

诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价
第1部分：急性毒性

Mugilogobius chulae—Toxicology evaluation—Part 1: Acute toxicity

地方标准信息服务平台

2021-10-18 发布

2022-01-18 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 2

5 方法 3

6 器材 3

7 评价步骤 4

8 质量控制 6

9 结果与报告 6

10 诸氏鲮虾虎鱼安乐死 6

11 实验室废弃物处理 6

附录 A（资料性） 诸氏鲮虾虎鱼繁育方法 7

附录 B（规范性） 诸氏鲮虾虎鱼驯养方法 8

附录 C（资料性） 96 h 诸氏鲮虾虎鱼急性毒性评价原始记录表 9

地方标准信息服务平台

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

DB44/T 2340《诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价》分为四个部分：

- 第1部分：急性毒性；
- 第2部分：摄食抑制；
- 第3部分：生长抑制；
- 第4部分：生殖毒性。

本文件是DB44/T 2340的第1部分。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省科学技术厅提出并组织实施。

本文件由广东省实验动物标准化技术委员会（GD/TC 93）归口。

本文件起草单位：广东省实验动物监测所。

本文件主要起草人：李建军、黄韧、朱才毅、余露军、赖素群、林忠婷、陈小曲、曾进、蔡磊。

地方标准信息服务平台

诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价 第1部分：急性毒性

1 范围

本文件规定了诸氏鲮虾虎鱼毒理学评价中急性毒性的原理、方法、器材、评价步骤、质量控制、数据与报告、安乐死和实验室废弃物处理等要求。

本文件适用于直接或间接排入海洋、入海河口的污染物及受纳水体的急性毒性评价。

2 规范性引用文件

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

- GB 17378.3 海洋监测规范 第3部分：样品采集、贮存与运输
- GB 17378.5 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析
- GB/T 18420.2-2009 海洋石油勘探开发污染物生物毒性 第2部分：检验方法
- GB 30980 海洋倾倒物质评价规范 疏浚物
- GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制
- HJ 91.1 污水监测技术规范
- HJ 493 水质 样品的保存和管理技术规定
- NY 5052 无公害食品 海水养殖用水水质
- SN/T 3592 实验室化学药品和样品废弃物处理的标准指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 实验鱼

3.1.1

实验诸氏鲮虾虎鱼 Laboratory *Mugilogobius chulae*

经人工繁育，对其携带的病原微生物及寄生虫进行控制，遗传背景明确或来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检定及其他科学实验的诸氏鲮虾虎鱼。

中文名：诸氏鲮虾虎鱼，学名：*Mugilogobius chulae*。

分类地位：鲈形目（Perciformes），虾虎鱼亚目（Gobioidae），虾虎鱼科（Gobiidae），鲮虾虎鱼属（*Mugilogobius*）。

3.1.2

仔鱼 larva fish

从孵出开始至各鳍鳍条发育完整，鳞片开始出现为止。

3.1.3

日龄 days of age

自受精始，以日为单位表述的实验鱼年龄。

3.1.4

驯养 domestication

试验前对实验生物进行的环境适应性养殖。

3.2 受试物

3.2.1

污水 sewage

指在生产与生活活动中排放的水的总称。

[来源：GB 8978-1996, 3.1]

3.2.2

海洋沉积物 marine sediments

各种沉积作用所形成的海底沉积物的总称。

[来源：GB/T 30740-2014, 3.1]

3.2.3

疏浚物 dredged materials

为保障港口、码头、航道、锚地通行使用顺畅，满足港口设施及其他涉海工程建设需要从水下挖掘出的沉积物。

[来源：GB 30980-2014, 3.2]

3.3 毒理学评价

3.3.1

急性毒性 acute toxicity

机体接触外源物质后在短期内所产生的毒性效应。

3.3.2

静态毒性试验 static toxicity test

试验期间内不更换试验溶液，进行观察、测定生物异常或死亡效应的试验。

3.3.3

半静态毒性试验 semi-static toxicity test

以定期（如24 h）更换试验溶液的方式进行的试验。

3.3.4

流水毒性试验 flow-through toxicity test

以整个试验过程中试验溶液自动、持续地被更换的方式进行的试验。

3.3.5

半数致死浓度 half lethal concentration, LC_{50}

在一定观察期内，造成50%的实验鱼死亡的毒物浓度。

[来源：GB/T 18420.2—2009, 3.3]

4 原理

鱼类对水环境的变化反应十分灵敏，当水中溶解的污染物达到一定浓度或强度时，就会引起一系列中毒反应，例如行为异常、生理功能紊乱、组织细胞病变，直至死亡。在规定的条件下，通过观察测定诸氏鲮虾虎鱼在一定的试验时间内接触试验物质后的异常或死亡效应，得出污染物对诸氏鲮虾虎鱼有明显影响的具体浓度。

5 方法

分为静态毒性试验、半静态毒性试验和流水毒性试验。
试验期间受试物实测浓度与配制浓度偏差超过20%，宜采用半静态毒性试验或流水毒性试验。
当受试物稳定性不明确时，仔鱼推荐采用静态毒性试验，成鱼采用半静态毒性试验或流水毒性试验。

6 器材

6.1 主要仪器设备

- 6.1.1 诸氏鲮虾虎鱼和饵料生物的养殖设备、水处理设备等。
- 6.1.2 测定环境因子的溶氧仪、盐度计、pH计、温度计等。
- 6.1.3 电子天平、高速搅拌器、生物显微镜、游标卡尺、惰性材料容器、量筒、胶头滴管、手抄网等。

6.2 诸氏鲮虾虎鱼

6.2.1 质量

应符合GB/T 39649的规定。
繁育方法见附录A。
试验前应驯养合格。诸氏鲮虾虎鱼的驯养应符合附录B的规定。

6.2.2 规格

不同试验方法采用的诸氏鲮虾虎鱼规格应符合表1的规定。

表1 诸氏鲮虾虎鱼规格

试验方法	日龄 d	体长 mm
静态毒性试验	8~14	2.15 ± 0.35
静态毒性试验、半静态毒性试验或流水毒性试验	>120	25 ± 5

6.2.3 饵料

6.2.3.1 仔鱼饵料

褶皱臂尾轮虫，质量应符合GB/T 39649中7.3.2的规定。

6.2.3.2 成鱼饵料

卤虫无节幼体，质量应符合GB/T 39649中7.3.2的规定。

6.3 受试物

污水采样应符合HJ 91.1的相关规定，样品贮存和运输规定应符合HJ 493的相关规定。

海洋水质样品采集、储存和运输应符合GB 17378.3的相关规定。

海洋沉积物样品采集、预处理和保存应符合GB 17378.5的相关规定。

疏浚物样品采集、运输和储存方法应符合GB 30980的相关规定。

样品标签应包含名称、编号、采样人、采样时间、数量、来源、采样条件等信息。如可能，应提供受试物的水溶解度、主要毒性成分测定方法、保存条件、危险性、在水和光中的稳定性、蒸气压、快速生物降解结果等信息。

6.4 参比物质

分析纯或以上等级的十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate, SDS）。

6.5 麻醉剂

MS-222溶液，间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐（MS-222）与碳酸氢钠（ NaHCO_3 ）按1:1质量比混合，溶于水配制成一定浓度的溶液，密封避光保存于阴凉处，保存时间不超过一个月。

7 评价步骤

7.1 样品准备

7.1.1 稀释水

宜使用天然海水，也可使用人工配制海水。

水质应符合NY 5052的规定，pH 7.0~8.5。

当纳污水体盐度已知时，稀释水盐度应与纳污水体盐度相同；当纳污水体盐度未知时，稀释水盐度宜配制成 $(30 \pm 2)\%$ 。

7.1.2 贮备液配制

污水等液体样品，摇匀，取一定质量的样品，加入稀释水定容至一定体积，2000 r/min搅拌15 min，配制成预定浓度的贮备液。

低水溶性物质可采用超声波或其他适当的物理方法分散，也可采用对诸氏鲮虾虎鱼低毒或无毒的助溶剂（有机溶剂、乳化剂或分散剂）将其溶解或分散。试验溶液中助溶剂的最高浓度不得超过0.1%。

疏浚物按GB 30980-2014中8.2.1的规定执行。其他固体废弃物，取一定质量的样品，加入若干体积的稀释水，2 000 r/min~3 000 r/min搅拌30 min，然后稀释为试验组的最高浓度，继续搅拌5 min，静置60 min。用虹吸法取水相中层作为贮备液。

如贮备液pH值超出7.0~8.5，则宜采用HCl或NaOH溶液调节贮备液pH值至该范围。

7.2 预试验

设置5个等比浓度组和1个对照组。若使用助溶剂应增设助溶剂对照组，助溶剂的浓度应与试验组中助溶剂的最高浓度一致。可采用较大的等比系数，可不设平行组。每个容器放5尾~10尾诸氏鲮虾虎鱼。观察并记录诸氏鲮虾虎鱼24 h（或48 h、96 h）的死亡情况，宜确定全部死亡和无死亡的浓度范围。

7.3 限度试验

当预试验结果受试物 LC_{50} 高于100 mg/L、原水样或受试物在试验条件下最大饱和浓度时，可相应进行浓度为100 mg/L、原水样或受试物在试验条件下最大饱和浓度的限度试验。

设置1个浓度组和1个对照组。若使用助溶剂应增设助溶剂对照组，助溶剂的浓度应与试验组中助溶剂的最高浓度一致。各试验组设3个平行。

7.4 正式试验

7.4.1 试验浓度设定

根据预试验结果选择合适的浓度范围，至少应设定5个浓度组（等比系数不宜大于2.0），并设一个空白对照组。若使用助溶剂应增设助溶剂对照组，助溶剂的浓度应与试验组中助溶剂的最高浓度一致。各试验组设3个平行。

7.4.2 诸氏鲮虾虎鱼分放

仔鱼采用适度强光诱使集中，用胶头滴管或手抄网在驯养箱中随机捞取，从低浓度组开始依次向高浓度组分放，每个容器10尾，在30 min内完成。

7.4.3 试验环境条件

同驯养环境条件，见附录B中的表B.1。

7.4.4 诸氏鲮虾虎鱼投喂

每尾仔鱼每天投喂约50个褶皱臂尾轮虫；每尾成鱼每天投喂约30个卤虫无节幼体。每个试验容器每次投喂体积不超过0.2 mL。

7.4.5 试验溶液更换

静态毒性试验不更换试验溶液。

半静态毒性试验定期（推荐24 h）更换一次试液，每次更换量为原试液体积的1/4~1/2。宜采用虹吸方式吸出原液，缓慢加入新液，操作过程中应避免触碰诸氏鲮虾虎鱼。

流水毒性试验应根据受试物的稳定性，每4 h~12 h更换一次贮备液。一个试验容器24 h的流量至少为该容器内试验溶液体积的5倍。试验期间流速变幅不大于10%。

7.4.6 试验观察和记录

试验开始和结束时应分别测量试验溶液水温、溶解氧、pH值、盐度。试验期间每隔24 h应测量一次试液温度。每24 h观察一次诸氏鲮虾虎鱼的体色、体形、活动、死亡等毒性效应。用胶头滴管轻吹诸氏鲮虾虎鱼无反应的判为死亡个体，应及时移出死亡个体。流水毒性试验每隔24 h应测量一次流速。应将观测结果记录于原始纪录表内，见附录C中的表C.1。

7.5 参比物质试验

外来诸氏鲮虾虎鱼试验前应进行1次参比物质的24 h生物毒性试验；本实验室繁育的诸氏鲮虾虎鱼，每月或每次毒性试验前进行1次参比物质的24 h生物毒性试验。

8 质量控制

有效的试验应符合以下条件：

- 试验结束时，对照组（包括空白对照组和溶剂对照组）诸氏鲮虾虎鱼死亡率不超过 10%；
- 在 23.0℃～27.0℃ 条件下，参比物质十二烷基硫酸钠（SDS）对 8 日龄～14 日龄诸氏鲮虾虎鱼仔鱼的 24 h LC₅₀ 应在 0.6 mg/L～2.4 mg/L 之间；对诸氏鲮虾虎鱼成鱼的 24 h LC₅₀ 应在 1.8 mg/L～4.6 mg/L 之间；
- 原始记录应完整，包括样品名称、编号、试验时间、评价依据、驯养及质量控制记录等。

9 结果与报告

9.1 结果计算

按照 GB/T 18420.2-2009 中规定的方法计算 LC₅₀ 及其 95% 置信限。

9.2 评价报告

评价报告应包括以下内容：

- a) 受试样品的名称、来源、保存方法、保存时间等；
- b) 诸氏鲮虾虎鱼来源、日龄或体长、驯养情况及 SDS 的 24 h LC₅₀ 值；
- c) 试验条件：
 - 1) 试验方法，如静态毒性试验、半静态毒性试验或流水毒性试验；
 - 2) 贮备液和试验溶液的配制方法、浓度；
 - 3) 各试验容器诸氏鲮虾虎鱼的数量；
 - 4) 试验溶液加入前和试验结束时的水质因子，如水温、溶氧、盐度、pH 等。
- d) 结果：
 - 1) 各试验组诸氏鲮虾虎鱼的死亡数；
 - 2) 试验期间，受试物对诸氏鲮虾虎鱼的毒性效应；
 - 3) 96 h 的 LC₅₀ 值及其 95% 的置信区间；
 - 4) 试验期间，可能会影响试验结果的因素。

10 诸氏鲮虾虎鱼安乐死

试验结束时向每个试验容器中加入 MS-222 溶液，使终浓度为 100 mg/L～500 mg/L，对实验鱼实施安乐死。MS-222 溶液的配制方法见 6.5。

11 实验室废弃物处理

按 SN/T 3592 的规定执行。

附录 A

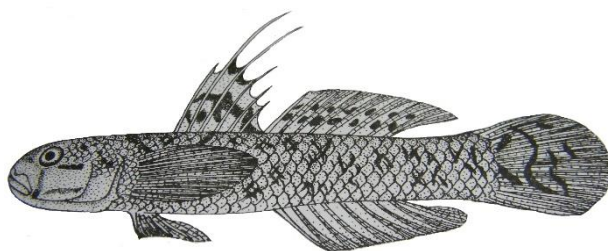
(资料性)

诸氏鲯虾虎鱼繁育方法

A.1 生物学特性

诸氏鲯虾虎鱼为暖水性底层小型海水鱼类，广泛分布于北至日本，南至菲律宾及印度尼西亚等西太平洋近岸、河口浅水水域。全长小于5.0 cm，性情温顺，广温、广盐，耐低氧。繁殖力强，雌鱼怀卵量可高达4000粒，控温条件下全年可多次繁殖。

诸氏鲯虾虎鱼的形态特征：a) 第一背鳍第二至第四鳍棘末端延长呈丝状，以第二和第三鳍棘最长；第一背鳍下的颈背部有斜行带状条纹，尾鳍基部有两个垂直排列的圆形或椭圆形斑点；b) 鳍式为D. V~VI, I-6~10; A. I-5~10; P. 12~17; V. I-7~12 (图A.1)。性成熟的雌鱼外生殖突膨大，外观呈椭圆形，无色素沉淀，半透明状，泄殖孔较大，位于生殖突的次末端，两侧稍隆起；雄鱼外生殖突比雌鱼小得多，呈三角形，颜色较深，泄殖孔开口于最末端。



图A.1 诸氏鲯虾虎鱼形态特征 (模式图引自伍汉霖, 2008)

A.2 诸氏鲯虾虎鱼培育环境

诸氏鲯虾虎鱼培育用水可采用天然海水或海盐配制水，水质应符合NY 5052的要求。

适宜环境因子范围为：水温22.0℃~30.0℃，盐度10‰~30‰，溶解氧≥4.0 mg/L，pH 7.0~8.5，自然光照或明暗时间比约为14 h:10 h，水面照度54 lx~324 lx。

A.3 繁殖与孵化

选择诸氏鲯虾虎鱼120日龄~360日龄健康亲鱼。

配对产卵后，宜及时移走亲本。

受精卵适宜孵化条件为：水温24.0℃~26.0℃、盐度10‰~20‰、溶解氧≥4.0 mg/L、pH 7.0~8.5、水面照度200 lx左右。

同一批收集的仔鱼孵出时间间隔不超过24 h。

A.4 诸氏鲯虾虎鱼的投喂管理

2日龄仔鱼开始投喂褶皱臂尾轮虫，投喂量以保持每毫升水体中的轮虫数量为10个~20个为宜。30日龄后补充投喂卤虫无节幼体，60日龄后投喂卤虫无节幼体或配合饲料，投喂量以5 min~10 min吃完为宜，每天投喂2次。

附 录 B
(规范性)
诸氏鲮虾虎鱼驯养方法

B.1 驯养鱼来源

驯养鱼应来源于人工繁育、同一批次、大小一致的诸氏鲮虾虎鱼群体。

B.2 驯养环境条件

表B.1 诸氏鲮虾虎鱼的驯养环境条件

项目	要求
水温	23.0 ℃~27.0 ℃，变化范围不宜超过2.0 ℃
盐度	10‰~30‰，与试验用稀释水变化范围不宜超过2‰
pH	7.0~8.5，变化范围不宜超过0.4
溶解氧	不低于5.0 mg/L
光照	室内自然光照或明暗时间比约为14 h:10 h，水面照度54 lx~324 lx
养殖密度	成鱼或亲鱼每升水体不超过5尾；仔鱼每升水体不超过200尾

B.3 驯养时间

幼成鱼应驯养14 d以上；仔鱼孵出时开始驯养，至毒性试验开始时结束驯养。

B.4 投喂

按照A.4执行。

试验前5 h~24 h停止喂食。

B.5 驯养鱼的处理

驯养鱼不进行疾病处理。

幼成鱼驯养48 h后，开始记录死亡率，并按下述方法处理：

——7 d内死亡率大于10%，舍弃全组鱼。

——7 d内死亡率在5%~10%之间，继续驯养7 d；在继续驯养的7 d内死亡率超过5%，舍弃全组鱼。

——7 d内死亡率小于5%，接受该组鱼。

仔鱼驯养5 d后，开始记录死亡率，3 d内死亡率大于10%，舍弃全组鱼。否则接受该组鱼。

附录 C

(资料性)

96 h 诸氏鲮虾虎鱼急性毒性评价原始记录表

C.1 96 h 诸氏鲮虾虎鱼急性毒性评价原始记录表

见表C.1。

表C.1 96 h 诸氏鲮虾虎鱼急性毒性评价原始记录表

样品名称：____ 样品编号：____ 评价依据：____
 样品表观性状：____ 评价日期：____ 记录时间：____
 毒性效应 (a) _____；毒性效应 (b) _____；
 毒性效应 (c) _____；毒性效应 (d) _____。

注：根据观察结果，可增加毒性效应编号。

组别	存活数	盐度 ‰	pH	DO mg/L	水温 ℃	流速 L/s	毒性效应
对照组	A						
	B						
	C						
组 1: mg/L	A						
	B						
	C						
组 2: mg/L	A						
	B						
	C						
组 3: mg/L	A						
	B						
	C						
组 4: mg/L	A						
	B						
	C						
组 5: mg/L	A						
	B						
	C						

注：“毒性效应”列填入的数字和字母分别表示出现死亡以外的毒性效应的鱼数及该效应的编号。

评价人（签名）：_____

复核人（签名）：_____

地方标准信息服务平台

广东省地方标准
诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价
第1部分：急性毒性
DB44/T 2340.1—2021

*

广东省标准化研究院组织印刷
广州市海珠区南田路 563 号 1304 室
邮政编码：510220
电话：020-84250337