

# 水生生物毒性 试验方法

周永欣 章宗涉 编著

农业出版社

# 水生生物毒性试验方法

周永欣 幸宗涉 编著

农业出版社

# 水生生物毒性试验方法

周永欣 章宗涉 编著

\* \* \*

责任编辑 范崇权

农业出版社出版 (北京朝阳区枣营路)

新华书店北京发行所发行 通县曙光印刷厂印刷

787×1092 mm 32开本 8.5 印张 1 插页 172千字

1989年10月第1版 1989年10月北京第1次印刷

印数 1—820册 定价 4.05元

ISBN 7-109-00925-4/Q·36

## 前 言

水生生物毒性试验方法是水生毒理学的重要组成部分，目前已广泛地应用于测定和评价化学物质的毒性，工业废水的排放管理，渔业保护，水质的卫生评价以及水源保护等方面。早在50年代末，我国环境保护工作者就进行了化学物质对鱼类的急性毒性试验，二十多年来，各地有关单位和大专院校相继开展了这方面的研究工作，积累了不少资料和经验，为发展我国的水生毒理学奠定了良好的基础。

近年来，随着社会主义现代化建设事业的飞速发展，局部地区的水源污染日趋严重，保护水源已成为我国四化建设中不可掉以轻心的重要任务。为了对各种化学物质进行正确的评价和提高水质生物测试的可靠性，各地环保工作者期待有一本较为系统地介绍水生生物毒性试验方法的著作。有鉴于此，我们查阅了国内外大量有关文献，并结合我们在这方面的实践经验，编写成册，以供读者参考。有关国外水生毒理学研究的新趋向，本书仅作概要的介绍，读者可据此查阅有关文献。

本书在编写和定稿过程中，承中国科学院水生生物研究所倪达书教授，王德铭教授，邱昌强教授，夏宜琤教授，何碧梧编审等的指导与支持；北京市环保研究所曹维勤同志审稿；中国科学院水生生物研究所余仪同志复墨插图，在此一并致谢。

由于我们水平有限，书中错误和缺点在所难免，恳切希望读者批评指正。

**编者**

1987年5月于武昌珞珈山

# 目 录

<b>第一章 概论</b> .....	1
一、绪言 .....	1
二、毒物的毒性 .....	5
(一) 毒物浓度与生物反应的关系 .....	5
(二) 常用术语 .....	6
(三) 化学物质急性毒性分级 .....	18
(四) 毒物的联合毒性 .....	19
三、水生生物毒性试验的类型 .....	29
(一) 按试验持续时间 .....	29
(二) 按试验容器内试验溶液状况 .....	31
四、致毒方式 .....	35
五、水生生物对化学物质的吸收积累 .....	36
(一) 生物浓缩、生物积累、生物放大 .....	36
(二) 生物浓缩系数 .....	37
(三) 生物浓缩系数的测定 .....	39
六、毒性试验方法的标准化的 .....	44
<b>第二章 试验准备</b> .....	52
一、试验条件 .....	52
(一) 设备 .....	52
(二) 稀释水 .....	57
二、试验生物 .....	63
(一) 试验生物的选择 .....	63

(二) 试验生物的来源 .....	65
(三) 试验用鱼的运输 .....	65
(四) 试验动物的暂养 .....	66
(五) 试验动物的驯化 .....	68
(六) 鱼病的防治 .....	69
<b>第三章 毒性试验的一般程序 .....</b>	<b>75</b>
一、试验设计 .....	75
二、试验溶液的配制 .....	78
三、预备试验 .....	84
四、试验浓度的选择 .....	85
五、试验负荷、溶解氧、温度、pH .....	90
(一) 试验负荷 .....	90
(二) 溶解氧 .....	91
(三) 温度 .....	93
(四) pH .....	93
六、正式试验 .....	97
(一) 试验动物的移放 .....	97
(二) 观察指标 .....	98
(三) 试验持续时间 .....	100
(四) 水质和毒物的分析测定 .....	100
(五) 试验期间的管理 .....	103
(六) 观察及记录 .....	106
七、试验报告 .....	106
<b>第四章 半数致死浓度的计算及常用统计方法 .....</b>	<b>109</b>
一、半数致死浓度的计算方法 .....	109
(一) 直线内插法 .....	112
(二) 机率单位法 .....	114
(三) 图解法 .....	122
二、对照组出现死亡时的处置 .....	132

三、毒性曲线的绘制 .....	133
四、毒性试验中的常用统计方法 .....	136
(一) t检验 .....	137
(二) 方差分析 (F检验) .....	143
<b>第五章 蚤类毒性试验 .....</b>	<b>157</b>
一、概述 .....	157
二、试验准备 .....	161
三、毒性试验 .....	163
(一) 急性毒性试验 .....	163
(二) 慢性毒性试验 .....	165
<b>第六章 藻类测试 .....</b>	<b>170</b>
一、概述 .....	170
二、试验准备 .....	174
(一) 设备 .....	174
(二) 试剂 .....	174
(三) 玻璃器皿的清洗 .....	174
(四) 试验生物 .....	174
三、观察指标 .....	177
(一) 细胞数 .....	178
(二) 叶绿素a量 .....	179
(三) 干重 .....	182
(四) 最大比生长率 .....	183
(五) 最大现存量 .....	185
四、正式试验 .....	188
(一) 试验浓度 .....	188
(二) 接种 .....	188
(三) 试验条件 .....	189
(四) 生长的测定 .....	190
(五) 半数有效浓度的计算 .....	190



<b>第七章 鱼类毒性试验</b> .....	192
<b>一、急性毒性试验</b> .....	192
(一) 单种毒物毒性试验 .....	192
(二) 混合毒物毒性试验 .....	201
<b>二、慢性毒性试验</b> .....	211
(一) 试验鱼的选择 .....	213
(二) 试验浓度 .....	213
(三) 开始试验 .....	213
(四) 观察指标 .....	214
(五) 试验期间的管理 .....	217
(六) 水质及毒物分析 .....	218
(七) 数据处理 .....	219
<b>三、胚胎发育试验</b> .....	219
<b>四、生物浓缩试验</b> .....	224
(一) 试验鱼的选择 .....	225
(二) 试验浓度及试验条件 .....	225
(三) 取样分析测定 .....	227
(四) 计算生物浓缩系数 .....	228
<b>附录</b> .....	232
<b>一、鱼脑胆碱酯酶活力的测定</b> .....	232
<b>二、鱼血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力的测定</b> .....	236
<b>三、鱼类回避活动的测定</b> .....	240
<b>四、按比例稀释流水装置</b> .....	248
<b>五、国外有关鱼类急性毒性试验方法摘录</b> .....	256
<b>六、我国渔业水域水质标准</b> .....	260
<b>七、美国水质基准摘录 (淡水生物)</b> .....	261

# 第一章 概 论

## 一、绪 言

由于人类活动，特别是工业生产的发展和城市人口的过于集中，大量未经处理的工业废水和生活污水排入天然水体，超过了水体的自净能力，从而影响水体的某种有益用途，于是造成了水体污染。水体受到污染后，不仅引起水生生物种群和群落结构的变化，而且严重时将导致水生态系统的破坏和崩溃。水体污染达到一定程度后，除了直接影响水生生物的正常生活外，也直接或间接地威胁人类的健康和生产活动。为了保护水源，人们常采用各种方法对水体进行监测。

对水体水质监测和评价的方法大致可分为两大类。一类是理化方法，即采用各种仪器和分析化学方法，直接分析测定水体中有害物质和它们的浓度。这一类监测比较快速、灵敏，不仅能确定有害物质的种类，还能准确地测定它们的含量。但是，理化方法的分析测定结果并不能直接反映化学物质对水生生物的影响，尤其是几种化学物质对水生生物的联合作用，以及环境因子（如温度、pH、溶解氧、酸碱度、硬度等）对化学物质毒性的影响。另一类为生物学方法，包括生态学方法、毒理学方法等。作为水毒理学(aquatic toxicology)的一个重要组成部分——水生生物毒性试验，它

不仅可以用来测定和评价单一化学物质对水生生物的影响，而且还能用来直接测定工业废水的毒性和几种化学物质混合后的联合毒性，并为研究化学物质的致毒机理积累资料。因此，水生生物毒性试验越来越受到人们的重视，而且已成为评价化学物质对水生生物影响和水体污染的一种重要手段。

化学物质进入水环境后，对水生生物造成的影响是多方面的，全面地评价一种化学物的环境效应需要进行各种试验和收集各项有关的资料。化学物质对水环境生态毒理学 (Ecotoxicology) 影响的较为完整的评价，大致应包括如图 1.1 所示的一些程序[10]。

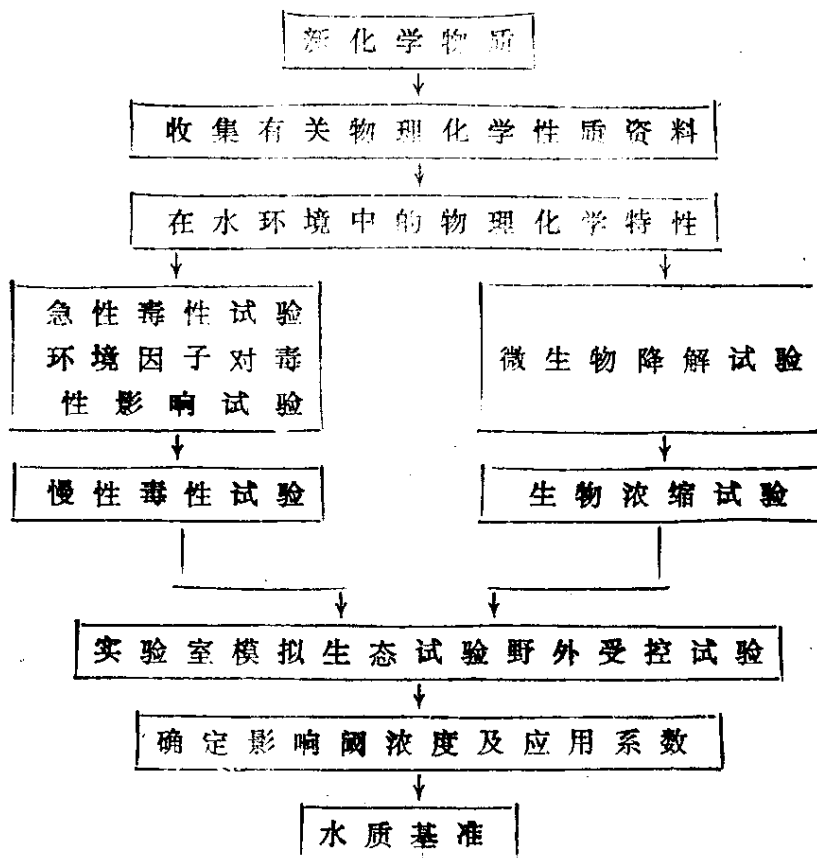


图 1.1 评价化学物质对水环境生态毒理学影响的程序

任何事物的发展都存在着一个由量变到质变的过程，化学物质对水生生物的作用也同样符合这一客观规律。当进入生物体内的化学物质达到一定数量时，就能扰乱或者破坏生物的正常生理功能，引起暂时或持久的病变，甚至发生死亡。因此，人们可以人为地设置一些致毒试验，根据试验生物对被测试物质的反应，来评价各种化学物质或污染物的毒性，这样一类人为设置的致毒试验人们常称为毒性试验(toxicity test)，也有人称生物测试(bioassay或biological assay)。

尽管人们往往将毒性试验和生物测试这两个术语作为同义词来应用，但从它们的严格含义来说，两者还是有所区别的，不能完全等同。毒性试验的目的是为了获得被测试物质对试验生物造成危害的资料，因而试验所采用的观察指标应该是被测试物质引起的有害影响。生物测试，如同分析化学那样，用来测量化学物质或其成分的浓度，因此观察指标既可以是被测试物产生的有害影响，也可以是有益的效应，而且试验结果应根据由已知标准物绘制的标准曲线计算求得。由于两者的目的不同，因此，它们的试验设计，数据的分析处理以及结果的说明也就有所不同。一般而论，生物测试主要用于比较不同化学物质对同一种试验生物的相对毒性，不同种生物对相同化学物质的相对敏感性，以及比较废水不同处理方法的效果，而毒性试验则用来测定毒物对生物所产生的有害影响〔28、36〕。

水生生物毒性试验以水生生物为试验材料，其试验和研究的主要内容归纳起来有如下几个方面：

1. 测定、评价化学物质或工业废水的毒性。
2. 不同水生生物对某一化学物质或某一污染物的相对敏

感性。

3. 不同化学物质或不同工业废水对试验所用生物的相对毒性。

4. 环境条件（如溶解氧、温度、pH、硬度、盐度等）对水生生物是否适宜。

5. 环境因子对污染物毒性的影响。

6. 寻找水体的主要污染源及主要污染物。

7. 废水不同处理方法的有效性和监测废水的处理效果。

8. 推算废水的允许排放量及排放速率。

9. 水生生物对水质的要求。

10. 为制订水质基准（或标准）提供科学依据。

总之，水生生物毒性试验目前已被广泛地应用于测定和评价化学物质的毒性、工业废水的排放管理、渔业保护、水质卫生评价以及水源保护等方面。

上面我们提及了水质基准（water quality criteria）和水质标准（water quality standard）这两个概念，这里还想就它们的含义作些解释。水质基准是指排入接纳水体的污染物所允许达到的水平或浓度，当污染物的量超过这一允许水平时，就将产生特定的环境效应，如危害水生生物，影响水体的其它有益用途等。水质标准则是为了保护水体而依据水质基准和水域的具体情况而制订的水域具体实施规定，经当地行政立法机关审查批准后就成为水域保护法。由此可知，水质标准是为保护河流（或河段）、湖泊、海域而制订的水域保护法，而水质基准则是对各种污染物浓度或量的规定。

由于水生生物毒性试验方法简便，容易掌握，我国不少有关科研单位、大专院校、环境保护部门以及厂矿企业在消

除污染，保护水源上已广泛地使用，而且积累了大量的资料。但是，从目前发表的一些报告和有关资料看，由于试验方法和试验要求掌握的尺度不一致，所得结果往往无法进行比较和重复，从而降低了资料的使用价值，造成了不必要的人力和物力的浪费。为此，统一试验方法已成为我国水生毒理学工作者所共同关心的问题。

## 二、毒物的毒性

(一) 毒物浓度与生物反应的关系 毒物的浓度与生物反应之间的关系，常用“毒性”(toxicity)一词来表示。试验生物对毒物的反应，即毒物的毒性(toxicity of toxicants)，除因毒物和试验生物的种类不同而不同外，在毒物和试验生物确定后，试验生物对毒物的反应主要取决于毒物浓度和致毒时间这两个因素，当然环境因子、特别是水质条件对毒物的毒性仍有不可忽视的影响，这在下面还将作详细的介绍。

当生物急性致毒时，毒物浓度与生物反应之间的关系，不同性质的毒物有着不同的浓度—反应关系。归纳起来，毒物浓度—生物反应关系大致可分为如下几种类型：

1. 直线关系 即试验生物的反应随着毒物浓度的增加而增强，而且两者成正比关系。

2. 非直线关系 生物的反应随着浓度的增加而增强，但两者并非成正比关系，浓度增加时开始的反应增大很缓慢，此后随着浓度的逐渐增大，反应率的上升逐步加快。

3. “全或无”(“all or none”)反应 即浓度的增加并不伴随着立即出现反应，但当增加到一定浓度时，则出现

明显的反应。这个转折点称之为阈值 (threshold), 或阈浓度 (threshold concentration)。

4. “S”形曲线关系 毒物浓度开始增加时, 生物反应的变化不大明显, 以后一段的浓度增加, 反应率的上升十分明显, 而当浓度再继续增加时, 反应率的变化反又不太明显。大多数化学物质的浓度与试验生物反应之间的关系属于“S”形关系。

(二) 常用术语 随着水毒理学工作的深入和水生生物毒性试验方法的普遍使用, 表示毒性试验结果的术语, 或者是符号的数量也随之增多。水生生物毒性试验方法的基本原理, 虽然与药理学、工业毒理学实验方法的原理基本相似, 但进行毒性试验时所采用的致毒方式, 却由于水生生物的生活环境与哺乳动物不同而有所差异, 因而水生生物毒性试验也就有它惯用的一些术语。

1. 致死浓度 引起试验动物死亡的毒物浓度称为致死浓度 (LC, 即Lethal Concentration)。表示致死浓度时, 常在C的下方写上一具体数字, 依此来表示引起该死亡百分数的浓度。例如,  $LC_{10}$ 、 $LC_{50}$  (Median Lethal Concentration)、 $LC_{90}$ 等, 它们分别表示引起10%、50%、90%试验动物死亡时的浓度。由于死亡50%邻近的浓度——反应曲线斜率最大, 因此常用半数致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 表示毒物对水生动物的急性毒性。

2. 平均忍受限 平均忍受限 ( $TL_m$ , 即Median Tolerance Limit) 是指在特定的时间内, 恰好有50%的试验动物能够存活时的浓度。

3. 有效浓度 当试验不以死亡作为试验生物对毒物的反应指标, 而是观察测定毒物对生物的某一影响, 如鱼类失去

平衡、畸形、酶活变化等及藻类生长受抑制，常用有效浓度（EC，即Effective Concentration）来表示毒物对试验生物的毒性。半数有效浓度（ $EC_{50}$ ，即Median Effective Concentration）是指引起50%试验生物产生某一特定反应，或者是某反应指标被抑制一半时的浓度。

如上所述，试验生物对毒物的反应，浓度和致毒时间是两个重要的参数或变量。当毒物的浓度一定时，试验生物的反应随着致毒时间的增加而增强，即致毒时间愈长毒物的毒性愈大。因此，测定和评价化学物质的急性毒性必须明确规定致毒时间，否则也就无法对它们的毒性进行评价和比较。化学物质对水生动物的急性毒性常用24、48、72和96小时 $LC_{50}$ 表示，依此说明24、48、72和96小时内引起试验动物死亡一半所需的浓度。用 $EC_{50}$ 和 $TL_m$ 值表示试验结果也同样应注明致毒时间。

引起试验动物死亡一半的浓度，既可以用平均忍受限（ $TL_m$ ）表示，也可写成半数致死浓度（ $LC_{50}$ ），两者的区别在于半数致死浓度以试验动物的死亡作为对毒物的反应指标，而平均忍受限则是以存活作为观察指标。试验动物死亡50%，也就是还有一半的动物存活，所以对同一试验来说，96小时 $TL_m$ 值与96小时 $LC_{50}$ 完全等同。但是， $TL_{10}$ 、 $TL_{90}$ 则分别相当于 $LC_{90}$ 和 $LC_{10}$ 。

既然毒物的急性中毒能引起试验动物的死亡，那么在进行以水生动物为材料的急性毒性试验时，用半数致死浓度表示毒物的急性毒性也就更为确切。近年来，国外有关化学物质对水生动物的急性毒性文献已很少使用 $TL_m$ ，而普遍用 $LC_{50}$ 表示毒物的急性毒性。

半数致死浓度和半数有效浓度，与药理学、工业毒理学



上的半数致死剂量 ( $LD_{50}$ , 即Median Lethal Dose) 和半数有效剂量 ( $EC_{50}$ , 即Median Effective Dose) 的含义是一致的。但是, 水生生物毒性试验中的浓度是指试验溶液的毒物浓度, 而剂量则是指进入试验动物体内的毒物数量。

4. 起始致死值 起始致死值 (ILL, 即Incipient Lethal Level) 是指在一不限定的致毒时间内, 引起 50% 试验动物死亡的浓度, 或者是有一半试验动物能够长期生存下去的浓度。

此外, 文献上尚有最终平均忍受限 (ultimate median tolerance limit)、致死阈值 (lethal threshold)、渐近  $LC_{50}$  (asymptotic  $LC_{50}$ )、起始  $LC_{50}$  (incipient  $LC_{50}$ ) 等, 其含义都大致相似。

5. 阈指数 阈指数 (TI, 即Threshold Index) 是指

$$192 \text{ 小时 } LC_{50} \text{ 与 } 96 \text{ 小时 } LC_{50} \text{ 之比, 即 } TI = \frac{192 \text{ 小时 } LC_{90.0}}{96 \text{ 小时 } LC_{50.0}}$$

如果  $TI = 1$ , 表明 96 小时后试验动物不再出现死亡, 阈指数小于 1 意味着在 96—192 小时内仍有试验动物死亡, 说明致毒 192 小时尚不能求得致死阈浓度。

6. 安全浓度 在进行全生活周期试验 (complete-life-cycle test 或 full life stages test)、或持续几代的慢性试验时, 对试验动物无影响的毒物浓度称之为安全浓度 (SC, 即 Safe Concentration)。

安全浓度除了通过慢性试验直接求得外, 还可以根据化学物质的急性毒性, 由经验公式或者是由急性毒性乘上一定的系数得到。常用的经验公式有 [11, 12, 29],