苗。

对流通性实验，需要一个能持续分配、稀释繁殖溶液的系统（如测量泵，比例稀释器，饱和系统）来制备一系列浓度的展开槽。繁殖溶液和稀释水的流速要在每日不同时间段控制并且在全部实验中变化不超过 10%。一个合适的流速要求在 24 小时中流过至少 5 个实验展开槽（2）。

1.7 测定步骤

鱼在胚胎期和幼苗期的短期毒性实验演示中的有效信息在文献中可查得。一些例子可在文献（7）（8）（9）中查得。

1.7.1 暴露条件

1.7.1.1 持续时间

这个实验最好在卵受精后 30 分钟内开始。在胚盘分裂初期或胚囊初期前后将胚胎浸入实验溶液。对于大量获得的卵不可能在受精后立刻开始实验。推迟实验会严重影响实验的敏感度。这个实验应在受精后 8 小时开始。在暴露期幼苗禁止喂食。实验终止于任一幼虫将卵黄完全吸收光为止或饿死率超出对照之前。持续的时间长短取决于使用的材料种类。在附件 2、3 中给出了可接受的持续时间。

1.7.1.2 装样

在实验开始前受精卵的数量应当足以达到统计要求。它们应随机分布在整个系统中。并且 30 个受精卵，平均分配到至少 3 个同样的实验扩展槽中，应当使用在每一浓度而装样比率（每份实验溶液的生物量）应当足够低到可以溶解的氧气浓度在通风环境下至少保持占 60%ASV（美国标准）。对流通法来说，装样比率不超过 24 小时 0.5g/L，而且要求无论何时对溶液说不超过 5g/L。

1.7.1.3 光照和温度

光照时间和实验水温要适合所实验的种类(附件 2、3),使用温控仪的目的是,它可以在附加实验容器上使用。

1.7.2 实验浓度

一般地,要求 5 组实验物质浓度间隔恒定在不超过 3.2。在选择实验浓度的范围时,要考虑相关的 LC_{50} 对光照时间的曲线。在一些条件下,少于 5 个浓度如一些限制实验或一个更狭小的浓度区间的用处是适当的。如果少于 5 个浓度,则需提供理由。物质浓度要高于 96 小时 LC_{50} 或 100mg/L,低于任何一个则无须测定。在测定中水中物质高于它们溶解度则不予实验。

当使用一种溶剂(或分散剂)(见章节 1.6.6)时,它的最终浓度不应该高于 0.1mg/L 并且应在所在实验容器中保持一致。

1.7.3 对照实验

稀释水的对照实验(适当浓度)和如有关的溶剂含量(尽量重复)的对照实验应当在除实验进程之外时进行。

1.7.4 化学分析中测定和测量的频率

在整个实验过程中,实验物质的浓度是由规定的区间来决定的。

在半稳态实验中,希望实验物质的浓度浮动在标准范围 $\pm 20\%$ 上下(即:在 80%~120%范围内;见章节 1.4 和 1.6)。最低限度要求在新准备的和即将更新时的最高和最低实验浓度要在至少 3 个不同分开的场合进行分析(即:再更新准备和在更新时,要对相同溶液的试样进行分析)。对于那些实验物质浓度无法预计是否在正常范围内 $\pm 20\%$ (在实验物质稳定的基础上),就必须在新准备的和即将更新时的最高和最低实验浓度进行分析,但要保证同一种方法(即:整个实验至少平等的在 3 个平分的区间)。更新开始时实验物质浓度的测量需要在重复的容器内每次测量浓度。测量在分开的 7 天内进行。要求实验结果建立在精确的浓度上。尽管如此,如果有适当证据证明,溶液内实验物质浓度很好的稳定在标准的或实验全程初浓度的 20%,那实验结果也可以在标准或精确的初始值上得出。

对流通性实验,对半稳态实验所描述的类似采样方式是合适的(但这种情况下“旧的”溶液的测量方法是不适用的)。尽管如此,如果实验持续时间大于 7 天,在第一周增加采样场合的数量(如每 3 组)来保证实验浓度稳定是适当的。

样品要被离心或过滤(如用孔径 0.45 μm)。尽管如此,然而无论离心还是过滤都不能将

实验物质中非生物适用部分分开，样品也不必受这些条件约束。

在整个实验中，溶解的氧气，pH，温度要在所在容器中精确测量，对照实验中的温度和最高浓度的容器中总硬度和盐浓度也要精确测量。至少，溶解的氧气和盐浓度要测量 3 次（开始，中间，结束）。在半稳态实验中，溶解的氧气要更精确的测量，最好在每次更新水前后或至少 1 周 1 次。硬度则每次实验测一次。温度应天天测量且最好在至少 1 个实验容器中继续控制。

1.7.5 观测

1.7.5.1 胚胎生长期

尽可能证明胚胎期（如胚囊期）在开始就暴露在实验物质中。这样做是为了更好的保养好卵样品。而幼生期的例子及描述的文献可在文献（2）、（5）、（10）、（11）查找到。

1.7.5.2 孵化和继续生存

孵化和继续生存的观测每天至少记录一次，而在实验初期（在前 3 个小时则每 30 分钟）提高观察频率是可取的，而在一些情况下幸存时间比死亡数目更有意义（如：有剧烈毒性影响时）。死去的胚胎和幼苗一旦腐烂就要迅速移除。在移除死亡个体时要千万小心，别碰到附近的卵和幼苗或对其造成物理损伤，死亡标准依不同生命阶段而改变：

——对卵：特别是早期，早期的半透明着色的明显损失和改变，由蛋白质凝固或沉淀导致的白色浑浊（不透光）物。

——对胚胎：身体移动的终止和心跳消失，及半透明胚胎上有不透光的一系列污点出现

——对幼苗：静止不动或呼吸消失，心跳停止或中央神经系统有白色不透光污点出现或缺乏对机械刺激的反应。

1.7.5.3 异常迹象

大量幼鱼在身体上的色素沉着反常，而卵黄吸收期有足够的取决于实验持续时间和描述的反常现象的性质所取得区间被记录下来。应当对那些自然出现的反常的胚胎和幼苗小心观察，也应记下对照实验中那些规则的百分比次序。反常的动物死后应从容器中移除。

1.7.5.4 反常行为

在由实验持续时间所决定的足够区间中，那些反常，如换气过度、不协调的游动和不正常的休眠要记录下来。这些影响，尽管数量不同，在观察时可以增加致死数据的说明即提供了实验物质的毒性反应信息。

1.7.5.5 长度

在实验结束，要测量每个个体长度。标准长、股长或全长均可。如果尾鳍腐烂或鳍上有腐蚀，可使用标准长度。一般地，在一个运行良好的实验中，重复对照实验时长度的系数变化应小于 20%。

1.7.5.6 重量

在实验结束，要测量每个个体重量。干重（在 60 °C 下 24 小时）比湿重好。一般地，在一个运行良好的实验中，重复对照实验时重量的系数变化应小于 20%。

以下这些项目将在一些或全部用来作统计分析：

- 累积死亡率；
- 实验结束后健康幼苗数；
- 开始孵化和孵化结束的时间（即：在每个重复实验中有 90% 孵化）；
- 每天孵化幼苗数；
- 实验残存者的长度（和重量）；
- 畸形或反常现象的幼苗数量；
- 展示出反常行为的幼苗数量。

2. 数据和实验结果报告

2.1 实验结果处理

因方法要求考虑实验方法的改变如实验扩展槽的数量、浓度的数量、受精卵的数量和参数的测定，所以要求一位统计员既计划实验又分析实验。由于方案中一些适当的选择，特定的关于统计步骤的指导这里不再给出。

如果 LOEC/NOEC 会被预估，那对于每组重复实验采用不同的分析方法或偶尔的表格法来变化的进行分析是必要的。为了对个体浓度和对照实验的实验结果做倍数比较，可以使用 Dunnett 的方法（12）（13）。其他例子也是合适的（14）（15）。

使用 ANOVA 的可观察影响的大小或其它步骤（即实验的能力）应当被预测好并实验结果报告。要注意不足所有在章节 1.7.5.6 中列出的观察项目适合用 ANOVA 做统计分析。

例如实验结束时累积致死率和健康幼苗数量要用概率法分析。

如果 LC/E_{cx} 被预先估测。合适的曲线，如类似的计算曲线，适合于使用统计方法如最小二乘法或非线性最小二乘法的数据。可以确定曲线参数以明确 LC/E_{cx} 并且可以直接指出它的明显错误。而这可以非常容易计算出 LC/E_{cx} 周围的置信限。除非有更好的选择不同置信水平的的原因，应引用双侧置信 95%。适当的步骤能更好的提供一个评估缺乏拟合的

重要性，可以使用适当曲线的图解法。回归分析对章节 1.7.5.6 所有观察物均使用。

2.2 实验结果说明

实验结果说明要告诉在实验溶剂中以分析方法的水平限制下的测量的毒物浓度。对在溶解物质的水的上方的浓度实验结果报告说明也要详细给出。

2.3 实验结果报告

实验结果报告必须包括下列信息：

2.3.1 实验物质

——物理性质和相关的物理-化学性质；

——化学鉴别数据，包括纯度及对合适的实验物质定量分析的方法；

2.3.2 实验种类

——学名，血统，亲代鱼类的数目（即实验中有多少母鱼用来提供所要求的卵），来源，受精卵的收集和随后的利用。

2.3.3 实验条件

——习惯上的实验步骤（例如：半稳态实验，流通法，受精到实验的时间段，装样等等）；

——实验方案（例如：实验扩展槽的数目，重复次数，每次重复胚胎数）；

——繁殖溶液的准备方法和更新的频率（溶质及其浓度在使用时必须给出）；

——标准实验浓度，测量值，测量方法和明确的容器及方法上的测量误差，如果实验物质溶解在水中的浓度小于已测的，要提供涉及到测量实验浓度的测量方法。

——溶剂水的性质：pH，硬度，碱度，温度，水中溶解的氧气的浓度，残余氯元素的级别（如已测），所有含碳有机物，悬浮的土壤，实验环境的含盐量和其他可测定的物质；

——容器水的性质：pH，硬度，温度，水中溶解的氧气的浓度；

2.3.4 实验结果

——从实验物质稳定性初步得到的实验结果

——所有可接受的可对照的标准的实验鱼种证明（附件 2、3）；

——每日胚胎和幼虫死亡率/幸存者和全部的死亡率/生还率数据；

——孵化天数和孵化数目的数据；

——重量和长度的数据；

——畸形发生率及其描述；

——统计分析和数据处理；

- 对使用 ANOVA 分析的实验，对每个预估反应在 $p=0.05$ 时的 LOEC 和 NOEC，包括使用的统计步骤的描述和那些初查出影响的程度的迹象；
- 对用回归分析的实验， LC/E_{0x} 和置信区间和适合计算的曲线模型。

3. 参考文献：

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-001, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. and Jones B.R.(1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1997) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosadner B. and Viktor T.(1987). Ring test of an Embryo-Larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp61-71.
- (8) Birge J.E., Black J. A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-Larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., EspeLdoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.

- (10)Kirchen R.V. and W.R. West (1969).Teleostean Development. Carolina Tips 32(4):1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11)Kirchen R.V. and W.R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company. North Carolina. 36 pp.
- (12)Dunnnett C.W.(1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatment with Control. J. Amer .Statist. Assoc., 50,pp 1096-1121.
- (13)Dunnnett C.W.(1964). New Tables for MultipLe Comparisons with a Control . Biometrics, 20,482-491.
- (14)Mc Clave J.T. ,Sullivan J.H. and Pearson J.G.(1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data.Proceedings of 4thAquatic Toxicity Symposium,ASTM,PhiladelpHia.
- (15)Van Leeuwen C.J. , Adema D.M.M. and Hermes J.(1990).Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity . . Aquatic Toxicology,16, pp 321-334.
- (16)Environment Canada.(1992).Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish(Rainbow Trout ,Coho SaLmon or AtLantic SaLmon).Biological Test Mehtod Series.Report EPS 1/RM/28,December 1992, pp 81.
- (17)Dave G. and Xiu R.(1991).Toxicity of Mercury ,Nickel ,Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish , *brachydanio rereio*, Arch of Environmental Contamination and Toxicology ,21,126-134.
- (18)Meyer A., Bierman C.H. and Orti G.(1993).The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*) , a model system in developmental Biology – an invitation to the comperative methods. Proc.Royal Society of London,Series B ,252:231-236.
- (19)GhiLLebaert F., ChaiLLou C.,Deschamps F. and Roubaud P. (1995).Toxic Effects , at three pH Levels,of Two Rference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental.Safety 32,19-28.
- (20)US EPA,(1991).Guidelines for CuLturing the Japanese Medaka,*Oryzias Latipes*.EPA report EPA/600/3-9-064,Dec.1991,EPA,Duluth.
- (21)US EPA,(1991).Guidelines for Conducting Early Life Stagee toxicity Tests with Japanese Medaka,(*Oryzias Latipes*)EPA report EPA/600/3-9-063,Dec.1991,EPA ,Duluth.
- (22)De Graeve G.M. , Cooney J.D., McIntyre D.O.,Poccocic T.L., reichenbach N.G, Dean J.H. and Marcus M.D.(1991)VaLidity in the performance of the seven-day Fathead minnow

- (*Pimephales promelas*) Larval and growth test :an in- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10,1189-1203.
- (23) Calow P.(1993).handbook of Ecotoxicology , Blackwells ,Oxford.Vol. 1 ,chapter 10:Methods for spawning ,culturing and conducting toxicity tests with Early Life Stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E.K.(1985).Early Life history fishes :New developmental ,ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Fordrecht 280pp.
- (25) Blaxter J.H.S.(1998).Pattern and variety in development ,in :W.S. Hoar and D.J.Randall Eds., Fish Physiology,vol.XIA,Academic press pp1-58.

表格 1A

实验可接受的鱼的种类

淡水鱼类
Oncorhynchus mykiss Rainbow trout(9)(16) 虹鲑
Danio rerio Zebrafish(7)(17)(18) 斑马鱼
Cyprinus caprio Common carp(8)(19) 鲤鱼
Oryzias Latipes Japanese ricefish/medaka(20)(21)
PimepHaLes promeLas Fathead minnow(8)(22)

表格 1B
一些其它文献曾用过的种类

淡水	咸水
<i>Carassius auratus</i> 金鱼	<i>Menidia peninsuLae</i> 潮水 最好的牛腿肉 (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> 浅蓝色食用大太阳鱼	<i>CLupea harengus</i> 鲱鱼 (24) (25)
	<i>Gadus morhua</i> 鳕 (24) (25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> 红鲈 鲤科小鱼 (23)(24)(25)

附件 1

在一个毒性测定对胚胎及 SACFRY 的表现方面的指导

引言

斑马鱼起源于印度 Coromandel 海岸高速流动的河流中。它是鲤鱼家族一类通常的水族馆鱼，有关它培育和照料方式的信息能在热带鱼的权威参考书中查到。LaaLe曾研究过它在渔场研究方面的理论和应用（1）。

鱼体长度很少超过 45 毫米。鱼体是圆柱形并带有7到9条深蓝色的斑纹，与银色相间，这些斑纹延伸到尾部至尾鳍处。背部是橄榄绿色。雄性较雌性个体为小。而雌性更带银色的，且腹部更大，显然这有利于产卵。

成鱼能够忍受温度，pH 和水硬度的较大变动。然而，为了使鱼体健康而产出高质量的卵，应提供最佳的生存条件。

在发情期间雄鱼四处找寻雌鱼然后以头对着雌鱼，这样当卵产下后便已受精。卵是透明的，且彼此是相互独立的，当它们沉到底部时就有可能被父母吃掉。产卵受阳光影响。如果早晨阳光足够的话，雌鱼通常会在黎明之后的几小时就产卵。

每只雌鱼一次可产下几百粒卵，每两次产卵间隔一个星期。

亲代鱼的情况,繁殖及早期发育阶段

选择适当数量健康的鱼，然后让这些鱼在条件适宜的水中(例：附4)生活，要求在预计的产卵期前必须生活至少2周以上。这批鱼在本次研究以前必须至少产过一次卵。鱼群的密度在此期间不得超过1克每升。在有规律的换水或是水体净化可以允许种群密度高一点。培养箱的温度应该维持在 25 ± 2 ，并提供各种各样的鱼食，例如，适当的商品性干食物，或是新鲜的 hatched *Artemia*, chironomids(摇蚊),*Daphnia* (水蚤)，白色蚯蚓(Enchytraeids)。

两个过程在下面有所描述，这导致有一批健康的受精卵以保证测定：

8条雌鱼和16条雄鱼同放在一个包含50升已稀释培养液的桶里，避免受阳光直射且尽可能不受打扰的保持至少48个小时。在开始测定的前一天下午把一个产卵托盘放在鱼缸的底部。这个产卵托盘由plexi-glass(聚异丁烯酸树脂)或其它合适的材料组成一个框架，5到7cm高，一个2到5mm的粗糙的网连到顶部，同时一个10到30微米的网在底部。大量由解开的尼龙绳组成的产卵树附在那个粗糙的网上。当鱼已被留在黑暗中12个小时之后，一束微弱的光线就会导致开始产卵。产卵后二到四个小时，移开产卵托盘并收集产的卵。产卵

托盘作用在于可以防止父母吃掉卵同时使收集这些卵变得容易。这些产卵的鱼在用于本次实验前必须至少已产过一次卵。

在预产期前至少两周把 5 到 10 条雄鱼和雌鱼隔离放置。5 到 10 天后，雌鱼的腹部变大而且可以看到它们的生殖器乳头。雄鱼则没有乳头。产卵就在这个底部装有伪装网（如上所说）的产卵缸内进行。这个产卵缸装满了作为溶剂的水，因此在底部网以上的水深为 5 到 10cm 在预产期前一天把一条雌鱼和两条雄鱼放在缸里面，控制水温在最适合温度再高一度。屏蔽所有的光线并把缸放在尽量不受打扰的地方。早上的一丝光线就会诱发产卵。2 到 4 小时后，移开鱼并收集卵。如果卵的需求量很大，一条雌鱼产的不够多的话，就应该同时培养几个产卵缸。通过记录这些优于测定（数量和质量）的成功产卵经历，这些有着高产卵成功率的雌鱼就会被挑选出来饲养。

这些卵会被转移到一个由玻璃管（内径不小于4mm）组成的测定容器里，并提供一个柔和的抽气球。在测定容器内的水要尽可能的少。卵密度比水的大因此会下沉而落出管子，此时要小心注意不让卵（以及幼虫）接触空气。

在这些卵中作抽样微型试验来保证在这第一个发育的阶段里面所有卵都是一样好的。对这些卵不准消毒。

在受精后的24小时里卵的死亡率是最高的，一般会达到5%到40%。如果卵腐败就代表受精或发育失败。一批卵的质量看起来似乎是由雌鱼决定的，因为一些雌鱼总是产下高质量的卵，而另一些却相反。同样发育率和孵化率也是因雌鱼不同而异。成功的受精卵以及卵黄囊幼虫发育得好，一般可达到90%。在25摄氏度时受精卵会孵化3到5天然后卵黄囊会在受精后的约13天里被吸收。

Hisaoka 和 BattLe (2) 曾对胚胎的发育作过详细的定义。从卵和发育幼虫的透明度可以看出哪些会发育成为鱼以及哪些会发育为畸形。大约在产卵后4小时，未受精的卵就可以从受精卵中区别出来(3)。因为这个原因，卵和幼虫会被放置到一个小容量的测定器皿里面，这样就可以用显微镜来观察。早期发育阶段的试验条件，在附录2里列出。

理想的试验环境的pH值和水硬度分别是7.8和250 mg CaCO₃/L。

计算和统计

建议分两步进行。第一，死亡率，畸形发育和孵化时间应被统计分析。然后，在那些对上述统计项没有任何影响的浓度上，鱼体的平均长度可以通过统计求出。

这个步骤是可取的，因为毒素可以有选择性的杀死小鱼，延迟孵化时间并使畸形鱼量增

大，因此导致平均鱼体长度的测量值偏差。此外，每次测量的鱼数目相同，这样也保证了统计数值的有效性。

LC50 及 EC50 定义

平安生存下来卵和幼虫的百分比和修正后的死亡率符合 Abbott 公式(4)：

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

其中

P = 修正后的存活率

P' = 试验中集中观察到的存活率

C = 控制下的存活率

如果可能的话，在试验结束的时候LC50 已被一个适当的方法决定。

如果在EC50 的统计中试验的畸形率与期望值差不多，可在StepHan(5)中得到指导。

LOEC 和 NOEC估计

一个客观的卵和 sac-fry试验是为了与受控的非零集中相比较，即决定了LOEC.因此多方面的比较方式应被采用。

参考文献

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydaniorerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.
- (5) StepHan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.

- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 27, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics* 28, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

附件 2

试验条件，持续试验时间以及测定环境条件的推荐值

规格	温度 (摄氏 度)	盐 份 (0/ 00)	图片 段 (hrs)	阶段		试验典型 持续时间	受控下幸 存 (最小百 分比)	
				胚胎	幼体		孵 化	发 育
淡水								
<i>Brachydanio rerio</i> (斑马鱼)	25±1	-	12-16	3-5	8-10	受精后尽 快(早期胚 囊)5天到发 育期(8-10 天)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 彩虹鲑鱼	10±1 ⁽¹⁾ 12±1 ⁽²⁾	-	0 ^(a)	30- 35	25- 30	受精后尽 快(早期胚 囊)20天到 发育期 (50-55天)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> 普通鲤鱼	21-25	-	12-16	5	>4	受精后尽 快(早期胚 囊)4天到发 育期(8-9 天)	80	75
<i>Oryzias Latipes</i> 日本鳉	24±1 ⁽¹⁾ 23±1 ⁽²⁾	-	12-16	8-11	4-8	受精后尽 快(早期胚 囊)5天到发 育期(13-16 天)	80	80

<i>PimepHaLes</i> <i>promelas</i> 笨鲮鱼	25 ± 2	-	16	4-5	5	受精后尽快(早期胚胎)4天到发育期(8-9天)	60	70
---	--------	---	----	-----	---	-------------------------	----	----

⁽¹⁾ 胚胎

⁽²⁾ 幼虫

^(a) 孵化一周后保持胚胎和幼虫的黑暗环境除非它们已被检查过。然后再在温和的光线下完成试验。

附表 3

试验条件，持续时间和其它有记录的成功存活下来的样本

规格	温度 (摄氏 度)	盐份 (0/0 0)	图片 段 (hrs)	阶段(天)		典型胚胎 和幼体持 续时间	受控下幸 存 (最小百 分比)	
				胚胎	幼体		孵 化	发 育
淡水								
<i>Carassius auratus</i> 金鱼	24 ± 1	-	-	3-4	>4	受精后尽 快(早期胚 囊)4天到发 育期(7天)	-	80
<i>Leopomis macrochirus</i> <i>Blugill</i> 翻车 鱼	21 ± 1	-	16	3	>4	受精后尽 快(早期胚 囊)4天到发 育期(7天)	-	75
咸水								
<i>Menidia peninsuLae</i> Tidewater silverside	22-25	15-22	12	1.5	10	受精后尽 快(早期胚 囊)5天到发 育期(6-7 天)	80	60
<i>Clupea harengus</i> 鲱鱼	10 ± 1	8-15	12	20-2 5	3-5	受精后尽 快(早期胚 囊)3天到发 育期(23-27	60	80

						天)		
<i>Gadus morhua</i> 鳕	5 ± 1	5-30	12	14-1 6	3-5	受精后尽快(早期胚囊)3天到发育期(18天)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> 红鲈 鲮	25 ± 1	15-30	12	-	-	受精后尽快(早期胚囊)4/7天到发育期(28天)	>75	80

附件 4

一些可接受的已稀释的水的化学特征

物质	浓度
微粒	<20 mg/L
有机物总量	<2 mg/L
未电离的氨	<1 μg/L <10 μg/L
残留氯	<50 ng/L
有机磷杀虫剂	<50 ng/L

有机氯杀虫剂及多氯化联苯	<25 ng/L
有机氯总量	

C.16 蜜蜂 - 敏锐的口头毒性测定

1. 方法

这个敏锐的毒性测定方法是OECD TG 213 (1998)的一个复制。

1.1. 引言

该毒性测定方法是一个实验室方法,设计用来评定成年工蜂对于植物自卫物质和其它化学物质的口头敏感性。

在这个对于有毒物质的估计中,要求工蜂具有口头毒性敏感性,就像当工蜂暴露在一种给定的化学物质中一样。这个口头毒性敏感性测定是用来测定杀虫剂自身和其它化学物质对工蜂的毒性。实验结果应被用来阐述进一步研究所需要的条件。特别的,这个方法可作为估计杀虫剂对蜜蜂的危害中的一步,基于连续的实验室内对半野生或野生蜜蜂的毒性测定。杀虫剂可作为有效物质或规划生产品来测定。

应该用统一的中毒标准来指明蜜蜂的敏感性和试验过程的精确性。

1.2. 定义

口头敏感性:一剂测定物质在最大96小时内的负面作用。

剂量:一次测定物质的剂量。剂量用测定物质的质量(微克)与测定动物的质量(蜜蜂质量/微克)之比来表示。真正的每只蜜蜂的剂量并不能用集中喂养的剂量来计算,但是还是可以用平均剂量来估计的(测定物质的消耗总量/一箱蜜蜂的数量)。

LD₅₀ (平均致死量) 口服:来源于口服能导致50%蜜蜂死亡的统计剂量。LD₅₀用测定物质的质量(微克)/蜜蜂数量来表示。对杀虫剂来说,测定物质可能既不是有效物质(a.s.)也不是明确包含一种或多种有效物质的产品。

死亡率:当这只动物完全不动的时候就记录下来认为其已死亡。

1.3. 测定方法原理

成年工蜂(产蜜的蜜蜂)暴露在溶解有大量测定物质的蔗糖溶液里面。然后喂这些工蜂同样的含有充分的测定物质的食物。在48小时内每天记录死亡率然后与参考值相比较。如果在24到48小时内死亡率增加,同时参考死亡率保持在一个可接受的位置,即 $\leq 10\%$,可适当延长测定时间到最多96小时。

分析试验实验结果用来计算24小时和48小时内的LD₅₀,如果延长时间,就是72小时和96小时内的LD₅₀。

1.4. 测定的有效性

如果一个测定是有效的，那么它必须拥有以下两个条件：

- 在测定最后受控下的所有蜜蜂的平均死亡率不得超过10%。
- 中毒的LD₅₀须详细说明。

1.5. 测定方法描述

1.5.1. 蜜蜂的收集

应使用同一群的幼小工蜂，同样的年龄，同样的状况，等等。应收集喂食充分的，健康的，最好未生过病的，蜂后的历史和生理状况都是已知的。应在早上使用的时候收集或是测定前的傍晚收集然后保持测定环境到第二天。同一窝中收集的未孵化的也可以。早春和晚秋时不应收集，因为此时蜜蜂处于生理改变时期。如果必须要在早春和晚秋进行测定的话，可以把蜜蜂放置于培养箱里面，用“蜜蜂面包”（刮下来的花粉）和蔗糖溶液喂养。蜜蜂用化学物质处理，如抗生素，抗varroa制品，等等，在最后一次处理后的至少四周后才可以用作毒性测定。

1.5.2. 安置和喂养条件

使用易于清洁和通风条件良好的笼子。可以使用任何合适的材料，比如不锈钢，金属网，塑料或一次性的木质笼子等等。最好每组十只蜜蜂装一个笼子。笼子大小应与蜜蜂数量相应，即提供足够的空间。

实验室温度保持在 25 ± 2 ，蜜蜂笼子要求黑暗。相应湿度一般应保持在50-70%，试验过程中应一直记录。处理过程，包括管理和记录可在有光的地方进行。500g/L的蔗糖溶液作为蜜蜂的食物。在喂过一剂量之后，食物中应添加ad Libitum。喂食系统应记录每个笼子的每次食物入口（见1.6.3.1）。可用一根玻璃管（大约50mm长10mm宽，但入口处直径不超过2mm）喂食。

1.5.3 蜜蜂准备

收集来的蜜蜂随机分配在各个测定笼里面，测定笼也是随机分配在整个实验室里面。在开始测定前2小时蜜蜂可能会饿死。因此推荐优先用缺少食物的蜜蜂做实验，这样可以使得实验开始时所有蜜蜂肠内的容量差不多。

1.5.4. 剂量准备

测定物质是一个混合溶液，因此直接稀释在50%的蔗糖溶液里面。因为专业产品和物质是低水溶性的，因此可使用对蜜蜂低毒性的有机溶剂，乳化剂和分散剂（比如丙酮，N-N-二甲基甲酰胺，二甲基亚砷）。测定物质浓度由它的溶解性决定，而且所有的测定浓度

要一致。不过，1%的浓度一般是合适的，而且不能低于这个浓度。

准备一个合适的对照浓度，当使用有机溶剂或是分散剂来溶解测定物质的时候，应分别使用下面两种受控溶液：一个水溶液，一个与测定溶液同浓度的蔗糖溶液。

1.6. 测定步骤

1.6.1. 测定和对照溶液

剂量和重复试验的次数要与统计学的要求一致，LD₅₀就是至少95%的可信度。一般的，几何级数上的5份剂量，事实上不能超过2.2，本实验要求盖住LD₅₀的边缘。不过，稀释物和剂量的浓度应被控制与毒性曲线（剂量对死亡率）的斜率一致，同时用来分析的实验结果应与统计方法一致。

至少三个同样的测定组，每组十只蜜蜂，应喂之以每个测定浓度的溶液。另一至少三个同样的测定组，每组十只蜜蜂，用于额外测定。对照组同样应被用于溶剂/载体使用（见1.5.4）。

1.6.2. 中毒标准

在测定过程中应统一中毒标准。至少三份剂量应选来代替LD₅₀的期望值。至少三组同样的试验笼，每次装有十只蜜蜂，用于每次测定剂量。更好的中毒标准是乐果（一种有机磷杀虫剂），文献值是口服LD₅₀-24 h在0.10-0.35 μg a.s./只（2）。不过，其它的中毒标准也可以接受，只要它提供足够的数据来证明期望的剂量(例如对硫磷)。

1.6.3 . 暴露

1.6.3.1. 剂量的管理

每组测定的蜜蜂应提供100到200 μL 50%的含有适量测定物质的蔗糖溶液。如果必须使用高比例的蔗糖溶液，可计算得要求有大量的低溶解性，低毒性或低浓度的溶液。每组蜜蜂消耗的饮食总量应被控制。

每次消耗完以后（一般3到4小时），喂食管应移开笼子，代之以另一根含有蔗糖溶液的管子。蔗糖溶液提供 ad Libitum。对有些化合物来说，高浓度的测定液对消耗反而不利。最多6小时后，用管子移开未消耗的食物。就可以估计已消耗的食物总量了（例如测量体积/残留物的质量）。

1.6.3.2. 持续时间

持续时间最好是在测定液换成蔗糖溶液后的48小时。如果死亡率在前24小时内继续按10%上升，持续时间可延长到最多96小时，以防止死亡率超过10%。

1.6.4.观察

开始测定后4小时记录死亡率，在此以后24小时和48小时（即在供给剂量后）时记录死亡率。如果需要延长观察时间，更多的估计应间隔24小时，直到96小时，防止死亡率超过10%。

估计每组消耗食物的总量，比较在给定6小时内已处理过和未处理过的食物消耗比，得出食物的可口度。

所在测定过程中的反常现象应予记录。

1.6.5.限制测定

在一些笼子（比如测定物质是低毒性的）里面，可以用限制测定，使用100 $\mu\text{g a.s.}$ /只用来证明LD₅₀有更好的价值。用同样的测定过程，包含三个使用同样剂量的测定组，相应的控制条件，估计相应的食物消耗量，和相应的中毒标准。如果有死亡，又是一个完整的学习过程。如果观察到了亚致死量（见1.6.4），应予记录。

2. 实验数据和实验结果报告

2.1 数据

制表总结数据，表达出处理过的每一组，以及受控下中毒标准，使用的蜜蜂数量，每个观察时间的死亡率，有反常行为的蜜蜂数目。用适当的统计方法分析死亡率（例如概率分析，平均移动，二项式概率）（3）（4）。在每一个推荐的时刻绘出剂量响应曲线，计算曲线斜率，平均致死量（LD₅₀），要求至少95%的置信度。用 Abbott 公式来修正控制下的死亡率。如果处理过的食物没有完全消耗，应测定每组消耗的测定物质。每只蜜蜂消耗的测定物质LD₅₀用 μg 度量。

2.2. 测定结果报告

测定结果报告需包含以下信息：

2.2.1. 测定物质

- 物理性质以及相关的物理 - 化学性质（如水的稳定性，蒸气压）。
- 化学鉴定数据，包括结构式，纯度（即对杀虫剂指纯活性物质的浓度(s)）。

2.2.2. 测定种类

- 学术名称，种类，近似年龄（每周），收集方法，收集日期
- 用来收集测定蜜蜂的种群的信息，包括健康，任何的成体疾病，任何的预处理等。

2.2.3. 测定条件

- 实验室的温度和湿度
- 房间的条件，包括大小，形状，和笼子材料
- 预储存方法和测定溶液（使用的溶液浓度）
- 测定的设计过程，例如使用的测定浓度和数量，对照的数量；每个测定溶液和对照的同样的笼子，以及每笼的蜜蜂数量。
- 测定日期

2.2.4. 实验结果

- 进行了的浓度范围的实验结果
- 天然数据：每个观察时间每种剂量的死亡率
- 测定结束后的剂量 - 响应时间图
- 95%置信度时LD₅₀的值，在每个推荐的观察时刻，测定物质和中毒标准
- 得到LD₅₀的统计过程
- 对照下的死亡率
- 其它观察到或测量到的生物影响因素，例如蜜蜂的反常行为（包括拒绝测定物质），处理和未处理组的食物消耗比
- 任何测定过程中的偏差以及其它相关的信息

3. 参考文献

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in Laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

C.17.蜜蜂急性接触性毒性测定

1. 测定方法

此毒性测定方法与 OECD TG 214(1998)相同。

1.1 引言

此测定是一种实验室测定方法。其用于估计工厂防护物及其他化学物质对工蜂产生的急性接触性毒性的大小。

在估计物质毒性时，例如蜜蜂暴露于某一特定化学物质时，需要确定接触毒性的大小。

本测定用于确定杀虫剂和其他化学物质的固有毒性对蜜蜂的影响。测定结果用于决定是否需作进一步的评估。此法尤用于逐步评定杀虫剂对蜜蜂的有害影响，这一评定基于连续进行实验室，半实地和实地实验。杀虫剂可作为一种活性物质或混合物来测定。

为了检验蜜蜂的灵敏度和实验步骤的精度，必须采用一毒性标准。

1.2 定义

急性接触毒性 最大周期内（96 小时）使用单剂量物质产生的不利影响。

剂量 被测物质的使用量。用单位个数蜜蜂的用药质量（ $\mu\text{g}/\text{bee}$ ）来描述。

半致死量 (LD50) 是当生物与某物质接触时，统计上导致50%生物死亡的物质量。半致死量用每只蜜蜂耗去几微克物质来表示。对杀虫剂，被测物质可能是一种活性物质或包含一种或多种活性物质的混合物。

死亡率 当一生物完全不动时，被视为死亡。

1.3 测定方法原理

工蜂在腹部被敷以一定剂量的溶于适当载体的待测物。实验为期 48 小时。如死亡率在 24 到 48 小时内一直上升而控制死亡率保持于一可接受范围，如 10%，可将实验时间扩至 96 小时。每天记录死亡率并与控制值进行比较。分析实验结果以计算 24 及 48 小时内的半致死量，以决定是否将实验时间延长至 72 或 96 小时。

1.4 测定的有效性

一有效的实验应满足下列条件：

平均死亡率在实验结束时不可超过可控值 10%。

半致死量的毒性标准满足指定的范围。

1.5 测定方法描述

1.5.1 蜜蜂的选取

应选用同样生物地位，同一年龄，种族的年轻工蜂。被选蜜蜂应是健康，饲养良好，具有已知家族史和生物地位的。它们或早或晚被选用，并一直保持在实验条件下。应选取无卵蜂。由于蜜蜂的生理状态在早春或晚秋会发生变化，故尽量避免此时选蜂。如不得不在此时实验，蜜蜂须置于孵卵器中，且以花粉和蔗糖水溶液培养一周。接触了化学物质如抗生素等的蜜蜂在接触后四周后方可使用。

1.5.2 居住与喂养的条件

应提供易清洁且通风良好的巢。不锈钢，线网，塑料，万用木笼均为合适的材料。巢的大小应以可提供足够的空间为宜。最好每巢十只蜂。

蜜蜂应置于 25 ± 2 的暗室中。实验过程中应记录相对湿度(正常50—70%)。可在日光下进行处理观察等操作步骤。用一喂养器盛500 g/L蔗糖水溶液作为测定期间蜜蜂的食物。喂养器可用玻璃管(50mm长,10mm宽,一端开口且开口直径为2mm)代替。

1.5.3 蜜蜂的准备

选好的蜜蜂用二氧化碳或氮气麻醉以便敷以测验试剂。麻醉剂用量和时间应尽量小。测验前垂死的蜜蜂应换为健康的。

1.5.4 试剂的准备

测定物质被溶于溶剂如有机溶剂或水中并置于容器中。如有机溶剂丙酮最好但其他低毒溶剂也可(如二甲基甲酰胺,二甲亚砷)。由于水和高极性的有机化合物不溶于有机载体液,此时应配制稀溶液(Agrl, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween)。

应配制适当的控制液,其中用溶剂或分散剂来溶解测定物质。采用对照组,一组用水处理,一组用溶剂或分散剂来处理。

1.6 测定步骤

1.6.1 测定和对照组

用药量应满足统计上确定半致死量时置信度为95%。正常测定要求在一几何序列中,使用一因数不超过2.2且包含半致死量的五剂药。但药剂数应决定于毒性曲线的斜率以及分析实验结果的统计方法。进行范围测定可以确定药剂数。

最小的三个测定组(每组十只蜂)施以测定浓度的药剂。

最小的三个对照组(每组十只蜂)也要加入测定。如果对测定组使用有机溶剂,对照组也要使用此类溶剂。

1.6.2 毒性标准

测定序列中应包含毒性标准，至少三剂药用量应涵盖半致死量的值。三个最小的相同实验巢(每巢十只蜂)每巢用以一剂药。多选二甲基苯胺为毒性标准(24小时半致死量为0.10 - 0.30 $\mu\text{g a.s./bee}$)。但如有足够的数以检验实验效果也可用其他的毒性标准(如硝基硫磷酯)。

1.6.3 接触

1.6.3.1 试剂的使用

每只蜜蜂分别进行局部注药。蜜蜂随机的分到不同剂量,不同的控制条件的组中。

每只蜜蜂均从背面用一容积为 $1\mu\text{L}$ 的微型注射器注射药剂。如与实验相符,其他容积的注射器也可用。此后,蜜蜂被放入巢中并供以糖水。

1.6.3.2 测定时间

测定时间多为 48 小时。如 24 到 48 小时死亡率上升了 10%以上,测定时间应延长至 96 小时以控制死亡率低于 10%。

1.6.4 观察

敷药后分别在 4, 24, 48 小时记录死亡率。如须延长观察时间,则须直到 96 小时为止每隔 24 小时作一次观察以便使死亡率不超过 10%。

实验期间,所有不正常的现象均须记录。

1.6.5 限度测定

在某些情况下(如测定物质低毒性时),应用 $100\mu\text{g a.s./bee}$ 剂量的药剂进行限度实验以确证半致死量大于此数值。测定组,对照组和毒性标准测定组均应采取上述步骤。如出现死亡,则开始全面监测。观察到不致命的现象也应记录。(见1.6.4)

2 实验数据和结果报告

2.1 实验数据

数据应列成表格,表中应有:测定组,对照组和毒性标准测定组;蜜蜂数量;各观测时间的死亡以及反常蜜蜂的个数。用适当的统计方法分析蜜蜂的死亡率(如正态分析,坐标平行,最小二乘法)(3)(4)。在每个观测时间(如24, 48, 72, 96小时)做剂效曲线,并在置信度95%下计算曲线斜率和半致死量。对控制死亡率的校正可用Abbott's校正法(4)(5)。半致死量应表示成每只蜜蜂几微克物质的形式。

2.2 实验结果报告

测定结果报告应含以下信息。

2.2.1 被测物质

- 物理性质和物理化学性质（如水中稳定性和蒸气压）。
- 化学特征数据，包括结构式和纯度（对杀虫剂而言，还须给出活性物质的性质和浓度）。

2.2.2 被测种类

- 学名，种属，大致年龄（以周为单位），采集方法，采集时间。
- 选蜂种群的信息，包括健康状况，成体患病情况，测定前的处理情况。

2.2.3 测定条件

- 实验室的温度和相对湿度。
- 居住条件：巢的类型，大小和筑巢物质。
- 敷药方法：包括是否应用载体溶液，麻醉剂的用量。
- 测定设计：药剂用量，控制数，同一实验条件下的巢数，每巢的蜜蜂数。
- 测定日期。

2.2.4 实验结果报告

- 范围确定实验的实验结果。
- 原始数据：各观测时间时每种浓度测定下的死亡率。
- 测定物质和标准物质使用后各观测时间时的半致死量（置信度 95%下的计算值）。
- 确定半致死量的统计步骤。
- 对照组的死亡率。
- 观察到的其他生物现象和蜜蜂反常行为。
- 任何与以上描述背离行为和任何相关信息。

3 参考文献

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March, 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

C.18.组分平衡法确定吸附-解吸附

1. 测定方法

本实验方法与 OECD TG 106 相同，应用组分平衡法确定土壤吸附-解吸附作用大小。

1.1 引言

测定方法考虑了一系列的实验，用于土壤吸附测定的车间 (1)(2)(3)(4) 和存在相关的国家级指标(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)。

吸附-解吸附研究可为生产提供必要的信息（物质的迁移率和它们在土，水和空气等构成的生物圈内的分布状况）(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)。这些信息可用于预测和估计如物质的降解率(22)(23)，转化率和被微生物吸收的百分率(24)；物质在土中的透过率 (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28)；在土中的挥发性 (21)(29)(30)；水土流失率 (18)(31)(32)。吸附数据可用于比较和建立模型(19)(33)(34)(35)。物质在固液两相分布是一个复杂的过程，它依赖于以下因素：物质的化学性质(12)(36)(37)(38)(39)(40),土壤的特征 (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49)，气候（如降雨量，气温，光照和风力）。因此，许多物质吸附的现象和机理不能有一个简单的实验室模型来概括。尽管这一努力不会涵盖所有情况，但它提供了有价值的物质吸附信息。

参看总引言。

1.2 应用范围

本实验方法在于估计物质在土中的吸附-解吸附行为。其目的在于获得吸着值以便预测在不同环境下的分布效率。为此，物质的吸附平衡系数被假定为土壤性质的函数（如有机物含量，黏土含量，土壤质地和pH值）。为了模拟自然中存在的物质与土的相互作用，必须用尽可能多的种类的土壤。

在此实验方法中，吸附表示物质与土壤表面接触。这里不区分不同吸附过程（物理的或化学的）；表面促降解过程，气泡吸附或化学反应。土壤胶体（直径 $< 0.2 \mu\text{m}$ ）产生的吸附不考虑。对吸附有重要影响的土壤参数有：有机物含量 (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48)，黏土含量 (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)，土壤质地和离子化合物的pH值(3)(4)(42)。其他可能对土壤吸附-解吸附作用起重要作用的因素有：正离子交换容量(ECEC)，无定型的铁铝氧化物含量（尤其对火山附近和热带的土壤(4)，以及一些特殊表面(49)）。

本实验用来估计不同种土壤（不同的有机物含量，黏土含量，土壤质地和离子化合物的

pH值)的吸附情况。其包含三层：

第一层：预备研究：

- 固溶比。
- 吸附平衡时间和平衡吸附量。
- 容器对实验物质的表面吸附和实验物质在测定时的稳定性。

第二层：审查测定：在五种不同的土壤中实验同一浓度的物质，并确定该物质的分布系数 K_d 和 K_o 。

第三层：确定吸附等温线以确定浓度对土壤吸附的影响。

用解吸附动力学和 Frenudlich 解吸附等温线来研究解吸附（见附录一）

1.3 定义和单位

符号	定义	单位
A_{ti}	t_i 时刻的吸附百分率	%
A_{eq}	平衡时的吸附百分率	%
$msads(t_i)$	t_i 时刻土壤表面吸附的物质质量	μg
$msads(t_i)_\Delta$	Δt_i 时间间隔内土壤表面吸附的物质质量	μg
$msads(eq)$	平衡时刻土壤表面吸附的物质质量	μg

m_0	实验开始时试管中试剂的质量	μg
$mmads(t_i)$	t_i 时刻测定物的质量	μg

maq ads eq ()	吸附平衡时刻测定物的质量	μg
msoil	干土壤的质量	G
Cst	测定物溶液的质量浓度	μgcm^{-3}
C0	测定物溶液的初始质量浓度	μgcm^{-3}
C ads(t)	分析进行至时刻 t_i 时测定物溶液的质量浓度	μgcm^{-3}
C ads eq ()	吸附平衡时刻土壤表面吸附的物质的量	$\mu\text{gs g}^{-1}$
C ads(eq)	吸附平衡时刻测定物溶液的质量浓度	μgcm^{-3}
V0	液相的初始体积	cm^3
v A	测定液的体积	cm^3
Kd	吸附分布系数	cm^3g^{-1}
Koc	有机碳标准吸附系数	cm^3g^{-1}
Kom	有机物标准分布系数	cm^3g^{-1}
K ads	Freundlich 吸附系数	F $\mu\text{g l}^{-1/n} (\text{cm}^3)$ $1/n\text{g}^{-1}$

1/n	Freundlich 指数	
D _{ti}	T _i 时刻解吸附百分数	%
D _t _	Δ _{ti} 时间间隔内解吸附百分数	%
K _{des}	表面解吸附系数	cm ³ g ⁻¹
K _{des}	Freundlich 解吸附系数	F μ g l ^{-1/n} (cm ³) 1/n g ⁻¹
maq _{des} (t _i)	T _i 时刻土壤表面解吸附的物质质量	μ g
maq _{des} t _i) (_	Δ _{ti} 时间间隔内土壤表面解吸附的物质质量	μ g
mmdes(eq)	解吸附平衡时刻分析手段测得的物质的质量	μ g
maq _{des} eq) (解吸附平衡时刻的物质的总质量	μ g
msdes(t _i) _	Δ _{ti} 时间间隔后土壤上剩余的物质质量	μ g
maq _A	由于液体不完全位移土壤上剩余的物质质量	μ g
C _{des} (eq)	解吸附平衡时刻土壤上	μ g s g ⁻¹

	剩余的物质的量	
C des eq ()	解吸附平衡时刻液相物质的质量浓度	$\mu \text{ g cm}^{-3}$
VT	解吸附实验时总的液相的体积	cm^3
VR	吸附平衡时刻试管中表面浮物的体积	cm^3
v D	解吸附实验时，测定液的体积	cm^3
V i	解吸附实验时从试管中取出的测定液的体积	cm^3
V F	解吸附平衡时从试管中取出的测定液的体积	cm^3
MB	质量平衡	%
mE	土壤和试管壁上取得的试样的总质量	$\mu \text{ g}$
Vrec	吸附平衡后试管中表面浮物的体积	cm^3
Pow	辛醇--水分配系数	
pKa	解离常数	
Sw	水中溶解度	g L^{-1}

1.4 测定方法原理

向已知浓度已知体积的物质溶液中加入事先用0.01 M CaCl₂ 平衡好了的土样。振摇一段时间。悬浮的固体便被离心力分出，清液即可用于分析。吸附在土样上的物质的量可由实验前后溶液中物质的量的差算出。（间接方法）

另外，吸附在土样上的物质的量可由直接分析土样来决定。（直接方法）这种逐步用适当

溶剂萃取土样的方法多用于利用溶液中的浓度计算吸附在土样上的物质的量达不到要求的精度的情况。具体此法可用于：测定容器表面的吸附物，物质在实验中的不稳定性，由于低吸附产生的溶液中小浓度的变化和由于高吸附导致的溶液中物质测量达不到精度的情况。若应用物质，则应以燃烧分析和银光记数来代替萃取方法。但液体的银光记数不能区分原物质和转化物，因此其仅应用于测验时物质稳定的情况。

1.5 实验物质信息

化学试剂要求是分析纯的。建议采用已知组成的纯度为 95%以上的物质或已知光学纯度和组成的物质。对追踪用的同位素（半衰期很短）须校正衰变。

在进行吸附-解吸附实验之前，实验物质的下列信息应已获知：

- a 水中溶解度。(A.6)
- b 蒸气压和/或亨利常数(A.4)
- c 非生物的降解：水解与 pH 值的函数关系。(C.7)
- d 分配系数。(A.8)
- e 生物的降解(C.4)或土壤中好氧和厌氧的转化。
- f 离子化合物的 pKa。
- g 水溶液的光分析（紫外可见光谱，量子效应）和土壤的光降解。

1.6 实验的实用性

本实验可用于分析方法可准确测定的物质。实验时实验物质的稳定性是一个影响实验结果可信度的重要参数。它在应用间接方法测量时尤为重要。因此在准备性研究时应测定其稳定性。如测定时发现物质有转化，则在主测定时应既分析固相又分析液相。

进行实验时，低水溶性($S_w < 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$)和高带电性的物质由于液相浓度较低，应用分析方法测量时精度不高而产生测量困难。关于如何处理此问题的指导参见相关部分。测定挥发性物质时应减少实验中的损失。

1.7 实验方法描述

1.7.1 仪器和化学试剂

标准的实验仪器如下：

- a 进行实验的试管和容器。这些容器：
 - 直接放于离心机中以减小处理和转移的错误。
 - 由惰性物质制成以减少器壁对物质的吸附。

b 振动器：普通的振动器或与之相应的仪器。仪器应使土样在振动时保持悬浮。

c 离心机：最好为高转速（离心力大于 3000g），可控温，可从水相分离大于 0.2 μm 粒径的粒子。容器在离心机中时应盖盖子以防止挥发。同时用惰性材料制成的盖子以减少吸附。

d 选择性：过滤器，应使用无菌单一用途的 0.2 μm 多孔过滤器。应注意选择过滤物质应避免实验物质的任何损失。低溶解度物质多不用有机过滤物。

e 适于分析物质浓度的分析仪器。

f 能获得 103 到 110 °C 温度的实验微波炉

1.7.2 土壤的特征和选样

土样应以三个与吸附容量密切相关的参数分类：有机碳，黏土含量和土壤质地、pH 值。

正如已提到的(见应用范围)一些土壤的物理化学性质也可对吸附-解吸附产生影响。

用于土壤分类的方法是很重要的，它能对实验结果产生重要影响。因此建议依相应的 ISO 方法 (ISO-10390-1) 土样的在 0.01 M CaCl₂ 中测定 (用于吸附-解吸附实验的溶液)，其他相关特性可依据标准方法测定 (ISO .Handbook of Soil Analysis.)，这使得吸着数据的分析可基于国际标准参数。土壤分析的标准方法可见参考文献 (50—52)。为了校正土样测定方法可采用参考土样。

吸附-解吸附实验的土样选择的指导见表 1。七个供选土样包含了地理上大部分区域。对于离子化合物，选样应包含一个宽的范围以便估计离子形式和非离子形式吸附的物质的量。关于在不同测定中可选土样种数的指导见实验 1.9 进行。

若采用其它土壤分类，它们必须以相同的标准参数来分类且即使与标准不是精确相符在性质上也应有如表 1 的相似变化。

表 1：吸附-解吸附实验的土样选择的指导

土壤型号	范围	有机碳含量	黏土含量	土壤质地
1	4.5 - 5.5	1.0—2.0	65--80	黏土
2	>7.5	3.5—5.0	20—40	肥黏土
3	5.5—7.0	1.5—3.0	15—25	肥峡土
4	4.0—5.5	3.0—4.0	15—30	肥土

5	<4.0—6.0	<0.5—1.5	<10—15	肥沙
6	>7.0	<0.5—1.0	40—65	肥黏土/黏土
7	<4.5	>10	<10	沙/肥沙

依据 FAO 和 US 体系 (85)

各变量应尽量在所给范围之内。如选择适当的土样有困难,可用比最小值更低的值。

有机碳含量小于 0.3%的土样会干扰有机成分和吸附的相互作用。因此建议所选用的土样有机碳含量不小于 0.3%。

1.7.3 土样的选择和储存

1.7.3.1 选样

选样的方法依研究目的而不同(53)(54)(55)(56)(57)(58)。

应从下列方面考虑:

a) 土样采集地的历史细节是必须知道的。这包括:位置,植物覆盖程度,杀虫剂的处理,生物的引入或污染。采用ISO标准(ISO 10381-6)进行采样应按相应的样品描述。

b) 选样位置必须由 UTM(Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) 或地理坐标来确定。这能使将来重新取样或在不同分类体系下确定土壤种类成为可能。可选用的土样深度最深为20cm。尤对土样n.7,若水平面是土面,它应包含在采样数据中。

土样应用容器运输,且运输时应使之处于不改变土样性质的温度下。

1.7.3.2 储存

最好用新鲜的土样。如不可能,土样应保存在室温下干燥的环境中。土样保存时间无限制。但保存三年以上的应在实验前进行重新分析。

1.7.3.3 土样的处理和准备

土样保存在室温下(20-25)自然干燥。处理土样时用力应尽量小,以保证土壤质地的变化尽量小。土样过筛后颗粒的大小应 ≤ 2 mm。整个筛土过程应按ISO选样标准(ISO 10381-6)进行。尽量使颗粒大小均匀,这可以保证实验结果的重复性。水分的多少由三份土样分别于105°C下恒重测定。所有计算中土样的质量均是除去水分的干土质量。

1.7.4 实验试剂的准备

实验物质溶解于由蒸馏水或去离子水配制的 0.01M CaCl₂ 中。溶液是作为液相使用以增加离心效果减少正离子交换。溶液的浓度应比分析检测下限高三个数量级。这种措施保证

了实验的准确度；同时溶液的浓度应比测定物在水中的溶解度低。

储备液应事先准备并保存在4°C 暗室中。保存时间依测定物稳定性和浓度而定。

对低溶解度情况 ($S_w < 10^{-4} \text{ g/L}$)，当溶解困难时，须用适当的助溶剂。这种助溶剂：a 易与水混合(如甲醇,丙酮)；b浓度不超过储备液总浓度的1%，且杂质含量较少(<0.1%)；c不与实验物质发生表面或界面的反应。使用助溶剂应能保证实验结果的正常。

对低溶解度情况的另一种处理方法是测定物质的溶液加入测定体系：测定物溶于有机溶剂再加入0.01 M CaCl_2 。有机溶剂的量应尽量少 (<0.1%)。这一方法会导致溶液的体积无法重现。因此，由于测定物与溶液浓度在各个实验中均不同，将会引入另一个误差。

1.8 分析方法

1.8.1 分析方法

影响吸附测量的重要参数包括：分析液相和固相的分析方法，实验物质稳定性和纯度，是否平衡，溶液浓度变化的大小，固溶比和平衡过程中土壤结构的变化(35)(59-62)。与之相关的例子见附录2。

在测定的浓度范围内应检验分析方法是否可行。实验者应自由发展有适当准确度，精度，重现性，检测限的适当方法。如何做到此点的指导如下。

适当容积的(如0.01 M CaCl_2 100 cm^3)与一定质量的土样(20g高吸附度，有机碳含量，黏土含量)振荡4小时；这些质量和体积依赖于分析的需要，但1：5的固溶比是通常的选择比例。混合物离心后液相被分出。加入一定体积储备液以使浓度进入一定范围。这一体积不可超过最终体积的10%，以尽量减小对平衡的破坏。分析得到的溶液。必须进行一个土样+ CaCl_2 溶液(无测定物)的空白实验以便检验分析的方法和土壤的基体效应。可用于吸附分析的方法包括气相色谱法(GLC)，高效液相色谱法(HPLC)，光谱(GC/MS, HPLC/MS)，荧光法。如测定结果在正常值的90%--110%之间，则是合适的。考虑到分离后的进一步测验，方法的检出限应比正常浓度低2个数量级。

分析方法的特征和检出限对确定实验条件尤为重要。这一方法按一般的实验思想对选择其他解决方案提供了建议，这些方案中分析方法和实验设备可能加入一些限制。

1.8.2 最佳固溶比的选择

选择适当固溶比的研究与分布系数和吸附相对期望度有关。依据吸附方程和分析限度，溶液中物质浓度的变化决定了测量的统计精度。因此，在一般的测定中，当吸附百分数高于20%且可取度大于50%时，要规定几个比例不变(62)。同时，应保证液相的浓度足够

大以满足精确测量的需要。在高吸附百分数下，此点尤为重要。

一种方便的确定固溶比的方法是通过借助预研究中 K_d 值或估算技巧(见附录 3)来估算 K_d 的值。选择适当固溶比就只须作一张一定固溶比下的固溶比图线（图 1）。在图中，假定吸附方程是线性的。整理方程（4）得到（1）：

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

或对数形式：

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1-A_{eq}\%/100)} \right] \quad (2)$$

其中：

$$R = m_{soil}/V_0$$

$$A_{eq}\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} = \frac{(A_{eq}\%/100)}{(1-A_{eq}\%/100)} \quad (2)$$

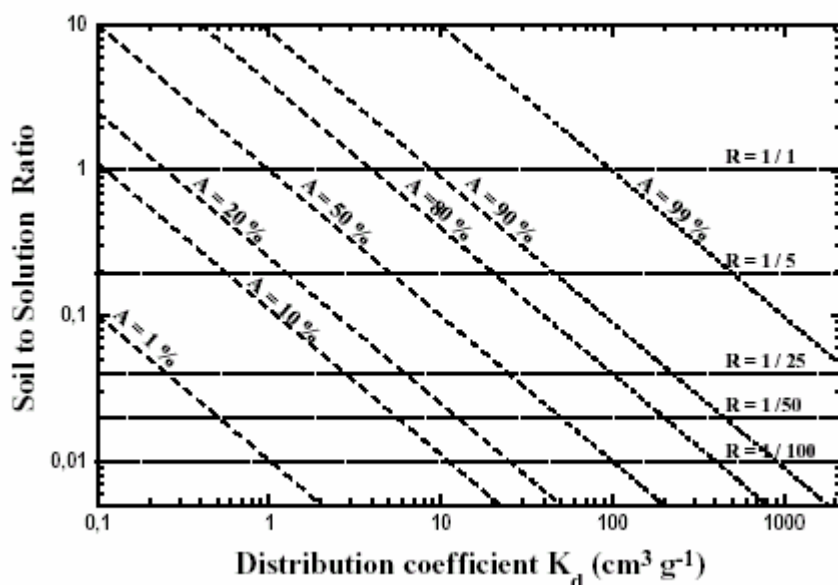


图 1:不同吸附百分数下土壤/溶液比与 K_d 的关系

(Soil to Sollution Ratio 土壤/溶液比 Distribution coefficient K_d 分布系数 K_d)

图1表示固溶比是不同吸附程度时 K_d 的函数。例如固溶比1：5且 K_d 为20时，吸附程度就

为80%。相同的K_d时要达到吸附程度为50%，固溶比应为1：25。这一选择固溶比的方法使得实验者可以灵活选择。

最难处理的区域是那些物质被高吸附或低吸附的区域。低吸附时，建议采用1：1的固溶比。当然对有机物含量较多的土壤可采用更低的固溶比。必须采用适当分析方法检测微小的浓度变化，否则测量将不准确。另一方面，当分布系数很大时可采用1：100的固溶比以便在溶液中保留一定量的物质。同时必须保证混合均匀且提供足够长的平衡时间。一种处理当分析方法失效的极端情况的方法是应用基于值的估计方法来预测的K_d值（见附录3）。尤其对固溶比低/极性低而P_{ow}小于20的物质和高脂性/吸着性高而P_{ow}>10⁴的物质适用。

1.9 实验

1.9.1 温度条件

所有实验都尽可能在介于20~25 °C之间一个恒定的温度下进行。

离心的条件是溶液中的移动微粒大于0.2μm。被认为是形成微粒的最小值并且也是固体和胶体微粒的界限。怎样决定离心条件见附录4。

如果离心设备不能保证离心分离微粒大于0.2μm的粒子，那么可采用离心机与0.2μm的滤纸连用，进行过滤。这些滤纸应采用合适的情性材料作成，以免造成实验物品的损失。任何情况下都要保证过滤时无损失。任何情况下，都要保证过滤时无损失。

1.9.2 步骤1——初步研究

进行初步研究的目的已在范围一节中给出下给出进行这种实验的仪器。

1.9.2.1 选择最佳的土壤/溶液比

有两类土壤和三种土壤——溶液比被采用。一种土壤为高有机物，低黏土含量，另一种相反。下列出土壤加入溶液的比例：

- 5克土壤和50cm³水溶液溶解实验（比例1/1）
- 10克土壤和50cm³水溶液溶解实验（比例1/5）
- 2克土壤和50cm³水溶液溶解实验（比例1/25）

根据实验仪器和进行实验的方法来决定实验用土壤的最小量。但劝告至少用1克，最适为2克，以便获得可信赖的实验结果。

控制实验物品用量加入0.01 M CaCl₂溶液（无土壤）中，在同样实验精度下进行，以便检查实验物品在CaCl₂ 中的稳定性和他在容器表面可能的吸附。

同样实验步骤进行空白对照实验。这是为了在分析测定干扰物或污染土壤时进行背景控制。

所有实验，包括控制和空白实验都要有重复性。用来做实验的样品总量应能用下面的方法来计算。

预备研究的方法和主要研究的相同，除了提到的以外。

将干燥的土壤样品和最小体积 45 cm^3 的 0.01M CaCl_2 振摇以平衡。并在实验前放置12小时。然后将溶有实验物品的一定体积的溶液加入使最后体积更好为 50 cm^3 。这体积要求：(a) 应不超过 50 cm^3 水相的10%，为了尽可能小的改变已平衡的溶液。(b) 更好的，应使实验物品和土壤(C_0)的浓度至少比分析探测限高2个数量级。这防护措施可在发生强吸附($> 90\%$)时得到精确的实验结果并决定吸附等温线。也劝用，如可能，一开始的物质浓度(C_0)不能超过溶解限度的一半。

下面给出怎样计算储备液浓度的一个例子。假定一检测限 0.01 ug cm^{-3} 和90%的吸附。因此，一开始的实验物质的浓度最好为 1 ug cm^{-3} (高2个数量级)。假定最大储备液体积加上，例如： 5 到 45 cm^3 0.01 M CaCl_2 平衡溶液(=10%的储备液加到 50 cm^3 总体积的水相)，储备液的浓度应为 10 ug cm^{-3} 。这比分析方法的检出限高了3个数量级。

溶液的pH应在加土壤前和后测因为它在整个吸附过程中十分重要，特别对离子型物质。混合振摇直到平衡。土壤的平衡时间不确定，依赖于化学物质和土壤。24小时一般已足够(77)。在初步研究中，样品可在混合48小时后连续收集。总之，分析时间应根据实验时间表具体安排。

在水溶液中有两个分析实验方法的选择：(a) 平行方法 (b) 系列方法。应强调的是，尽管平行方法在实验上很麻烦，但数学处理却相对简单(附录5)。应根据实验设备和资源具体选择哪种方法。

(a) 平行方法:准备好样品和同样比例的土壤/溶液比，研究吸附动力学。有时要可能多的时间间隔。离心后如果过滤，第一管中的水相尽可能完整的等待后再测定，如：4小时，那么第二管在8小时后，第三管在24小时后。

(b) 系列方法:重复样品准备每一比例的溶液中，混和物在确定的时间间隔分离水相。一小部分水相立即被用来分析实验物质。然后实验继续进行初始混合。如在离心后过滤，实验室应有仪器处理过滤后的小部分水相。注意，这小部分的体积不得超过总体积的1%，以防改变土壤/溶液比并减弱吸附的物质的量。

在标称原始浓度和采样时间 (t_i) 测定浓度的基础上, 减去空白校正值, 以计算每一时间点 (t_i) 时的吸收百分比 A_{ti} 。 A_{ti} 对时间图用来估计达到平衡最大值的程度⁵ (附录5, 图1)。并计算平衡时的 K_d 值。根据这 K_d 值, 合适的土壤/溶液比例从图1中给出, 这样吸附百分比可达到20%以上, 更好的话为 >50% (61)。所用方程和原理在实验数据和实验结果报告以及附录5中给出。

1.9.2.2. 决定吸附平衡时间和平衡状态下吸附物质的量。

如前所述, A_{ti} 或 C_{aq}^{ads} 对时间做图可估算出吸附平衡程度和所吸附物质的量。附录5中图1和2就是这种图。体系的平衡时间需达到最大值。

如果, 是一种特殊土壤, 没有最大值而是稳定的上升, 这是由于一些其它的复杂因素如: 生物降解和慢扩散。生物降解可通过用一消毒土壤样品重复实验得出。如果在这种情况下还没达到平台期, 实验者应寻找其它现象和原因。这可通过适当改变实验条件 (温度, 摇动时间, 土壤/溶液比) 实现。尽管有可能达不到平衡, 实验者应自行决定是否继续。

1.9.2.3. 测定容器的表面吸附和测定物质的稳定性。

测定管表面测定物的吸附信息, 像它的稳定性, 可从分析控制样品获得。如果用分析方法所得的实验结果大于标准误差, 则包括无生命的降解和在测定管表面的吸附。通过用一种已知体积的合适溶剂彻底清洗管壁并洗溶液来分析测定物可分清这两种现象。如果在测定管的表面没有观察到吸附, 证明该物质具有非生命的不稳定性。如果观察到吸附, 则改变测定管的材料是必要的。但是, 在土壤/溶液实验中吸附所得的数据不能直接外推。土壤的存在会影响这吸附。

测定物质稳定性的额外信息可由亲代物质的决定推出。这意味着水相, 土壤的萃取物和测定管壁可用来分析测定物质, 加入的待测物质的量和总的水相中待测化学物质的量不同, 土壤萃取物和测定管等同于降解或挥发或没浓缩的物质。为了进行物质平衡决定, 平衡吸附应在实验时完成。

在土壤和土壤/溶液比中的平衡物质给出了在平衡中20%以上, 和最好 >50%。在分析完最后一份水相中样品并找到了比例的48小时后, 用离心分离此相, 需要的话可过滤。水相应尽可能多的回收, 用一合适溶剂萃取实验物 (萃取系数至少95%)。最后连续两次萃取。在土壤和实验器皿中的实验物的量和物料平衡是可计算的 (方程10, 实验数据和实验结果报告)。如果少于90%, 则在实验测定时间表上测定物是不稳定的。总之, 研究可继续进行, 考虑到实验物的不稳定性, 最好在主要实验中两相都分析。

1.9.2.4. 步骤2——在一种实验物质浓度下的吸附动力学

按表1选5种土壤。如果合适的话，在五种土壤中初步研究中的土壤有一优点。在这种情况下，步骤2不必重复初步研究。

平衡时间，土壤/溶液比，土壤样品重量，接触土壤的水相体积和溶液中实验物的浓度按初步研究的实验结果选择。应在隔了2，4，6，8（也可能10）和24小时接触时间之后再分析。摇动时间可延长到最大48小时已防药品需要更长的平衡时间

5. 水相中测定物浓度 (C_{aq}^{ads}) 对时间做图也可用来估计达到平衡峰的程度 (附录5, 图2) 才能得到比例实验结果。总之，分析时间不固定。

每个实验（一土壤和一溶液）至少要有重复性以允许计出实验结果的变化。每个实验都进行空白实验，它由土壤和0.01 M $CaCl_2$ 溶液组成，没有测定物，重量和体积相对于那些需鉴定之物。控制样品仅用实验物质加入0.01 M $CaCl_2$ 溶液中（没土壤）进行同样实验步骤，以防意想不到的实验结果。

吸附百分数在每个时间点 A_{ti} 或在每个时间间隔 A_{ti} （根据需要）并对时间做图。同样计算平衡分布系数 K_d 和有机碳的标准吸附系数 K_{oc} （非极性有机化合物）。

吸附动力学测定结果

线性的 K_d 值可精确描述土壤的吸附行为 (35)(78) 并体现土壤中化学物质的固有迁移率。例如：一般化学物质在 $K_d = 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 被认为定性移动。类似的，一个依据 K_{oc} 值的迁移率的分类表已被 MacCall et al. (16) 改进。另外，过滤分类表依据 K_{oc} 和 DT-506 (32)(79) 的关系。

同样，根据误差分析 (61)， K_d 值低于 $0.3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 不能从水相减少的浓度分析出，甚至是最好的（从精确观点看）土壤/溶液比，如1/1。这种情况下应同时分析两相，土壤和溶液。

对于上述论述，最好在研究土壤中化学物质的吸附行为和其潜在迁移率应连续进行以决定体系的弗里因德里希吸附等温线，只要根据这个实验方法的草案， K_d 的精确求解是可能的。如果 K_d 乘上土壤/溶液比 > 0.3 ，只要根据水相浓度的减少（间接方法），则这个值的精确解是可能的，或 > 0.1 ，则根据两相同时分析可得（直接方法）(61)。

1.9.2.5. 步骤3——吸附等温线和解吸动力学/解吸等温线

1.9.2.5.1. 吸附等温线

用五种测定物浓度，最好两个数量级覆盖；以选择在水中溶解并考虑水的实验结果平衡浓度。同样的土壤/溶液比也应被研究。照上述方法做吸附实验。不同之处仅在于水相在必要时只分析一次以达到平衡像在步骤2中那样求算。溶液中的平衡浓度和吸附量由溶液中测定物的耗尽量求算或用直接方法。每单位土壤的吸附质量对测定物平衡浓度的函数作图（见实验数据和实验结果报告）。

吸附等温线的实验结果

在至今的吸附的数学模型中，弗里因德里希吸附等温线是最常被用来描述吸附过程的。更多的有关解释的细节信息和吸附模型的重要性在参考文献(41)(45)(80)(81)(82)中给出。

注解：应注意不同物质的KF 值（弗里因德里希吸附系数）仅在同样单位时才可比较。

1.9.2.5.2.解吸动力学

实验的目的是为了调查化合物是可逆或不可逆的吸附到土壤上。这信息很重要，因为解吸实验过程在土壤中化合物的行为研究亦很重要。另外，解吸数据可输入计算机做过滤和溶解的模拟实验。

如果一解吸研究是必要的，那么下面描述的研究在每个体系中进行以精确计算吸附动力学过程的Kd 值是可能的。

像吸附动力学研究一样，有2种解吸过程可选择：(1) 平行方法(2) 系列方法。应根据实验设备和资源具体选择哪种方法。

(1) 平行方法：准备好样品和同样比例的土壤/溶液比，研究解吸动力学

有时要尽可能多的时间间隔。最后像吸附实验一样用同样的时间间隔；总之总时间应达到让体系达到解吸平衡。每份实验(一土壤一溶液)作一份空白实验。它由土壤和0.01 M CaCl₂溶液组成，没有测定物，重量和体积相对于那些需鉴定之物。控制样品仅用实验物质加入0.01 M CaCl₂溶液中(没土壤)进行同样实验步骤。摇动土壤和溶液的混合物直到吸附平衡(由前步骤2决定)。然后离心并尽可能多的去掉水相。溶液体积被等体积0.01 M CaCl₂ 溶液所取代并再次摇动第一管的水相尽可能完整的回收并在2小时后测量，那第二管在4小时后，第三管6小时后等等，直到达到解吸平衡。

(2) 系列方法：在吸附实验后，离心并尽可能多地去掉水相，并用无测定物的等体积的0.01 M CaCl₂ 代替。摇动直到解吸平衡。在这段时间内，在每个确定的时间间隔，离心分层。一部分水相直接分析测定物，然后实验继续开始的混合。每一部分的体积应小于

总体积的1%同样量的新鲜的0.01 M CaCl₂ 溶液加入混合物中以维持土壤/溶液比 ,并摇动只到下一次间隔。

解吸百分数在每个时间点(D_{ti})和时间间隔(D_{ti}_)计算 (根据研究需要) 并对时间

6.DT-50:降解50% 测定物时间

做图。平衡解吸系数 K_{des} 也算。所用方程在实验数据和实验结果报告以及附录5中给出。

解吸动力学实验实验结果

一般解吸百分比 D_{ti} 和吸附百分比 A_{ti} 对时间做图，可估计吸附过程的可逆性。如果解吸在2倍吸附平衡时间而达到，并且解吸量多于吸附量的75%，那此吸附可看作可逆的。

1.9.2.5.3.解吸等温线

弗里因德里希解吸等温线由吸附等温线所用土壤决定。实验进行已在“解吸动力学”一节中叙述，所不同只是水相在解吸平衡时只分析一次，计算解吸测定物的量。测定物仍然像土壤吸附一样把解吸平衡对溶液中测定物平衡浓度函数做图（见实验数据和实验结果报告和附录5）。

2. 实验数据和结果报告

分析数据列成表格形式（见附录6）。给出各个测量和平均求算。并给出吸附等温线图表。计算如下所述。

实验目的，考虑 1 cm^3 水溶液是 1g 。土壤/溶液比被表达成以 w/w 或 w/vol 为单位。

2.1.吸附

吸附（ A_{ti} ）决定为吸附物相对于一开始总量的百分比，在实验条件下，如果测定物是固定的并不对管壁吸附， A_{ti} 在每个时间点 t_i 可算，如下方程：

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) * 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

式中：

A_{ti} = 在 t_i 的吸附百分比（%）

m_s^{ads} = 在 t_i 土壤中吸附实验物质量(ug)

m_0 = 一开始实验物总质量(ug)

计算吸附百分比 A_{ti} 的细节信息和平行，系列方法见附录5。

分布系数 K_d 是土壤相中物质质量和水溶液中物质质量浓度之比，在实验条件下，当达到吸附平衡时。

$$K_d = \frac{c_s^{ads}(eq)}{c_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq) V_0}{m_{aq}^{ads}(eq) m_{soil}}$$

$$(\text{cm}^3\text{g}^{-1}) (4)$$

式中：

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 在吸附平衡时土壤中吸附物含量($\mu\text{g g}^{-1}$)

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 在吸附平衡时水相中物质的质量浓度($\mu\text{g cm}^{-3}$)

此浓度考虑空白实验校正：

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 在吸附平衡时土壤吸附物质量(μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 在吸附平衡时溶液中物质质量(μg)

m_{soil} = 土壤相量，干燥土壤质量 (g)

V_0 = 水相初始体积(cm^3)

A_{eq} 和 K_d 关系如下：

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3\text{g}^{-1}) (5)$$

式中：

A_{eq} = 在吸附平衡时吸附百分数 (%)

有机碳标准吸附系数 K_{oc} 与分布系数 K_d 和样品中有机碳含量：

$$K_{\text{oc}} = K_d \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3\text{g}^{-1}) (6)$$

式中：

$\%OC$ = 样品中有机碳百分比(g g^{-1})

K_{oc} 系数是一个单值，反映了非极性有机化合物和土壤或沉淀和水中的有机碳化合物的吸附与被吸收固体的有机物含量有关 (7)。因此， K_{oc} 值依赖于特殊典型的腐殖质

部分，这部分不同于化学吸着容量，取决于起源，基因等的不同。

2.1.1. 吸附等温线

弗里因德里希吸附等温线方程联系了吸附测定物的量和平衡时测定物浓度。(方程8)

如下“吸附”处理数据。对每个测定管，在吸附实验 ($C_s^{ads}(eq)$ ，别处指出x/m) 测定物含量的吸附可算。假定达到平衡并且 $C_s^{ads}(eq)$ 反映了平衡值：

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

弗里因德里希吸附方程如(8)：

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

化成线性形式：

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

式中：

K_F^{ads} = 弗里因德里希吸附系数；量纲为 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ 仅在 $1/n=1$ ；其它情况，
系数引进 K_F^{ads} 量纲 $(\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1})$ ；
 n =回归常量。 $1/n$ 取0.7-1.0，包括吸着数据常非线性。

方程(8)和(9)作图。 K_F^{ads} 值和 $1/n$ 由方程9计算，对数方程的作用系数 r^2 也求算。
类似图见下图：

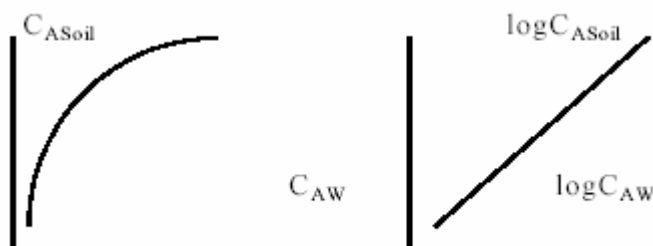


图2. 弗里因德里希吸附图，标准，线性。

2.1.2.平衡物料

平衡物料 (MB) 定义为被分析回收的吸附物量对实验开始的标称量的百分比。

如果溶剂与水混溶，数据处理有所不同。这种情况下，混合溶剂，如下“解吸”处理数据来决定萃取回收量。如不混溶，回收量的计算另用它法。

吸附平衡物料MB如下求算。假定 m_E 相应于以土壤和实验管壁萃取化合物总量；有机溶剂：

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

式中：

MB=平衡物料 (%)

m_E =从土壤和在测定管壁上萃取实验物的总质量 (ug)

C_0 =测定溶液一开始质量浓度(ug cm⁻³)

V_{rec} =吸附平衡后回收表面体积(cm⁻³)

2.2.解吸附

解吸 (D) 定义为在实验条件下，测定物解吸对于先前吸收的百分比：

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

式中：

D_{t_i} =在 t_i 的解吸百分比 (%)；

$m_{aq}^{des}(t_i)$ =在 t_i 从土壤中解吸实验物质量 (ug)

$m_s^{ads}(eq)$ =在吸附平衡时吸附实验物的质量 (ug)

怎样用平行和系列模型求算Dti 见附录5。

表观解吸系数(Kdes)是,在实验条件下,在土壤相中物质含量何在水溶液中解吸物的质量浓度之比,当达到解吸平衡时:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (cm^3 g^{-1}) \quad (12)$$

式中:

K_{des} =解吸系数($cm^3 g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ =解吸平衡时土壤中解吸物质总量 (ug)

V_T =在解吸动力学实验中水相总体积(cm^3)

计算 $m_{aq}^{des}(eq)$ 在附录5中的“解吸”一节中给出。

讨论

如果吸附实验先做并用平行方法,则方程12中的体积VT与V0一样。

2.2.1.解吸等温线

解吸等温线方程联系了土壤中仍被吸附的物质含量和在解吸平衡时溶液中实验物的浓度(方程16)。

对于每根管,在解吸平衡时土壤中仍吸附物质的含量计算如下:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu g g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ 定义为:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_f} - m_{aq}^A \quad (\mu g) \quad (14)$$

式中:

$C_s^{des}(eq)$ = 仍被土壤吸附的实验物含量($\mu\text{g g}^{-1}$)

$m_m^{des}(eq)$
= 水相中分析物质质量 (μg)

m_{aq}^A = 由于不完整体积取代留下的实验物质量 (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$
= 在吸附平衡时物质质量 (μg)

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = 解吸平衡时，从测量实验物的管中取出的溶液体积(cm^3)

V_R
= 在达到吸附平衡后从管中移出表面的体积和被0.01 M CaCl_2 溶液取代的同样体积(cm^3)

弗里因德里希解吸方程如下 (16)：

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

写成线性形式：

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

式中：

K_F^{des} = 弗里因德里希解吸系数

n = 回归常数

$C_{aq}^{des}(eq)$ = 在解吸平衡时水相中物质的质量浓度($ug\ cm^{-3}$)

方程 (16) 和 (17) 作图且 K_F^{des} 值和 $1/n$ 由方程 17 计算。

讨论：

如弗里因德里希解吸或吸附幂次 $1/n$ 为 1, 则它的连接常 (K_F^{ads} and K_F^{des}) 将等同于吸附或解吸的平衡常量 (K_d and K_{des}), 且图上的 C_s 对 C_{aq} 将成线性。如不为 1, C_s 对 C_{aq} 图将非线性且吸附和解吸常量将偏离等温线。

2.2.2. 实验结果报告。

实验结果报告应包括如下信息：

- 完整的土壤样品鉴定
- 地理参考 (经度, 纬度)
- 样品日期
- 用的品种 (如农业土壤, 森林的, 等等)
- 样品深度
- 沙, 淤泥, 黏土含量
- pH 值 (0.01 M $CaCl_2$)
- 有机碳含量
- 有机物含量
- 氮含量
- C/N 比
- 阳离子交换量
- 所有关于收集和贮存土壤样品的信息
- 所有关于解释吸附——解吸实验物质的信息

- 测定每一参数的相关方法
- 作为合适实验物的信息
- 实验温度
- 离心条件
- 分析步骤
- 准备用的贮存溶剂,溶解实验样品的溶解药剂的鉴定
- 解释计算中的相关校正
- 根据表格(附录6)和图表的数据
- 所有有助于解释实验实验结果的观察信息

3.参考文献

- Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
- Fränze O., Kuhnt G. and Vetter I., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory.
- UBA Report 106 02 045, Part I. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
- US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
- US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
- ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide.

Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

Calvet R., (1989), Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils., in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

Calvet R., (1980) Adsorption-Desorption Phenomena. in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.

van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media.. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.

McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis., in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), Movement and sorption of chemicals applied to the soil.. Weeds, 13, 185-190.

Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils.. J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.

Russell M.H., (1995), Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), .Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides., IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), .Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils.. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.

Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), .Persistence of herbicides in soil.. J. Sci. Fd Agric.,18, 269-273.

Burkhard N., and Guth J.A., (1981), .Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption.. Pestic. Sci. 12,45-52.

Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). .Effect of adsorption, movement and persistence on the Biological availability of soil-applied pesticides.. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.

Osgerby J.M., (1973), .Process affecting herbicide action in soil.. Pestic. Sci., 4, 247-258.

Guth J.A., (1972), .Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden.. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.

Hamaker J.W., (1975), .The interpretation of soil leaching experiments., in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. Freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

Helling C.S., (1971), .Pesticide mobility in soils.. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.

Hamaker J.W., (1972), .Diffusion and volatilization. in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.

Burkhard N. and Guth J.A., (1981), .Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system.. Pestic. Sci.12, 37-44.

Cohen S.Z., Creeger S.M., Carse R.F., and Enfield C.G., (1984), .Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses., in Treatment and Disposal of

Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

Gustafson D.I., (1989), .Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability.. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.

Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). .Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils.. J. of Soil Sci., 28, 340-350.

Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), .Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils.. Pest. Sci., 11, 389-395.

Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), .Sorption estimates for modeling., in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,

Lambert S.M., (1967), .Functional relationship between sorption in soil and chemical structure.. J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.

Hance R.J., (1969), .An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils.. J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.

Briggs G.G. (1969), .Molecular structure of herbicides and their sorption by soils.. Nature, 223, 1288.

Briggs G.G. (1981). .Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor.. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.

Sabljić A., (1984), .Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic pollutants by molecular topology.. J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.

Bailey G.W., and White J.L., (1970), .Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil.. Residue Rev., 32, 29-92.

Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), .Adsorption of organic herbicides by montmorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate.. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.

Karickhoff S.W., (1981) .Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils.. Chemosphere 10, 833-846.

Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), .Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB

Congeners.. Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.

Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). Adsorption in organic chemicals. in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

DeLi J., and Warren G.F., 1971, Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils..Weed Sci. 19:67-69.

Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils.. Weed Science, Vol. 23, 454-457.

Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations. in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International Atomic Energy Agency, Vienna.

Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), Methods for distributing pesticide Loss in field run-off between the solution and adsorbed phase., CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; Biological methods of analysis. First Edition (1994).

Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. Methods of Soil Analysis.,

Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.

ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.

ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

Green R.E., and Yamane V.K., (1970) .Precision in pesticide adsorption measurements.. Soil Sci. Am. Proc., 34, 353-354.

Grover R., and Hance R.J. (1970), .Effect of ratio of soil to water on adsorption of Linuron and atrazine.. Soil Sci., 109-138.

Boesten, J.J.T.I. .Influence of soil/Liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system.. Pest. Sci. 1990, 30, 31-41.

Boesten, J.J.T.I. . Influence of soil/Liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), . Comportement de substances herbicides dans Le sol en fonction de Leur structure chimique.. Weed Res. 21, 227-231.

Brown D.S., and FFlagg E.W., (1981), .Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments.. J. Environ.Qual., 10(3), 382-386.

Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), .Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water.. Environ. Sci. Technol., 17(4), 227-231.

GerstL Z., and Mingelgrin U., (1984), .Sorption of organic substances by soils and sediments.. J. Environm. Sci. HeaLth, B19 (3), 297-312.

VowLes P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), .Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons.. Chemosphere, 16(1), 109-116.

Lyman W.J. , ReehL W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). .ReLationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota. in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), .A physical concept of soil-water equilibria

for non-ionic organic compounds.. *Science*, Vol. 206, 831-832.

Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), .Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption.. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.

Karickhoff S.W., (1981), .Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils.. *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.

Moreale A., van Bladel R., (1981), .Adsorption de 13 herbicides et insecticides par Le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de L.Agric.*, 34 (4), 319-322.

Müller M., Kördel W. (1996), .Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil.. *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.

Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), .HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test.. *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.

Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), .HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.

Hance, R.J., (1967), .The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides.. *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.

Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), .The retention processes: mechanisms. in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.

Cohen S.Z., Creeger S.M., CarseL R.F., and Enfield C.G. (1984), .Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses., in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

Giles C.H., (1970), .Interpretation and use of sorption isotherms. in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.

Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), .Studies in adsorption: XI. A system of Classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils.. *J. Chem. Soc.*, 3973-93.

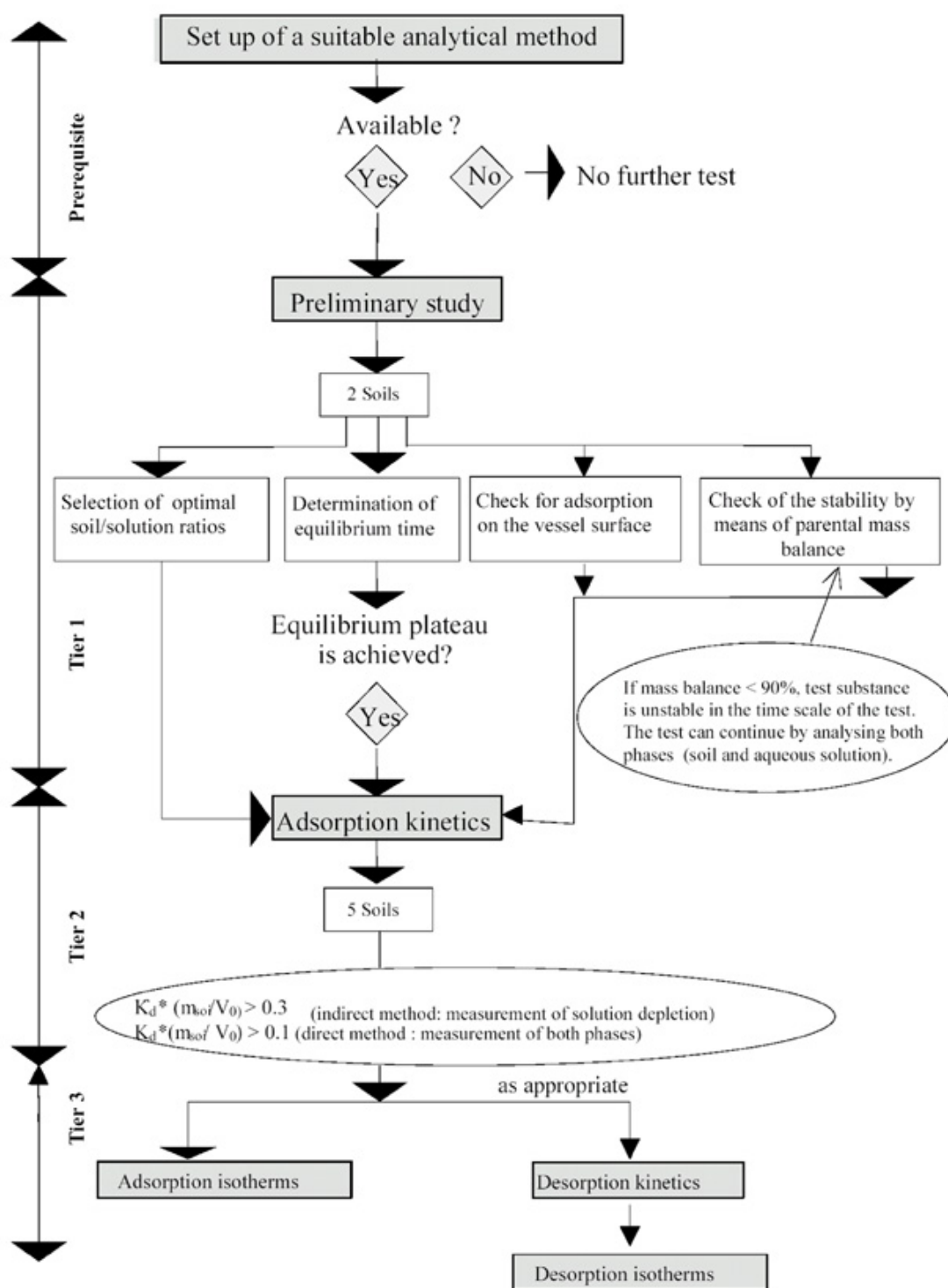
Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), .Adsorption des pesticides par Les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de L. adsorption.. Ann. Agron. 31: 239-251.

Bedbur E., (1996), .Anomalies in the Freundlich equation., Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

Guth, J.A., (1985), .Adsorption/desorption., in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

附件 1 检测图解

(图表)



(图表中的文字：)

建立一个合适的分析方法

首要条件

可行？

是 否 停止测定

初步研究

2 种土壤

最佳土壤/溶液比率的选择 平衡时间的决定 容器表面吸附的检查 通过亲本的平衡检查其稳定性

是否达到平衡稳态？

是

吸附动力学

如果质量剩余 < 90%，那么待测物在测定时间范围内是不稳定的。此时，测定可以通过对每一阶段（土壤和水溶液）的分析来进行。

5 种土壤

$K_d * (m_{soi} / V_0) > 0.3$ (间接方法：溶液损耗的测量)

$K_d * (m_{soi} / V_0) > 0.1$ (直接方法：对每一相的测量)

适当地

吸附等温线

解吸附动力学

解吸附等温线

附件 2

分析精度的影响和吸附实验结果的精度上的浓度改变

从下面的表格 (84) 可以明显地看出：当溶液中测定物初始质量和平衡质量的差异非常小时，平衡浓度测量 5% 的误差会导致土壤样品质量 ($m_s^{ads}(eq)$) 计算的 50% 误差和 K_d 计算的 52.4% 的误差。

土壤的量 $m_{soil} = 10g$

溶液体积 $V_0 = 100cm^3$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ (μg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (μgcm^{-1})	R	$m_s^{ads}(eq)^*$ (μg)	$C_s^{ads}(eq)^*$ ($\mu g g^{-1}$)	R_+	K_d^*	R_+
当 A=9%							
100	1.000	True value	10	1.00	True value	1	
101	1.010	1%	9	0.90	10%	0.891	10.9%
105	1.050	5%	5	0.50	50%	0.476	52.4%
109	1.090	9%	1	0.10	90%	0.092	90.8%
当 A=55%							
50.0	0.500	True value	60.0	6.00	True value	12.00	
50.5	0.505	1%	59.5	5.95	0.8%	11078	1.8%
52.5	0.525	5%	57.5	5.75	4.0%	10.95	8.8%
55.0	0.550	10%	55.0	5.50	8.3%	10.00	16.7%
当 A=99%							
1.100	0.011	True value	108.9	10.89	True value	990	
1.111	0.01111	1%	108.889	10.8889	0.01%	980	1.0%

	1.155	0.01155	5%	108.845	10.8845	0.05%	942	4.8%
	1.21	0.0121	10%	108.790	10.8790	0.10%	899	9.2%

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})]V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) V_0}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 平衡时土壤相中测验物的质量, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 平衡时水相中测验物的质量, μg ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 平衡时土壤相中测验物的质量分数, $(\mu\text{g}\text{g}^{-1})$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 平衡时水相中测验物的质量浓度, $(\mu\text{g}\text{cm}^{-1})$;

$R = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ 确定时产生的分析误差 ;

R_+^+ = 分析误差 R 造成的计算误差 ;

附录 3

K_d 的评估技术

1. 对于相关于很多因素的 K_d，例如：Pow 的值 (12)(39)(63-68)，水溶性数据 (12)(19)(21)(39)(68-73)，或源于反相 HPLC (高效液相色谱) 应用的极化数据 (74-76)，评估技术使对它的预测成为可能。如表 1 表 2 所示，K_{oc} 和 K_{om} 是从如下的公式中通过 K_d 间接算出的：

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (\text{cm}^3\text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%oc}$$

2. 这些相关性的结论基于两个假设：(1) 主要影响样品吸附的是土壤中的有机物质。(2) 涉及的反应大都是非极性的。其实验结果是：这些相互关系：(1) 不适用于极性样品，或者有少数例外；(2) 不适用于土壤中有机物含量太少的情况。另外，虽然满意的相互关系已经在 Pow 和吸附之间 (19) 找到，但是不能说水溶性和吸附程度的关系 (19)(21) 也一样；目前的研究是还很矛盾的。

3. 吸附系数和辛醇-水的分配系数的相互关系的一些例子，以及水溶性都个别的列在表 1 和 2 中。

表 1

吸附系数和辛醇-水的分配系数的相互关系的

一些例子；更多的例子见(12)(68)。

物质	相互关系	作者
取代脲	$\text{Log } K_{om} = 0.69 + 0.52 \text{ Log } P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
氯代芳烃	$\text{Log } K_{oc} = -0.779 + 0.904 \text{ Log } P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
	$\text{Log } K_{om} = 4.4 + 0.72 \text{ Log } P_{ow}$	GerstL and Mingelgrin (1984) (66)
芳烃	$\text{Log } K_{oc} = -2.53 + 1.15 \text{ Log } P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

表 2

吸附分布系数和水溶性相互关系的一些例子；更多的例子见(68) (69)。

化合物	相互关系	作者
各种杀虫剂	$\text{Log } K_{om} = 3.8 - 0.561 \text{ Log } S_w$	GerstL and Mingelgrin (1984) (66)
脂肪族或芳香族的氯代物	$\text{Log } K_{om} = (4.040 \pm 0.038) - (0.557 \pm 0.012) \text{ Log } S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
-萘酚	$\text{Log } K_{oc} = 4.273 - 0.686 \text{ Log } S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)

<p>环烷烃,脂肪族和芳香族 物质</p>	<p>Log Sw LogKoc = - 1.405 - 0.921 Log Sw - 0.00953 (mp- 25)</p>	<p>Karickhoff (1981) (72)</p>
<p>其余多种化合物</p>	<p>Log Kom = 2.75 - 0.45 Log Sw</p>	<p>MoreaLe van BLade (1982) (73)</p>

附件 4

计算确定离心条件

1. 假定对球形微粒，离心时间由如下公式确定：

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(Rb/Rt) \quad (1)$$

为了简化，没有完全使用SI单位(g, cm).

如下：

ω = 角速度(=2 _ rpm/60), rad s⁻¹;

$\frac{r_p}{m}$

= 每分钟的转数；

η = 溶液粘度，g s⁻¹ cm⁻¹；

r_p = 微粒半径，cm；

ρ_s = 土壤密度，g cm⁻³；

ρ_{aq} = 溶液密度，g cm⁻³；

Rt = 离心机中心转轴到离心试管顶部溶液的距离；cm；

Rb = 离心机中心转轴到离心试管底部溶液的距离；cm；

$Rb-Rt$ = 离心试管中混浊液的长度，cm；

在实际的实践中，为保证完全地分离，我们使用双倍计算获得的时间。

2. 如果我们将粘性 (η) 和密度 (ρ_{aq}) 考虑为25 °C 水中的情况，那么方程 (1) 就可以进一步简化；因而， $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ， $\rho_{aq} = 1.0 \text{ g cm}^{-3}$ 。

那么，离心时间的计算简化为下式 (2)：

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt}$$

3.方程(2)显示了有两个参数在确定离心状态时是很重要的：时间和速度。为达到使特定大小的微粒（半径 $0.1\ \mu\text{m}$ ）分离的目的：(1)土壤的密度和(2)离心试管中混合物的长度(Rb-Rt)，即从试管底部到液面土壤微粒覆盖的长度；明显地，对以固定体积，试管中混合物的长度和试管半径的平方有关。

4. Fig 1显示了在不同密度 ρ_s (Fig.1a)和混合物的长度时离心时间(t)对离心速度(rpm)的变化(Fig.2a)。从Fig.1a 看来土壤密度的影响很明显；例如，对 1.2g cm^{-3} 密度的土壤进行标准的离心操作，转速3000 rpm 时间大约240分钟，但对于 2.0g cm^{-3} 密度时仅仅需要50分钟。类似的，从Fig 1b看，对长10厘米的样品进行标准的离心操作，转速3000 rpm 时间大约50分钟，而对长1厘米的样品仅需7分钟。然而，最重要的是找到一个离心过滤最合理的关系，那要求尽可能短的长度和离心后简单的分离操作。

5. 另外，当为混合相分离定义了实验条件，最重要的是考虑有没有第三相，胶体的存在。这些大小小于 $0.2\ \mu\text{m}$ 的微粒可能会对土壤悬浊液样品整个的吸附机制产生重要影响。当离心操作如上述一样完成了，胶体仍然留在水相并融入了水相其他分析的实验结果。这样，关于他们的信息就丢失了。如果实验室有超速离心或设备，土壤样品的吸附或解吸附过程会有更深的研究，包括胶体的吸附。这样，60,000 rpm 的超速离心法或100,000 DaLtons的超滤法可被用来进行溶液，胶体，固相三相分离。测定预案也应因此而改进以使所有的三种相都被分析到。

Centrifugation speed = 离心速度；

Centrifugation time =离心时间；

Day = 天；

Hour = 小时；

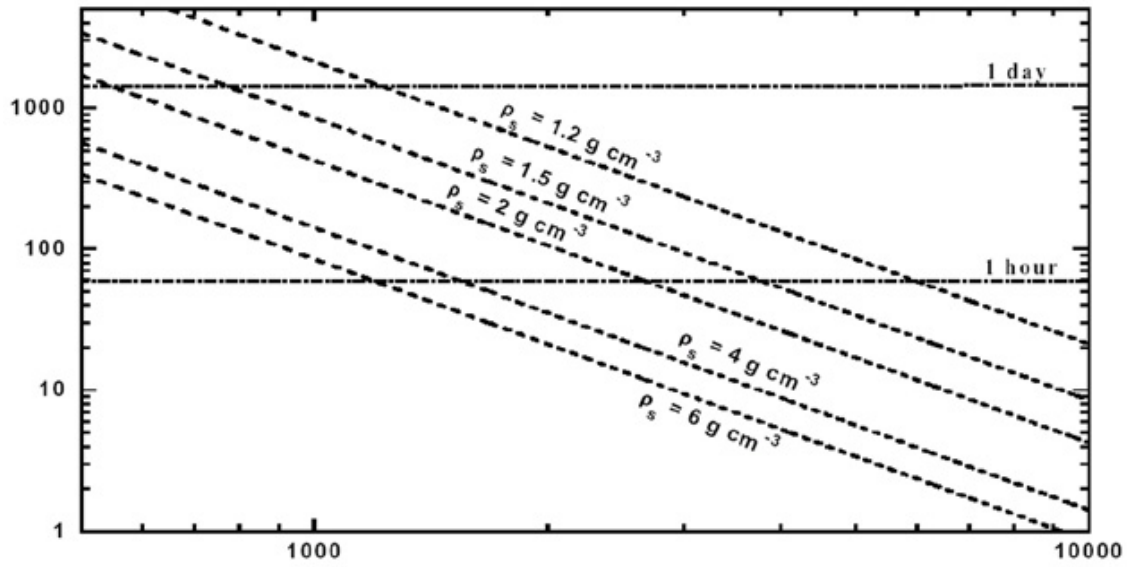


Fig. 1a. 不同土壤密度 ρ_s 下离心时间 (t)对离心速度(rpm)的变化. $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\omega = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{aq} = 1.0 \text{ g cm}^{-3}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Centrifugation speed = 离心速度 ;

Centrifugation time = 离心时间 ;

Day = 天 ;

Hour = 小时 ;

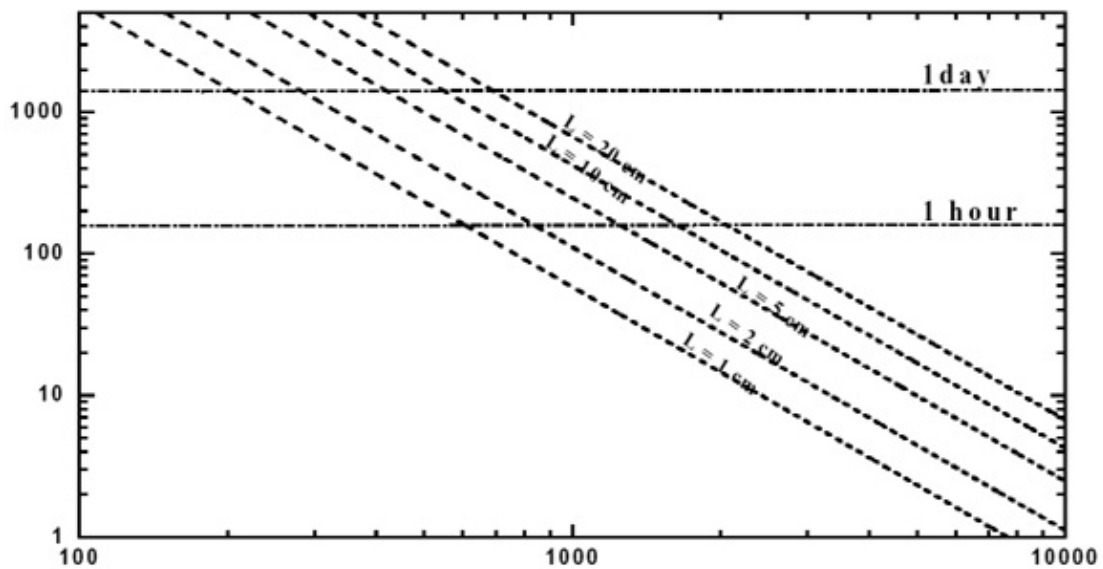
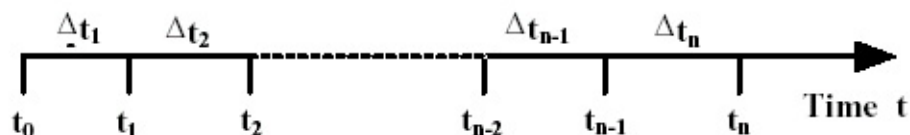


Fig. 1b. 不同混合物的长度($R_b - R_t$) = L时离心时间 (t)对离心速度(rpm)的变化。 $R_t = 10$ cm, $\omega = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1.0 \text{ g cm}^{-3}$ at 25 °C and $\rho_s = 2.0 \text{ g cm}^{-3}$ 。

附件5

吸附A (%)与解吸附D (%)的计算

步骤的时间安排：



所有的计算都有一个假设：检测物稳定且不被容器壁吸附。

吸附A (%)

a) 平行方法

每一个时间里每个试管的吸附百分率都由如下方程算出：

$$A = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (1)$$

各变量计算如下：

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

其中：

A_{t_i} = t_i 时的吸附百分率；

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ =分析完成的 t_i 时测定物的质量， μg ；

m_0 =开始测定时的试管中测定物的质量， μg ；

C_0 =待测溶液的初始质量浓度，；

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ =测量结束 t_i 时水相中的物质质量浓度， $\mu\text{g cm}^{-3}$ ；这个浓度通过对表格中的数据得分析来决定。

V_0 = 土壤的测定溶液的初始体积, cm^3 ;

吸附百分率 A_{t_i} 和 $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ 对时间做图, 在吸附平衡达到之后的时间也同样被决定。这些划分分别在Fig.1和Fig.2中给出。

EquiLibration time = 平衡时间

Percentage adsorption = 吸附百分率

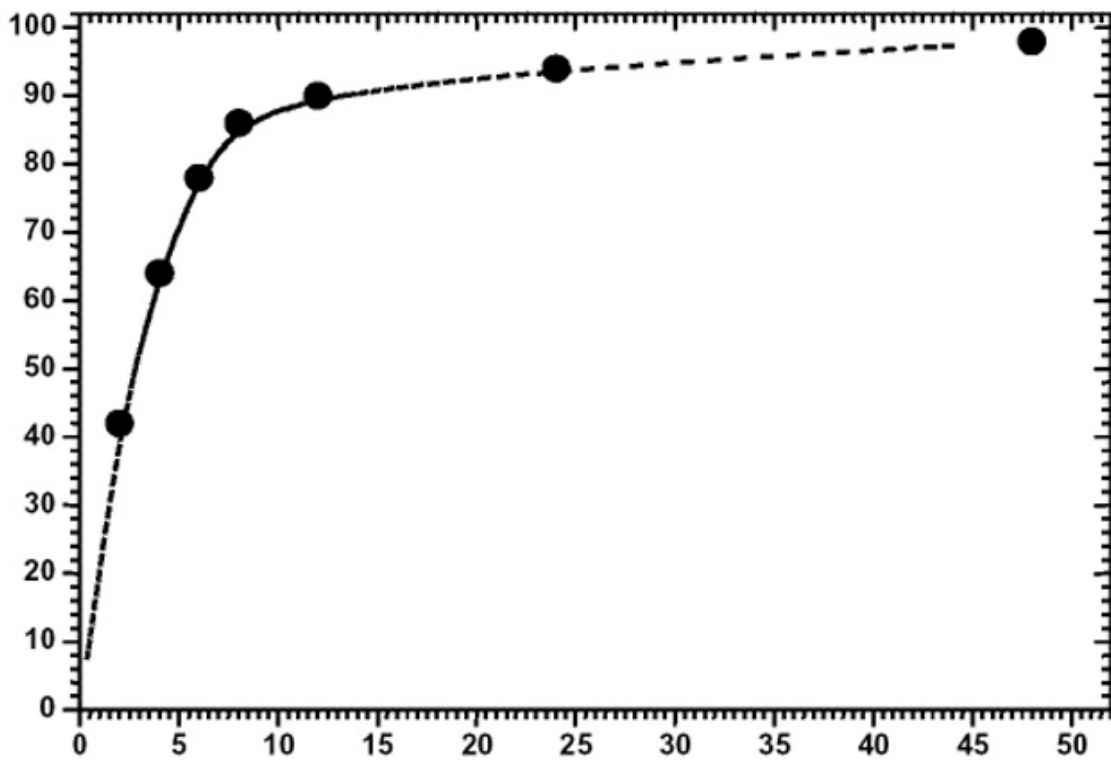


Fig. 1. 吸附平衡分布图

EquiLibration time = 平衡时间

Concentration = 浓度

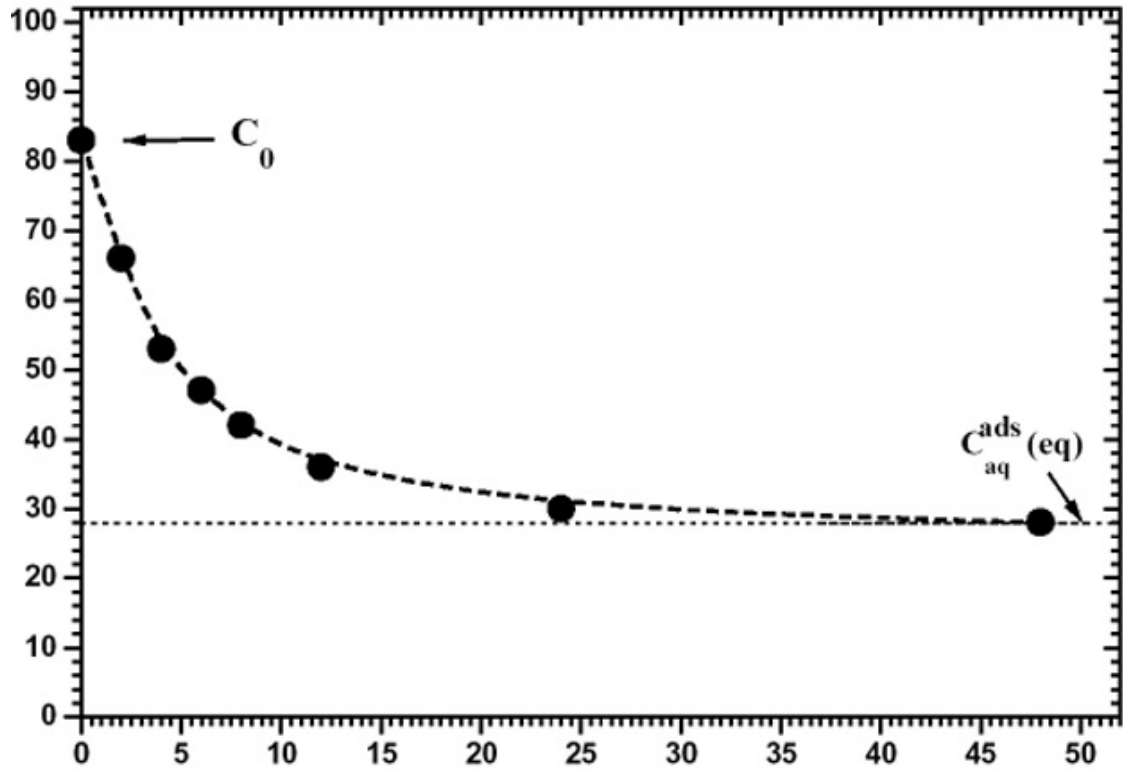


Fig.2. 水相中测定物的质量浓度 C_{aq} 对时间图

b) 连续方法

如下的方程考虑到一小部分水相中的检测样品在详细时间间隔中的测量完成使吸附步骤结束。

在每一份时间间隔中，样品在固体上吸附的量计算如下：

对第一个时间间隔： $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

对第二个时间间隔： $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

对第三个时间间隔： $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

对第 n 个时间间隔： $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1)v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

每一时间段的吸附百分率 $A_{\Delta t_i}$ 如下计算：

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (8)$$

当 t_i 时的吸附百分率：

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (9)$$

A_{t_i} 和 $A_{\Delta t_i}$ 的值（从研究的需要来看）与时间相关，吸附达到平衡后的时间也被决定。

在平衡时间 t_{eq} ：

被吸附的检测物质量：

$$m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

溶液中的检测物质量：

$$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)$$

平衡时的吸附百分率：

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (12)$$

其中各参数的意义如下：

$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1)$, $m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2)$, $m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ =分别是各时间段 Δt_1 , Δt_2 , Δt_n 内，土壤吸附的物质质量， μg ；

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$ = 分别是 t_1, t_2, \dots, t_n 时 V_a^A 内的物质质量, μg ;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 平衡时土壤吸附的物质质量, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 平衡时溶液中的物质质量, μg ;

V_a^A = 所测部分物质的体积, cm^3 ;

$A_{\Delta t_i}$ = 一个时间段 Δt_i 中的吸附百分率, % ;

A_{eq} = 平衡时的吸附百分率 ;

解吸附 D%

解吸附试验的起始时间 t_0 被认为是 (达到吸附平衡后) 检测物溶液被其最大恢复体积等体积的 0.01 M CaCl_2 溶液代替的时刻。

a) 平行方法

在时间点, 测定物的质量从试管中 $i(V_r^i)$ 的液相中测出, 而解吸附的质量由下式得到 :

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{\text{aq}}^A \quad (13)$$

当解吸附平衡时, $t_i = t_{\text{eq}}$, 因此, $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ 。

在一时间段 Δt_i 内, 解吸附的质量如下 :

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

t_i 时的解吸附百分率 :

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (15)$$

在 Δt_i 内 :

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (16)$$

其中 :

D_{t_i} = t_i 时的解吸附百分率, % ;

$D_{\Delta t_i}$ = Δt_i 内的解吸附百分率, % ;

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = t_i 时检测物的解吸附质量, μg ;

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = Δt_i 内检测物的解吸附质量, μg ;

$m_m^{des}(t_i)$ = t_i 时检测的体积为 V_r^i 的溶液中检测物的质量, μg ;

m_{aq}^A = 解吸附平衡时由体积取代的不完全造成的检测物的质量残留, μg ;

$$m_{aq}^A(eq) = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$	= 吸附平衡时溶液中检测物的质量, μg ;
V_R	= 吸附平衡后脱离试管的漂浮物被同体积 0.01 M CaCl ₂ 取代的体积, cm^3 ;
V_r^i	= 在解吸附动力学实验中从试管中取出的含待测物的溶液体积, cm^3 。

D_{t_i} 和 $D_{\Delta t_i}$ 的值 (从研究的需要来看) 与时间相关, 吸附达到平衡后的时间也被决定。

b) 连续方法

下列方程考虑了先前的步骤中以液相一小部分 V_a^A 中检测物的测量为结束 (见 1.9 Performance of the test 连续方法)。假定: a) 吸附平衡后脱离试管的漂浮物被同体积 0.01 M CaCl₂ 取代的体积 (V_R) 和 b) 实验进行中和土壤相关的液相总体积都在方程中给出:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

在 t_i 时刻:

一份检测物 V_a^D 的质量和解吸附质量通过下式计算:

$$(19)$$

当解吸附平衡， $t_i = t_{eq}$ ，因此， $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ 。

解吸附百分率 D_{t_i} 如下：

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (20)$$

对于时间段 Δt_i ：

在一时间段中物质的解吸附的量如下计算：

对第一个时间间隔： $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{V_a^D} \right) - m_{aq}^A, \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

对第二个时间间隔： $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{V_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T} \right),$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

对第 n 个时间间隔： $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{V_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{V_T - (n-1) \cdot v_a^D}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{V_T - (n-1) \cdot v_a^D}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right)$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

最后，每一时间段的吸附百分率 $D_{\Delta t_i}$ 如下计算：

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

当 t_i 时的解吸附百分率：

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

各参数定义如下：

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1)$, $m_s^{\text{des}}(\Delta t_2)$, $m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$ =分别是在 Δt_1 Δt_2 Δt_n 等时间间隔之后仍吸附在土壤上的物质质量 , μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1)$, $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2)$, $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ =分别是在 Δt_1 Δt_2 Δt_n 等时间间隔中吸附的检测物质量 , μg ;

$m_m^{\text{des}}(t_1)$, $m_m^{\text{des}}(t_2)$, $m_m^{\text{des}}(t_n)$ =各时刻 t_1 , t_2 t_n 时 , v_a^{D} 部分物质的质量 , μg ;

V_T = 在解吸附动力学实验连续方法中 , 与土壤有关的液相总体积 , cm^3 ;

m_{aq}^{A} =吸附平衡时不完全的溶液取代造成的残留检测物的质量 , μg ;

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = 吸附平衡之后被等体积的0.01 M CaCl_2 溶液取代的飘浮物体积 , cm^3 ;

v_a^{D} =在解吸附动力学实验连续法进行中分析目标部分的体积 , cm^3 ;

$$v_a^{\text{D}} \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

土壤重量	-	g								
土壤：干重	m_{soil}	g								
土壤中水的体积（计算得到）	V_{ws}	cm^3								
0.01M 氯化钙溶胶与土壤平衡时的体积		cm^3								
储备溶液的体积	V_0	cm^3								
与土壤接触的液相总体积	C_0	$\text{ug} \cdot \text{cm}^{-3}$								
测定溶液最初的浓度	M_0	ug								
开始实验时待测物质的质量										

搅拌离心后

直接方法

平行的方法										
测定物质液相的空白修正	C_{AQ}^{A} DS									
连续方法										
量度测定物质的整体质量	$m_{\text{m}}^{\text{ads}}$ (t_i)	ug								
直接方法										
称出测定物质被土壤吸收的质量	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}$ (t_i)	ug								

计算吸收

吸收	A_{ti}	%								
	A_{ti}	%								
方法										
吸收系数	K_d	cm^3 $\cdot\text{g}^{-1}$								
方法										
吸收系数	K_{oc}	cm^3 $\cdot\text{g}^{-1}$								
方法										

测定物质：

测定的土壤：

土壤的干重 (105C⁰, 12h)：

温度：

吸附测定：空白和控制

	符号	单位	空白		空白		控制	
试管号码								
土壤重量		g						
土壤中水的质量		Cm ³						
0.01M 氯化钙溶胶与土壤平衡时的体积		Cm ³						
加入测定物质的储备液体积		Cm ³	0	0				
总的液相体积		Cm ³						
最初测定物在水相中的浓度		ug.c m ³						
搅拌和离心后								
水相的浓度		ug.c m ³						

备注：如果需要的话添加表格

测定物质：

测定的土壤：

干燥的土壤重量：

温度：

质量平衡

	符号	单位			
试管号码					
土壤重量	-	g			
土壤干重	m_{soil}	g			
土壤中的水的体积	V_{ws}	mL			
0.01M 氯化钙溶胶与土壤平衡时的体积		mL			
储备溶剂的体积		cm^3			
与土壤接触的液相总体积	V_0	cm^3			
溶液最初浓度	C_0	$\text{ug}\cdot\text{cm}^{-3}$			
平衡时间	-	h			
搅拌和离心后					
吸附平衡后测定物质在液相中的浓度	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$\text{ug}\cdot\text{cm}^{-3}$			

平衡时间		t_{eq}	h			
第一次用溶剂冲淡						
移走的液相体积		V_{rec}	cm^3			
增加的溶剂体积		v	cm^3			
第一次用溶剂萃取						
溶剂的分析信号	S_{EI}	var.				
溶剂中测定物质的浓度	C_{EI}	$ug.cm^{-3}$				
从土壤和容器中萃取的物质质量	m_{EI}	$ug.cm^{-3}$				
第二次用溶剂稀释						
移取溶剂的体积	V_s	cm^3				
增加溶剂的体积	V	cm^3				
用溶剂第二次萃取						
溶剂的分析信号	S_{E2}	var.				
溶剂中测定物质的浓度	C_{E2}	$ug.cm^{-3}$				

从土壤和 容器萃 取出的物质 质量	m_{E2}	ug				
两次萃 取出的总质 量	m_E	ug				
质量平衡	MB	%				

测定物质：

测定的土壤：

土壤干重：

温度：

吸收等温线

	符号	单位								
试管号码										
土壤重量	-	g								
土壤干重	E	g								
土壤中水的 体积	V_{ws}	cm^{-3}								
0.01M 氯化 钙溶胶与土 壤平衡时的 体积		cm^{-3}								
储备溶液 的体积		cm^{-3}								
与土壤接 触的液相体 积	V_0	cm^{-3}								
溶液浓度	C_0	$\mu g \cdot cm^{-3}$								
平衡时间	-	h								
搅拌和离心之后										

液相 中物 质浓 度,空 白矫 正后	C_{aq}^{ads} (eq)	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$								
温度										
每单 位重 量土 壤吸 收的 质量	C_s^{ads} (eq)	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$								

衰减分析：

K_F^{ads} 值：

1/n 值：

衰减系数 r^2 ：

测定物质：

测定的土壤：

土壤干重：

温度：

跟踪分析： 间接方法 () 平行方法 () 连续方法 ()

解吸附测定

	符号	单位	时间 间隔	时间间 隔	时间间 隔	时间间隔
吸附测定中的试管的号码						
吸附平衡时 土壤吸附的 物质质量	$M_s^{ads}(eq)$	ug				
移走液相的 体积，被 0.1 M氯化 钙代替	V_R	cm^3				
与土壤接 触的液相 的总体积	P M	V_0	cm^3			
	S M	V_T	cm^3			
吸附平衡时 剩余的测定 物质的质量	m_{aq}^A	ug				

置换						
解吸附动力学						
T_I 时间从土 壤中解吸附 出的物质质 量	$M_m^{des}(t_i)$	ug				

为量度测定物质而从试管 (i) 中移走的溶液体积	P	V_r^i	cm^3				
	M	V_a^D	cm^3				
	S						
	M						
T_1 时间从土壤中解吸附出的物质质量		m_{aq}^{ads} (t_1)	μg				
在时间段 t_1 中解吸附的物质质量		m_{aq}^{ads} (t_1)	μg				
解吸附百分数							
在 t_1 解吸附的量		D_{t_1}	%				
在时间段 t_1 解吸附的量		D_{t_1}	%				
表观的解吸附系数		K_{des}					

P M : 平行方法

S M : 连续方法

C1 使用高效液相色谱 (HPLC) 对土壤和污泥的吸附系数 (K_{oc}) 进行评价

1. 方法

这种方法和 OECD TG121 (2000) 是相同的。

1.1 引言

在土壤和淤泥中的物质的吸附作用可以通过测定方法C.18的实验参数决定。一个重要的参数就是吸附系数，它被定义为在吸附平衡时在土壤（或淤泥）里的物质集合和在水相中的物质的集合的比率。吸附系数正比于土壤中有有机化合物的含量， K_{oc} 指示了一种化合物在土壤和淤泥中的有机物上的吸附容量，不同的化合物的 K_{oc} 是不同的，可以做比较。这一个参数可通过水溶性和正辛醇/水体系分配系数的相互关系估计。

在本章中所叙述的这种实验方法使用HPLC对土壤和淤泥里的吸附系数 K_{oc} 进行估计。这种估算比用QSAR计算有更高的可靠性。作为一种估计方法它不能完全代替在18章中介绍的组分平衡法(batch equilibrium)实验。但是估算的 K_{oc} 对于选择合适的吸附/解吸附测量参数，即第18章中根据方程3（见1.2）得到的 K_d （分配系数）或 K_f （Freundlich 吸附系数）。

1.2 定义

K_d :分配系数被定义为吸附平衡时在两相（即吸附剂（土壤或淤泥）和水相）中溶解的测定物质的含量的比率；当在两相中的含量都用 重量/重量 表达的时候它是一个无量纲的量。万一在水相中的含量用 重量/体积 表达，那么分配系数的量纲就是 $mL.g^{-1}$ 。 K_d 会因吸附剂性质的不同而不同。

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \quad (1)$$

这里：

C_{soil} =平衡时在土壤中测定物质的浓度 ($ug.g^{-1}$)

C_{slud} =平衡时在淤泥里的测定物质的浓度 ($ug.g^{-1}$)

C_{aq} =平衡时在水相里的测定物质的浓度 ($ug.g^{-1}, ug.mL^{-1}$) .

K_f : FreundLich 吸附系数被定义为平衡时当测定物质在水相中的浓度 C_{aq} 等于 1 时测定物质在土壤或淤泥中的浓度 (x/m); 单位是 $ug.g^{-1}$ 。这个量随吸附剂性质的不同而改变。

$$\text{Log}^{x/m} = \text{Log}K_f + 1/n \cdot \text{Log}C_{aq} \quad (2)$$

这里：

x/m = 平衡时吸附剂的量 $m(g)$ 吸附测定物质的量 $x(ug)$

$1/n$ = FreundLich 吸附等温线的斜度

C_{aq} = 平衡时测定物质在水相中的浓度 ($ug.mL^{-1}$)

当 $C_{aq}=1$ 时, $K_f = \text{Log}(x/m)$ 。

K_{oc} : 分配系数 (K_d) 或 FreundLich 吸附系数 (K_f) 正比于吸附剂中有机化合物的含量; 尤其是非离子型化合物, 它对于吸附剂对一种物质的吸附程度是一个近似的指示, 而且在不同的化合物之间是不同的。依靠 K_d 和 K_f 这两个量 K_{oc} 可以是无量纲的或有单位 $mL.g^{-1}$ 或 $ug.g^{-1}$ 有机物。

$$K_{oc} = K_d / f_{oc} (\text{无量纲或 } mL.g^{-1}) \text{ 或 } K_f / f_{oc} (ug.g^{-1}) \quad (3)$$

K_{oc} 和 K_d 的关系不总是线性的, 并且 K_{oc} 值随土壤的不同而改变, 但是它的可变性与 K_d 和 K_f 值比已经大大的降低了。

吸附系数 (K_{oc}) 是从容量因子 (k') 推论来的, 对选定的化合物用 $\text{Log}k'$ 对 $\text{Log}K_{oc}$ 作图。

$$K = (t_R - t_0) / t_0 \quad (4)$$

这里：

t_R : HPLC 中测定和相关物的保留时间

t_0 : HPLC 中的死亡时间 (见 1.8.2)

P_{ow} : 辛醇——水体系的分配系数被定义为在正辛醇和水中溶解的物质的浓度比, 它是无量纲的值。

$$P_{ow} = C_{octanol} / C_{aq} (=K_{ow}) \quad (5)$$

1.3 参考物质

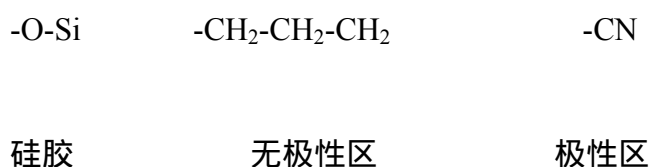
在使用此方法之前结构式, 纯度和裂分衡量 (如果适当的话) 都应已知。物质在水中和有机溶剂中的溶解性, 辛醇——水体系的分配系数和水解特征对于实验都是非常有用的。

为了使测定物质的 HPLC 保持力数据与它的吸附系数相关联, 就要建立一个 $\text{Log}K_{oc}$ 对 $\text{Log}k'$ 的有刻度的图象。最少要有 6 个相关的点, 其中至少包含一个在预期值上方和一个

在预期值下方的点。如果选用的参考物和测定物质在结构上是相似的，那么这种方法的精确度可以被大大地提高。如果这些数据不可以利用，就要实验者去选择合适的标度物质。在这种情况下，要选择一系列更普遍的在结构上互不相同的物质。一些物质的 K_{oc} 值被列在附录表中，供参考用，表 1 关于淤泥，表 3 关于土壤。其他标度物质的选择要被证明是适当的。

1.4 实验原理

HPLC 主体是一个商品 cyanopropyl 键合硅胶的分析圆柱，这种固体包括亲脂的和极性的两极。现代的固定相主要是应用无水硅胶矩阵：



这种测量方法的原理和测定方法 A.8 很相似（分配系数，HPLC 法）。当测定物质变为移动相通过圆柱时测定物质与固定相相互作用。由于移动相和固定相之间的作用，测定物质受到阻碍而减速。固定相中的两种组成有极性和非极性部分，可与它种物质分子的极性和非极性集团作用，类似于在土壤和淤泥中同样有吸附作用的有机物。这就使在圆柱上的保留时间和有机物质的吸附系数建立起关系。

pH 对于吸附作用尤其是对极性物质的吸附有着很大影响。大多数的耕作土壤和灌溉用水的 PH 值都在 5.5 到 7.5 之间。

对于可电离的物质，应在适当的缓冲溶液中分别做全电离和不电离形式的两个实验，只有在 PH 值为 5.5 到 7.5 之间时测定物的解离度至少有 10%。

当在高效液相色谱柱上的保持力和吸附系数的关系确定以后，其他的定量的分析方法都是不需要的，只有前者确定的保留时间是必要的。如果选用一系列的合适的内标物质和标准的实验条件，这种方法提供了一个即快又高效的途径来评估吸附系数 K_{oc} 。

1.5 测定的适用性

只要检测系统（例如分光光度计，放射能检测器）是可用的并且在实验过程中是高效稳定的，高效液相色谱法适合于各种化学物质（标定的或未标定的）。尤其适合于测量在其

他实验系统中不易被研究的化学物质（例如挥发性物质；在水中不能溶解或溶解度小到不能被其他分析方法检测的物质；在物质表面有很高亲和力的物质）。这种方法还可用于测定未洗提过的混合物。在这种情况下，测定的混合物的 LogK_{oc} 值的上限和下限应该是一定的。

有时杂质对解释高效液相色谱实验结果有很大影响，但只要把测定物质的分析实验结果确定并把它同杂质相分离就可以了。

这种方法的被验证的物质列于附录 1 中，并且提供了属于这种类型的其他各种各样的化学物质：

——芳族胺（例如：氟乐灵，4-氯苯胺，3，5-二硝基苯胺，4-甲基苯胺，N-甲基苯胺，萘胺）；

——芳香羧酸酯（例如：安息香酸甲酯，3，5 二硝基苯甲酸乙酯）；

——芳香烃（例如：甲苯，二甲苯，乙苯，硝基苯）；

——芳氧基苯氧基丙酸酯（例如：二氯苯氧基苯氧基丙酸甲酯，fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl）；

——苯并咪唑和咪唑杀真菌剂（例如：carbendazim, 呋喃基苯并咪唑，triazixide）；

——羧酸氨基化合 2-chlorobenzamide, N,N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-methylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide)；

——氯化烃（例如：硫丹，DDT，六氯苯，五氯硝基苯，1，2，3-三氯(代)苯）；

——有机磷杀虫剂（如保棉磷，乙拌磷，fenamiphos，isofenphos，定菌磷，sulprofos，triazophos）；

——苯酚类（如苯酚，2-硝基苯酚，4-硝基苯酚，五氯苯酚，2,4,6-三氯苯酚，1-萘酚）；

——苯基脲类衍生物（如 isoproturon，monolinguilism，pencycuron）；

——色素染料（如酸黄 acid yellow 219，本蓝 41，direct red 81）；

——杂环芳烃(如萘嵌戊烷，萘)；

——1,3,5-三嗪类除草剂（如 prometryn，proparea，西玛津，去草净）；

——三唑衍生物（如 tebuconazole，triadimefon，氯苯氧基二甲乙基三唑乙醇，triapenthenol）

此法对于与洗脱液或固定相反应的物质不适用，对一些可以与无机成分发生特殊相互作用的物质（如稀土元素的簇状配合物）也不适用，对表面活性物质，无机化合物，中强

或强有机酸和碱可能不起作用。Log K^{oc} 测定范围为 0.5~5.0。可电离的物质必须利用缓冲流动相测量，但是必须注意避免缓冲物或被测物的析出。

1.6 定量标准

1.6.1 精确度

通常，被测物的吸收系数值与组分平衡法 batch equilibrium method 测得的数值大约相差 ± 0.5 （见附表 1）。如果所用参照物和被测物结构相似，可以得到更高的精确度。

1.6.2 可重复性

测定至少进行两次。每次独立测量得出的 Log K^{oc} 值误差不超过 0.25。

1.6.3 再现性

目前用这种方法完成的实验均支持其正确性。一项 HPLC 的研究，使用了 48 种物质（大多数为杀虫剂）测得土壤的一系列可靠数据，显示了一个有效系数 $R=0.95(10)(11)$ 。

一个由 11 个实验室参加的室内对照实验旨在改进并确认这种方法（12）。实验结果见附表

1.7 实验方法描述

1.7.1 吸收系数的初步估计

辛醇-水体系的分配系数 P^{ow} ($=K^{ow}$)，在一定范围内，水的溶解度，尤其对于非离子化物质，可以作为吸收范围内的指示剂，因此用于初步的范围估测。若干组化学试剂的多种有效测量方法已出版(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)。

1.7.2 仪器设备

一台装备自动脉冲泵和适宜的检测器的液相色谱仪。建议使用带有注射环的注射阀，使用商品化 cyanopropyl 键合硅胶固定相(如 hypersil 和 zorbax CN)。将同种物质构成的保护柱置于注射系统和分析柱之间，含不同填充物的分析柱的分离效果有显著差别。使用 55% 甲醇水溶液作为流动相时，下述的容量因子 k_1 必须满足：Log $K^{oc}=3.0$ 时, Log $k_1 > 0.0$ ；Log $K^{oc}=2.0$ 时, Log $k_1 > -0.4$ 。

1.7.3 流动相

一些流动相已经经过实验检验，现推荐以下两种：

——甲醇:水(V:V)=55%: 45%

——甲醇:0.01M PH=0.6 的柠檬酸缓冲液(V:V)= 55%: 45%

用 HPLC 等级的甲醇和蒸馏水或柠檬酸缓冲液作为固定液，使用前需经过去磁处理。采用梯度洗脱法 isocratic eLution。如果甲醇水溶液不适用，可尝试采用其他有机溶剂水溶液，如乙醇或乙腈水溶液。对于电离组分，建议采用缓冲措施以稳定 pH。一些有机相缓冲体系，实验中应注意避免盐的沉淀和柱管的失效。

不可使用离子对试剂一类的添加剂，否则会影响固相的吸收性能，而固相的改变是不可逆的。因此，需用添加剂的实验必须使用另外的柱管完成。

1.7.4 溶质

被测物和参照物应溶解在流动相中。

1.8 测定操作

1.8.1 测定条件

测量过程中记录温度。强烈推荐使用可控温的柱管室，以确保在校正，初估范围以及样品测定过程中，环境的温度不变。

1.8.2 死时间 t_0 的测定

有两种方法可用于测定死时间 t_0 （参见 1.2 节）

1.8.2.1 同系物法测定死时间

经验证，这种过程可以得到可靠而标准的 t_0 值。详见 testing method A8:PARTITION COEFFICIENT(N-OCTANOL/WATER),HPLC METHOD

1.8.2.2 利用不残留于柱管的情性物质测量死时间

这项技术基于甲酰胺溶液，尿素或硝酸钠的注入。测量至少进行两次。

1.8.3 保留时间 t_0 的测定

参照物的选择参见 1.3 节。

如果能确信各参照标准的保留时间不受其他参照物的影响，即可将参照物作为混合的标准，注入以测定其保留时间。每隔一段时间（至一日两次）就应该进行一次校正，从而估计仪器的变动误差。最好能在被测物注入前后各进行一次校准，确保保留时间不偏移。为避免柱管超载，注入量越少越好。保留时间是确定的。

为了提高可信度，至少应测量 2 次。每次测得的 Log Koc 相差不超过 0.25。

1.8.4 评价

根据方程 4(1.2 节),容量因子 k_1 由参照物死时间 t_0 和保留时间 t_R 求得。以参照物的 Log k_1 对 Log Koc (由组分平衡法 batch equilibrium method 测得，见附录表 1, 3)作图。利用此

图，通过被测物的 $\log k_1$ 来确定其 $\log K_{oc}$ 。如果实际实验结果显示被测物的 $\log K_{oc}$ 在校正范围以外，应寻找更适合的参照物重复实验。

2. 实验数据和结果报告

实验结果报告必须包括以下内容：

- 被测物和参照物的有关特性，纯度， pK_a 等；
- 设备和操作条件的描述，如分析柱和保护柱的类型及尺寸，测量方法，流动相（包括组成， pH ，测量过程中的温度范围等）；
- 死时间及其确定方法；
- 被测物，参照物的用量；
- $\log k_1$ 对 $\log K_{oc}$ 的回归线及其曲线图；
- 测量物的平均保留时间和 $\log K_{oc}$ 的估计值；
- 色谱图。

3. 参考文献

- 1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- 2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.
- 3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., B19, 1050-1059.
- 4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- 5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- 6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V.H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- 7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on nonionic organic compounds, Science, 106, 833-846.
- 8) W. KordeL, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for

the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35(1/2), 121-128.

9) M. Mueller, W. Kordel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.

10) W. Kordel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases. *Chemosphere*, 27(12), 2341-2352.

11) B. von Oepen, W. Kordel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106. *Chemosphere*, 22, 285-304.

12) W. Kordel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), 1373-1384.

附件

表 1

土壤和污水淤泥的 K_{oc} 值和 HPLC 放映法计算值的对比^{1,2}

Substance 物质 (化学农药)	CAS-No.	Log K_{oc} sewage sLudges 污水淤泥	Log K_{oc} HPLC		Log K_{oc} soils 土壤	Log K_{oc} HPLC	
Atrazine 阿特拉津	1912-24-9	1.66	2.14	0.48	1.81	2.2	0.39
Linuron 利谷隆	330-55-2	2.43	2.96	0.53	2.59	2.89	0.3
Fenthion 倍硫磷	55-38-9	3.75	3.58	0.17	3.31	3.4	0.09
Monuron 灭草隆	150-68-5	1.46	2.21	0.75	1.99	2.26	0.27
PHenanthrene 菲	1985-1-8	4.35	3.72	0.63	4.09	3.52	0.57
Benzoic acid pHenylEster 安息香酸苯酯	93-99-2	3.26	3.03	0.23	2.87	2.94	0.07
Benzamide 苯甲酰胺	55-21-0	1.6	1	0.6	1.26	1.25	0.01
4-Nitrobenzamide 4-硝基苯胺	619-80-7	1.52	1.49	0.03	1.93	1.66	0.27
AcetaniLide 乙酸苯胺	103-84-4	1.52	1.53	0.01	1.26	1.69	0.08
AniLine 苯胺	62-53-3	1.74	1.47	0.27	2.07	1.64	0.43
2,5-DichLoroaniLine 2,5-二氯苯胺	95-82-9	2.45	2.59	0.14	2.55	2.58	0.03

1 W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 - 128.

2 W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sLudges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 . 119.

表2

实验室（11个实验室共同参加）的内部比较实验结果

被执行去改进和生效HPLC法¹

物质	CAS-No. 代号	Log Koc [OECD 106]	Koc	Log Koc
			[HPLC-方法]	
Atrazine 莠去津(一种除草剂)	1912-24-9	1.81	78 ± 16	1.89
Monuron 灭草隆(一种除草剂)	150-68-5	1.99	100 ± 8	2
Triapenthenol (一种除草剂)	77608-88-3	2.37	292 ± 58	2.47
Linuron 利谷隆(一种选择性除草剂)	330-55-2	2.59	465 ± 62	2.67
Fenthion 倍硫磷(一种有机磷杀虫剂)	55-38-9	3.31	2062 ± 648	3.31

I W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

表3

HPLC 放映方法基于土壤吸附数据的中推荐的参考物质.

Reference substance 参考物质	CAS-No. 代号	Log Koc mean vaLues from batch equiLibrium	number of Koc data	Log S.D.	source
Acetanilide 退热冰	103-84-4	1.25	4	0.48	a
Phenol 苯酚	108-95-2	1.32	4	0.7	a
2-Nitrobenzamide 2-硝基苯胺	610-15-1	1.45	3	0.9	b
N.N-dimethylbenzamide	611-74-5	1.52	2	0.45	a

N,N-二甲基苯胺					
4-Methylbenzamide 4-甲基苯胺	619-55-6	1.78	3	1.76	a
Methylbenzoate 苯甲酸	93-58-3	1.8	4	1.08	a
Atrazine莠去津 (一种除草剂)	1912-24-9	1.81	3	1.08	c
Isoproturon	34123-59-6	1.86	5	1.53	c
3-Nitrobenzamide 3-硝基苯胺	645-09-0	1.95	3	1.31	b
Aniline苯胺	62-53-3	2.07	4	1.73	a
3,5-Dinitrobenzamide 3,5-二硝基苯胺	121-81-3	2.31	3	1.27	b
Carbendazim	10605-21-7	2.35	3	1.37	c
Triadimenol 氯苯氧基二甲乙基三唑乙醇	55219-65-3	2.40	3	1.85	c
Triazoxide 三??	72459-58-6	2.44	3	1.66	c
TriazopHos 三??	24017-47-8	2.55	3	1.78	c
Linuron 利谷隆 (一种选择性除草剂)	330-55-2	2.59	3	1.97	c
Naphthalene 萘	91-20-3	2.75	4	2.20	a

Endosulfan-diol 硫丹-二醇	2157-19-9	3.02	5	2.29	c
Methiocarb 灭虫威	2032-65-7	3.10	4	2.39	c
Acid Yellow 219 黄酸 219	63405-85-6	3.16	4	2.83	a
1,2,3-Trichlorobenzene 1,2,3-三氯(代)苯	87-61-6	3.16	4	1.40	a
-HCH	58-89-9	3.23	5	2.94	a
Fenthion 倍硫磷 (一种有机磷杀虫剂)	55-38-9	3.31	3	2.49	c
Direct Red 81 直接红 81	2610-11-9	3.43	4	2.68	a
Pyrazophos 定菌磷	13457-18-6	3.65	3	2.70	c
-Endosulfan -硫丹 (一种急性杀虫剂)	959-98-8	4.09	5	3.74	c
DiClofop-methyl 甲基-二氯 苯氧基苯氧基丙酸	51338-27-3	4.20	3	3.77	c
Phenanthrene 菲	85-01-8	4.09	4	3.83	a
Basic Blue 41 (mix) 基本蓝 419 (小)	26850-47-5 12270-13-2	4.89	4	4.46	a
DDT 二氯二苯三氯乙	50-29-3	5.63	1	-	b

/a/ W. Kördel, J. Müller(1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

/b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304

/c/ Data provided by industry.

C.20 DAPHNIA MAGNA (一种水蚤) 的繁殖试验

1. 方法

这种繁殖毒性测定的方法是OECD TG 211 (1998)的一个翻版。

1.1. 引言

本试验的主要目的是评估的的的化学因素对水蚤繁殖的产量的影响。

1.2. 定义和单位

母本：是那些在试验开始出现的雌性水蚤，它们的繁殖的产量是本测定研究的目标。

后代：是本试验中由母本繁殖的那些年轻的水蚤。

最低可观察效应浓度(LOEC)：是最低的可观测的繁殖上有重大的统计学意义且在一个规定的暴露时期里其母本和对照对比死亡率 $p < 0.05$ 的试验浓度。

然而，所有超越LOEC上的浓度有害影响一定不低于那些在LOEC内观察到的浓度。当这两个条件不能够被满足时，一定要给出一个LOEC（和所以NOEC）被选择详尽的解释。

没有可观察的效应浓度(NOEC)：是直接在LOEC之下的在一个规定的暴露时期里和对照对比没有重大的统计学作用($p < 0.05$)的测定浓度。

EC_x：是测定的物质溶解在水中的浓度，其实验结果是在一个规定的暴露时期里水蚤的繁殖有X%缩减量。

内在增长率：是群体数量增长导致繁殖产量和特殊年龄的死亡率(20) (21) (22)的度量。在一个稳定数量的状态它将使零。对正在增长的群体数量它将是正的而对正在减少的群体数量而言它将是负的。显然，后者数量是不能维持的最终将导致消失。

检出限：是最低的能检测到而不能定量测定的浓度。

检测限：是最低的能从数量上量化的浓度。

死亡率：出现以下稳定的情况：如，当水蚤不能游动，或搅动测定的容器后其肢体或后腹部在内在15秒内没有可观察的运动，一个动物即被纪录成死亡。(如果用另外一种定义，必须和参考文献一起交代。)

1.3. 测定方法原理

在本测定开始时年轻的年龄小于24小时的雌水蚤(母本)，被暴露在溶于水中的在浓度范围内的测定物质。测定的持续时间是21天。在测定的最后，每一个活着的母本繁殖的后代总共的数量被评估出来。这意味着由死去的成体繁殖的年轻的水蚤被排除在计算之外。

再生的母本产量能用另外的方法(例如，观察从第一天开始每天每个母本繁殖的后代的数量)表达，但这些方法必须在测定的结尾记录以除在每个母本繁殖的年轻的水蚤总数之外。被暴露在测定物质中的水蚤的生殖产量和对照对比用来得出最低可观察效应浓度

(LOEC)和没有可观察的效应浓度(NOEC)：另外，就可能而言，数据被用一个衰退的模型来分析用来估计引起生殖产量(例如， EC_{50} ， EC_{20} ，或 EC_{10}) x%缩减的浓度。

存活的母本水蚤和第一代产生的时间也必须记录下来。另外在参数上有影响的有关物质如生长(如长度)和可能的内在的增长率也可能考虑。

1.4. 测定物质信息

用水蚤来完成的一个剧毒性的测定(参见C.2, Part I中的方法)实验结果应是有意义的。实验结果对生殖测定中选择适当的浓度范围可能是有用的。

水的溶解性和测定物质的蒸汽压应该知道，并且报告中应给出能定量测定该物质的可靠分析方法、物质的回收率以及方法检出限。

有关本测定的在建立测定条件上可能有用的物质的资料包含：结构式，物质的纯度，光源的稳定性，在测定条件下pKa, Pow的稳定性和测定中已有的生物降解能力的(见 C.4中方法)实验结果。

1.5. 测定的有效性

一个测定的正确性，以下的性能标准应和对照相适应：

- 测定最后(雌性水蚤)母本的死亡率不超过20%；
- 测定最后每一个母本产生的存活的后代的平均数目 60。

1.6. 测定方法描述

1.6.1. 仪器

测定容器和其它接触测定液的仪器都必须全部用玻璃或其它化学惰性的材料制造。测定的容器通常是大烧杯。

另外，以下设备是必需的：

- 氧气计量器（附带微电极或其它适合测量小容量样品中溶解的氧气）；
- 适当的控温装置；
- pH计；
- 测定水的硬度的设备；
- 水中有机碳含量(TOC)测定的设备或化学需氧量(COD) 测定的设备；
- 适当的仪器来控制光源和测量光强。

1.6.2. 有机体测定

用在测定中的是 Straus 水蚤。其他种类的水蚤可用来为它们提供适当的正确性的标准(在

对照中的和繁殖产量相关的正确标准应和水蚤的种类相关)。如果其它种类的水蚤被采用,必须很清楚地鉴别它们并被证明使用该类水蚤是恰当的。

更适宜地,无性生殖应通过基因型被鉴别。研究(1)表明,无性系 A(起源于法国的 IRCHA) (3) 的繁殖的性能始终和用这种方法培养的情况下每一个母本产生的存活的后代的平均数目 60 的标准相一致。然而,对一测定来说另外的无性生殖是可接受的假如水蚤培育看起来和正确的标准相一致的话。

在测定的开始,动物年龄应该小于24小时且不可以是最初的为繁殖而饲养的后代。他们必须来源于一个健康的亲本(如,没有明显的症状如:高死亡率,雄性和ephippia存在,最初的为繁殖而饲养的后代其繁殖产量的延迟减少,生物受污染等)。其亲本必须维持一个和测定中相似的培养条件(光,温度,介质,喂食和生物活动的单位体积)。如果在测定中水蚤培养的介质和例行的水蚤培养介质不一样,最好使每一个测定生物有一个适应测定的介质的时期,大约3周左右(如,一代)以避免亲本差异。

1.6.3. 测定的介质

据推荐,一个准确的定义的介质被用于本测定中。这能避免难以辨别的添加剂的使用(如藻类,土壤萃取物等等),因此,应促进实验室之间的标准化。ELendt M4 (4) 和M7介质(见附件1)已被发现适合这个目的。但是,假如水蚤培养的进展和严格的测定标准相适应,其他的介质(如(5)(6))可被接受。

如果介质被采用了,它包含未定义的添加剂,这些添加剂应是清楚地指明的且成分信息应在测定结果报告中提供出来,特别是关于碳的含量,因为这可能对计量食物的供给有贡献。据推荐,应测定为母本准备有机添加剂的总的有机碳(TOC)和/或化学需氧量(COD),且作出在测定介质中对TOC/COD贡献的实验结果的评估。据推荐,介质中TOC的含量(如在藻类添加之前)是在2mg/L以下(7)。

当测定的物质包含金属成分,认识到介质的性质(如硬度,螯合容量)可能和测定物质的毒性有关是很重要的。由于这个原因,一个准确地定义的介质是必要可取的。但是,现在仅有的精确定义的且适合水蚤长期培养的介质是ELendt M4 和M7。两种介质都含有螯合剂EDTA。研究表明当繁殖测定用ELendt M4 和 M7完成时镉的明显毒性比不含EDTA时的低。M4 和 M7因此不被推荐用来完成含金属物质的测定,而其它的富含已知的螯合剂的介质也应当避免使用。对于含金属的物质,可以选择其他介质,例如,向ASTM再生的新鲜不含EDTA的硬水中(7)加入藻类萃取物。ASTM再生的新鲜不含EDTA的硬

水和藻类萃取物的组合也同样适合水蚤的长期培养和测定，虽然因其附加的藻类萃取物成分仍然发挥了一个温和螯合剂的作用。在测定的开始和过程中，溶解的氧气的浓度应在3 mg/L以下。pH应在6-9范围内，通常在任何一次测定中其值的改变不应超过1.5个单元。推荐硬度在140 mg/L (以CaCO₃计)以上。以此为标准的测定已被证明繁殖性能依从有效的标准(9)(10)。

1.6.4. 测定溶液

测定溶液的浓度通常是由原溶液的稀释获得。原溶液应该更适宜由溶解物质在测定的介质中配制。

为了配制一个适宜的浓缩的原溶液，在一些情况下可能需要使用有机的溶剂或分散剂。但是应努力避免使用太多的原料。适合的溶剂有丙酮，乙醇，甲醇，dimethylformamide, triethylene 乙二醇。合适的分散剂如CremopHor RH40, 甲基纤维素0.01% 和HCO-40。在任何情况下，溶液中测定物质不应超过在测定介质中溶解的限制。

溶剂用来配制能计量精确的加入水中的原始的溶液。在最后的介质中，推荐的溶剂浓度（即 ≤ 0.1 mL/L），上面说的溶剂将没有毒性且不会引起物质水溶性的增加。

分散剂可能对其精确的用量和分散有帮助。在最后的介质中，推荐的溶剂浓度（ ≤ 0.1 mL/L），以上列出的分散剂将没有毒性且不会引起物质水溶性的增加。

1.7. 测定设计

测定容器应与处理相对应且所有的测定容器后续处理应用随机的方式。如不这样做会引起能用浓度效应分析的偏差。特别的，如果实验单元被按分析或浓度顺序处理，一些和时间有关的影响如实验员疲劳或错误，在较高的浓度能引起较大的影响。另外，如果测定的实验结果受到最初的或测定环境的影响，如在实验室的位置等，应考虑对实验结果的影响。

1.8. 步骤

1.8.1. 暴露的状况

1.8.1.1. 持续时间

测定持续时间是21天。

1.8.1.2. 加载

双亲动物是个别地维持，每个测定容器一个，在每个容器中用 50-100 mL 介质。大的容器有时可能是必需的以与用来得到测定物质浓度的实验结果的分析步骤相适合，虽然共

享化学分析的复制是也允许的。如果使用大于 100 mL 的容器,给水蚤的配给量可能需要增加以确保足够的食物可用性和依从有效性标准。为了完全流动的测定,选择性的设计因为技术的原因可能被考虑过(如 10 个动物一组的四组动物在一个较大的测定容器中),但是任何对测定设计的改变应该被实验结果报告。

1.8.1.3. 动物的数量

对半-静态测定而言,至少 10 个个别地动物保持在各自的测定浓度中而至少 10 个个别地动物保持在对照系列中。为了完全流动的测定,40 个动物分成四组,10 个动物一组,各自的测定浓度表明是适合的(1)。较小的数目的生物体测定可能被使用且推荐每个浓度下的最小的 20 个动物分开成二或更多的有相等动物数目的复制组(如,四个复制各自有五个水蚤)。注意,在动物被分成组的测定中,在测定的结尾,将繁殖的产量表达为每个活着的母本动物繁殖的活着的后代的总数是不合理的。在这些情况下,繁殖的产量应表达为在测定的开始存在的每个母本动物繁殖的活着的后代的总数。

1.8.1.4. 喂食

对半-静止测定,饲养应该更适宜地每日进行,但是至少一星期三次(也就是和介质的改变相一致)。来自这方面的偏离(举例来说,对完全流动的测定而言)应在测定结果报告中被提及。

在测定的过程中,母本动物的饮食应该更适宜地选用如下一个或多个海藻细胞:
(*Chlorella* sp) 绿藻之一种, *Scenedesmus capricornutum* (另一种海藻)(现在称为 *Pseudokirchneriella subcapitata*(11)) 和 *Scenedesmus subspicatus* (也是一种海藻)。被供应的饮食应该以有机碳(C)的含量为基础提供到每只母本动物。研究(12)表明,对水蚤(*magna*)而言,在 0.1 和 0.2 毫克 C/水蚤/天之间的定额水平对完成的必需的后代数目的是充份符合测定的有效性标准的。饮食配额在整个测定的时期可被一致的供应,或者如果需要,测定的最初阶段可以较低的量供应然后在随后的测定中不断的增加来计算母本动物的生长。在这情况,饮食配额一致仍应该保持在推荐的范围的 0.1 - 0.2 的毫克 C/水蚤 / 天里。

如果用间接的替代物计量,如海藻的细胞数量或光的吸收率,被用满足必需的配额水平(比较方便,因为测定碳的含量比较费时),每个实验室必需提出它自己的与海藻类培养的碳含量的测量替代物的计算图(详见附件 2 的关于计算图物品的建议)。计算图应该至少一年检查一次,如果藻类培养条件已经改变还应时常检查。吸光率已经被证实是一个比细

胞数量好的碳含量的较好的替代品(13)。一个浓缩的藻类悬浮液应该被用于水蚤的喂养以将被转移到测定容器中的海藻培养介质容积减到最少。藻类的浓度能通过先离心分离再在蒸馏水、去离子水或水蚤培养的介质中制成悬浮液来满足。

1.8.1.5. 光

强度不超过 $15-20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照16小时。

1.8.1.6. 温度

测定介质的温度应该在18-22 范围内。但是，对任何一次测定，如果可能的话，温度不应该超过2 的波动限制范围（如18-20，19-21，或20-22）。可以适当的使使用一个附加的容器来监测温度的变化。

1.8.1.7. 通风

在测定中使用的容器不能通气。

1.8.2. 检测浓度

通常至少有5个不超过3.2的由更适合的独立因素产生的呈几何级数排列的检测浓度，同时应对检测浓度做适当数目的重现（见1.8.1.3）。如果使用的浓度少于5个应说明理由。在测定方法中超过物质溶解性限制时不必测量。在设置这组浓度时，需要注意以下几点：如果目标是获得LOEC/NOEC，最低浓度必须足够低以至于在该浓度下的富集不明显的低于对照。如果不这样，将不得不减少最低浓度重新检测。

如果目标是获得LOEC/NOEC，最高浓度必须足够高以至于在该浓度下的富集明显的低于对照。如果不这样，将不得不增加最高浓度重新检测。

如果复制品的作用的ECX 被评估，充分的浓度数据用来描述ECX将变得可取。如果复制品的作用的EC50 被评估，最高测定浓度也将大于EC50。否则，虽然评估EC50仍然可能，但是EC50确定的距离将很宽同时令人满意地评价已有模型的适应性也变得不太可能。

检测浓度组中最好不包含成熟残留物上在统计上有重要影响的数据，因为这可能会仅仅由于一个重现而变测定的天然性为一个复合的再现和要求更复杂统计分析的无希望的检测。

有毒待测物的预见（如急性测定和排序研究）将有助于检测浓度的选择。

一份溶剂或分散剂可以被用来添加到检验溶液中，在测验容器中它的最终浓度不应超过0.1 mL/L 并在所有测验容器中都相同。

1.8.3. 对照

除测定系外，一个测定方法的对照系或者相关地一个包含溶剂或分散剂的对照系也应存在。使用中，溶剂或分散剂浓度应和测定物所在容器中使用的溶液浓度相同。使用适当数目的备用品。

通常，在一顺利的测定中，对照中每对亲本产生的存活后代的平均数左右的波动系数应 $\leq 25\%$ ，并且需要对用个别的动物的实验设计进行实验结果报告。

1.8.4. 测定介质的更新

介质更新频率决定于测定物的稳定性，但应至少每周三次。如果，在最大更新时间内（3天）从预备的稳定检测（见1.4）检测物浓度不稳定（变化超过额定80-120%或低于首次测量浓度的80%），浓度的更新应更频繁或直接使用流动测定。

当在半稳态测定中介质更新，测定容器的第二系列应准备好，母体动物由如适当直径的玻璃吸管转移进入。所转移含水蚤介质的体积应尽量少。

1.8.5. 观测

检测中的观测实验结果应被记录在数据页（见附件3和4的例子）。如果还有其他测量（见1.3，1.8.8）便需要附加的观测。

1.8.6. 后代

每一对亲本产生的后代应从第一批起被转移和计数，以防它们消耗大量成体的食物。对此方法的目的，只需要计数成活后代的数目，不过不成功孵化或死亡个体也应记录。

1.8.7. 死亡率

亲本的死亡率应每天纪录，至少与后代的计数同步。

1.8.8. 其他参数

虽然此法主要是设计为对繁殖影响的评定，但其他的影响同样可能十分的量化以进行统计分析。生长测量因提供了可能的亚致死量影响而被高度期望，这是比单独的繁殖测量更有用的；同样推荐测量结束时的亲本体长的测定（除尾突之外的身体长度）。其他能测量或计算的参数如第一代（以及后面的）产生的时间，每一动物一代的数目和大小，流产的数目，雄性的百分率和数量增长率。

1.8.9 分析测定方法的频率

在分别在对照组和最高试样浓度条件下，新鲜和陈旧的介质中的氧气浓度，温度，硬度与pH值应该至少每周测量一次。

在实验中，试样浓度以有规律的间隔测量。

在试样浓度为所期望的 $\pm 20\%$ 范围内（即在 80% - 120% 范围内，见于 1.4 和 1.8.4）的半静态的实验中，建议分析在实验开始的第一个星期内新鲜制备和更新的最高和最低浓度试样（特别是应该分析来自相同溶液新鲜准备并且更新过的试样）以作为最小值。

对于试样浓度不为所期望的 $\pm 20\%$ 范围内的实验，必须分析新鲜制备和更新的所有实验浓度。然而，对于被测定样初始浓度不在 $\pm 20\%$ 标明浓度范围内，但是有足够的证据表明初始溶液是稳定并且是可重现的时（特别是在初始浓度的 80% — 120% 范围内），实验的第 2 和 3 周中化学分析可被减少到最高和最低实验浓度。在所有情况下，试样浓度的分析在每个实验浓度的一个仅需重复实验一次的更新前进行。

如果使用流动的试样，对于类似于所述的半静态实验的相似样品的处理是合适的（但是在这种情况下不能用于测量“旧”溶液）。然而，增加第一周的取样次数（例如 3 次测量）以保证实验浓度保持在稳定是可行的。在这些种类的实验中，试样和稀释剂的流动速度以应该每日检查。

如果有证据表明被测定样浓度被满意的保持在标明浓度的 $\pm 20\%$ 的范围内或者实验中始终为被测初始浓度，实验结果可被建立在标定值或者初始测量值上。如果与标定值或者初始浓度测量值的偏差大于 $\pm 20\%$ ，实验结果可以按时间的平均计算(见附件 5)。

2. 实验数据和结果报告

2.1 实验结果和处理

此实验的目的是测量试样在实验末对每对亲代动物所产生的所有存活后代的影响。每对亲代动物所产生的所有后代应被计算到每个实验管中（特别是重复的实验）。如果，在任何重复实验中亲代动物死亡或者是雄性，则重复实验被排除在分析外。分析建立在数目减少的重复实验中。

对于 LOEC 和 NOEC 的估计，对于化学品对产生后代的影响，必须计算重复实验中平均产生后代在每个浓度和淤积残留物的标准偏差，这可由方差分析（ANOVA）完成。每个浓度的平均应该使用合适的多重比较方法和对照组的平均比较。Dunnnett 或者 William 的实验方法可能是使有用的（14）（15）（16）（17）。必须检查方差值是均匀性的前提。建议用图表方法完成，而不是通过正式的显著性检验（18）；合适的替代方法是使用 Bartlett 实验。如果没有这样的前提的话，则应该考虑在进行 ANOVA 前将数据转化为匀化的方差，或者进行权重 ANOVA。使用 ANOVA（特别是最小显著性差异）的可检测效果的大小应被计算并且写入实验结果报告。

对于导致 50%子代减少（特别是 EC50）的浓度估计，合适的曲线，例如对数曲线，应该使用例如最小二乘法的统计方法以拟和数据。曲线应用参数表示以使 EC50 和它的标准差可以直接估计。除非有更好的赞同不同置信限的方法，应该引用两边 95%的置信限。拟和过程应该更好的提供评价不吻合的显著性的平均。这可以图表方式或者分割残余平方总数为“不吻合”和完成“纯粹错误组成”并且进行显著性实验的方法完成。因为在产生的幼体数量上处理提供的高生殖力较低生殖力容易有更大的方差。且考虑到应提供加权观测值以反映在不同处理组中的不同的方差。

在分析来自最终的环实验（2）的数据时，尽管可以使用其他合适的模型，对数曲线应以以下方式拟和：

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

式中：

Y: 每对亲本动物在实验结束时的总幼体数量（对每管分别计算）

x : 物质浓度

c : 当 x=0 时幼体数量的期望值

x_0 : 群体中的 EC50

b : 斜率参数

这一模型在大数量的环境下适用，但有不适合的例外。应该检测建议模型的有效性。

在一些情形中，对于hormesis模型一个低的浓度可适当提高效果。

其他的浓度效应,像是EC10或EC20也可以估计，虽然它可以使用更好的参数优化模型，那是过去一直用来估计EC50的模型。

2.2. 实验结果报告：

实验结果报告一定包括下列各项:

2.2.1. 实验物质：

- 物理性质和有关的物理化学性质；
- 化学鉴定数据，包括纯度。

2.2.2. 实验种类：

- 复制（不管是否已经遗传），供应者或来源（如果已知）和培养环境。如果一个不同种

的水蚤magna被使用，应记录。

2.2.3. 实验情况:

- 实验步骤 (比如半固定或流动,体积,每升中水蚤的数目);
- 光周期和强度;
- 实验设计 (比如 重复实验的次数,每升中母体的数目);
- 所使用的培养液的细节;
- 如果使用过其他的有机物,要标明有机物的成分,来源,准备方法,TOC/COD的准备,实验产生TOC/COD的判断;
- 关于培养的详细信息,包括数量(毫克/水蚤/天)和时间表(比如食物的类型,包括藻特殊名称(种),应变,培养条件);
- 更新的储备液的方法和频率(如果使用要给出溶剂或分散剂的浓度)。

2.2.4. 实验结果:

从初步研究实验物质的稳定性的实验结果;

标称实验浓度和所有的分析实验结果决定容器中实验物质的浓度(见附件4样例);这种方法回收率和检测限也应该写入实验结果报告。

- 实验容器中水的性质(如:合适的酸碱值,温度,溶解氧浓度,和TOC和/或COD和水硬度)(见附件3的样例);
- 记录每个母体的全部活的后代(见附件3的样例);
- 母体死亡的时间及数目(见附件3的样例);
- 控制生育的变动系数(基于在实验结束时活的母体繁殖的后代的数目);
- 每个母体繁殖的活的后代的总数(在每次相同的实验中)实验结束时与实验物质的浓度;
- 繁殖的最低可见浓度效应(LOEC),包括描述统计学使用的步骤和指示多大的效应可能被发现。和繁殖的不可见浓度效应(NOEC),LOEC/NOEC母体的死亡率应写入实验结果报告。
- 繁殖的 E_{cx} 和置信度还有合适的模型所作的图表也用来计算,计量-效应曲线的斜率和它的标准误差;
- 另外观察到的生物效应或测量:观察或者测量中任何其它的生物效应应记录(比如母体的生长)包括合理的解释;
- 解释与实验理论的偏差。

3.参考文献

OECD Test GuideLine Programme, Report of the Workshop on the Daphnia magna Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6.Report of the Final Ring Test of the Daphnia magna Reproduction Test Paris. 1997.

Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using Clones of Daphnia magna Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, 257-265.

Elenndt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA,Cincinnati, Ohio.

Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing Daphnia magna. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.

ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The Long term maintenance of Daphnia magna Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. TyLe & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a Life-cycle toxicity test with Daphnia magna. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26, 1-8.

Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. HydroBiol.*, 120(2), 185-196.

Korshikov (1990). Pseudokirchneriella subcapitata Hindak, F-1990. *Biologice Prace*, 36, 209. Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard Daphnia juvenile production test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 2053-2058.

Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total

organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. HydroBiol.*, 128, 459-466.

Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.

Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

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.

Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, 510-531.

Draper N.R. and Smith H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition, Wiley, N.Y.

Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). *A Primer of Population Biology*. Sinauer Associates Inc. Publishers.

Poole R.W. (1974). *An Introduction to quantitative Ecology*. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. *EcoLog*y, 67, 1156-1166.

附件1

准备限定的ELENdT M7 及 M4 培养液

对 ELenDt M7 和 M4 培养液的适应

一些实验室已经在直接将水蚤从M4(1)转移到M7 的方面经历困难。然而，也有一些成功的例子，用逐渐适应的方法,也就是从含30%的ELendT培养液到60% ELenDt然后到100% ELenDt。这期间可能要一个月。

准备

微量元素

含单独的微量元素储备液溶液(1)在水中应被首先准备为适当的纯度,比如去离子,蒸馏或反渗透制得的。从这些不同的储备液(1)制备另一个储备液(2),包含所有的微量元素(混合溶液),比如:

M4 和M7 培养液

M4 和M7 培养液用来制备营养液,营养物和维生素见下:

	加入水中的总量 mg/l	浓度 (M4营养液)	营养液所需的 储备液总量 ml/l	
			M 4	M 7
营养液2包含的微量元素		20	50	50
储备液中的营养物质 (单组分)				
CaCl ₂ * H ₂ O	2 293 800	1 000	1.0	1.0
MgSO ₄ * H ₂ O	7 246 600	2 000	0.5	0.5
KCl	58 000	10 000	0.1	0.1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1.0	1.0
Na ₂ SiO ₃ * H ₂ O	9 50 000	5 000	0.2	0.2
NaNO ₃	2 740	10 000	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0.1	0.1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0.1	0.1
Combined Vitamin stock	-	10 000	0.1	0.1
含维生素的储备液应由以下三种维生素溶于1升水中				
维生素B1的 氢氧化物	750	10 000	-	-
维生素B12	10	10 000	-	-

维生素H	7.5	10 000	-	-
------	-----	--------	---	---

含维生素储备液应分成小等份冷冻保存。维生素在使用之前加入培养液。

N.B. 当准备培养液时应避免盐的沉淀,将小份储备液加入大约500-800 毫升的去离子水然后再稀释至1升。

N.N.B. 最早关于M4的文章可在 ELenidt , B.P.(1990) 找到。SeLeninm deficiency in crustacea; an uLtrastructuraL approach to antennaL damage in DapHnia magna straus .

附件2

有机碳总量 (TOC) 分析及绘制藻类饲料的TOC含量图

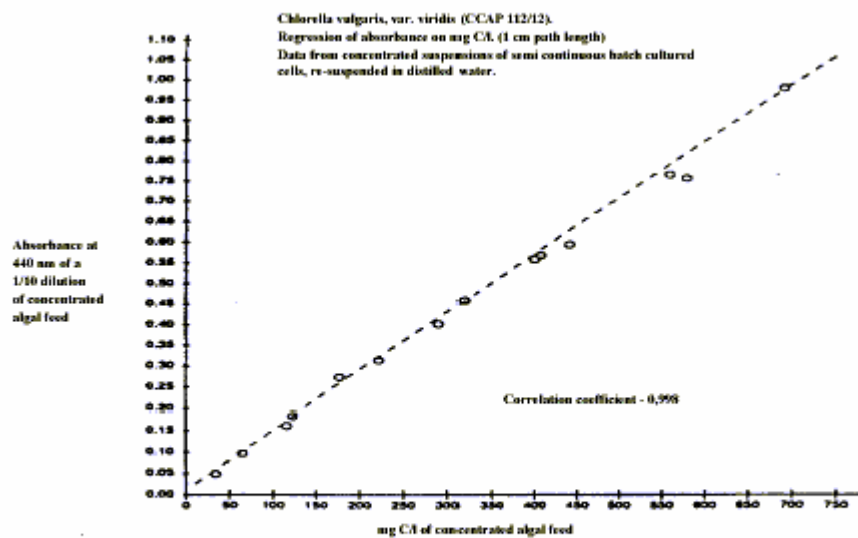
很明显藻类饲料的碳含量不能直接测量,但是从相互关系(如计算图)中用替代物来测量如藻类细胞数或吸光度)。

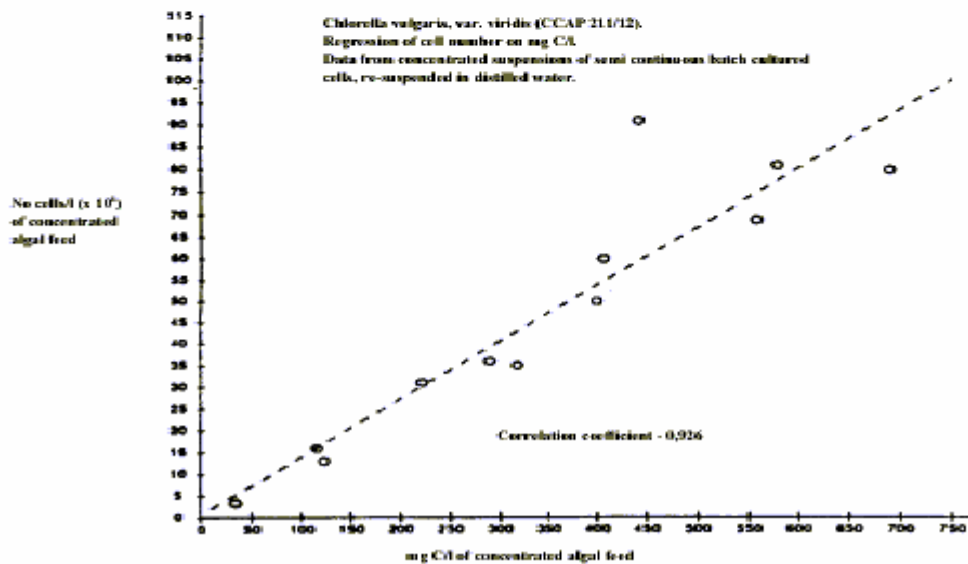
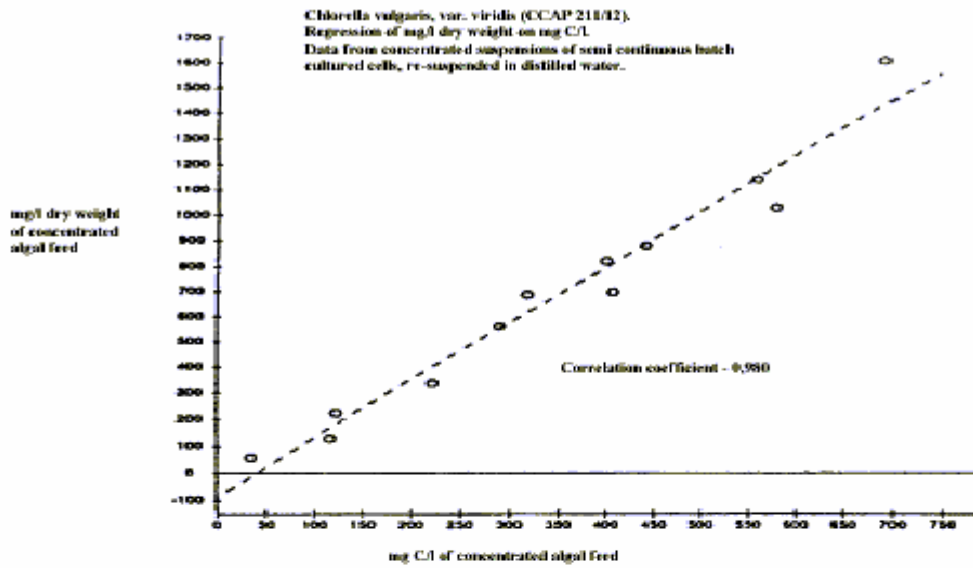
TOC的测量应是在高温下氧化而不是在紫外线下或用过硫化 persulphate方法(见: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB)。

因为需绘制图表,藻应该与生长培养液离心分离。测量替代物和TOC浓度在同样的3份样品中。应做空白实验并在藻类样品TOC浓度中扣除。

计算图超过范围的碳浓度应该是线性的。 样例见下:

N.B. 这些不应该进行转变;实验室准备他们自己的计算图是很必要地。





concentrated algal feed :浓缩藻饲料

dry weight :干重

correlation coefficient :相关系数

absorbance :吸光度

dilution :稀释

path length: 光程

suspension :悬浮

distilled water :蒸馏水

附件3

培养液的数据记录样例，物理/化学品监测数据，喂养，
水蚤繁殖及成体的死亡率

实验 NO: 数据 started: 复制: 培养液: 食物的类型: 实验物质: 标称浓度

天	营养液		PH ^m		O ₂ mg/l ^m		温度		食物的供给	N ^m + 活后代	容器 1
0											
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
			新	旧	新	旧	新	旧		总计	

标称浓度	第1周样品		第2周样品		第3周样品	
	新	旧	新	旧	新	旧

(b) 标称浓度的测量百分数

标称浓度	第1周样品		第2周样品		第3周样品	
	新	旧	新	旧	新	旧

附件5

时间-加权平均值的计算

时间-加权平均值

所给实验物质的浓度衰退，选择适当的浓度是必需的，代表水蚤生活浓度范围。选择应该基于生物学和统计学。比如,如果峰值浓度对繁殖的影响最大,那么应使用最大的浓度。然而，如果累积或较长时间的有毒物质被考虑是更重要的，然后一个平均浓度是更适合。在这种情况下，应使用一个适当的时间-加权平均值，即使这将给即时浓度带来变化。

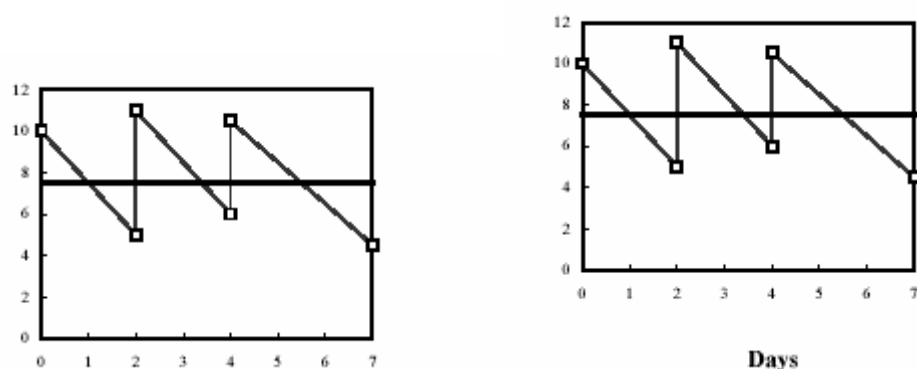


图 1: 时间-加权平均值的例子

图 1 展示了一个共7天的（简化）实验，在第0，2，4天重复营养液。

细的Z型线代表每个时间所对应的浓度。假设浓度的下降是指数递减过程。

6个方块点代表浓度在观察开始和结束的值

粗的实线指出时间-加权平均值的位置。

时间-加权平均值是计算出来的，这样在时间-加权平均值线下面的区域和在浓度曲线下面区域的面积是相等的。为上述例子的计算见表 1。

表 1: 时间-加权平均值的计算

Renewal N ^o	Days	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Area
1	2	10.000	4.493	2.303	1.503	13.767
2	2	11.000	6.037	2.398	1.798	16.544
3	3	10.000	4.066	2.303	1.403	19.781
Total Days : 7					Total Area	50.091
					TW Mean	7.156

Days 是重复时的天数

Conc0 在开始时的浓度

Conc1 在结束时的浓度

Ln(Conc0) 是Conc0的自然对数

Ln(Conc1) 是Conc1的自然对数

Area 是每个指数曲线下的面积，计算如下：

$$Area = \frac{Conc1 - conc1}{Ln(conc0) - ln(conc1)} * Days$$

时间-加权平均值(TW 值) 是总面积除以总数天数。

当然，为了进行水蚤繁殖实验此表格要可以记录21天

显而易见如果只在开始和结束时观测数据就不可能确定消失过程，指数级的递减。不同的曲线会计算出不同的面积。无论如何这并不是难以置信的，在缺少其他更多的信息时这可能是最好的。

这项工作需要非常谨慎否则会在末期找不到任何物质而分析失败。除非可以判断物质在溶液中消失的速度否则不可能得到曲线下面的实际面积，也不可能获得一个合理的时间-加权平均值。