

附件 11

《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验
(征求意见稿)》
编制说明

《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》标准编制组

二〇一七年十月

项目名称：水质 蚕豆根尖微核致突变性试验

项目统一编号：994

承担单位：常州市环境监测中心

编制组主要成员：滕加泉、周俊、徐东炯、曹志俊、程钟、沈丽娟、
陈志宁、陈桥、张小琼、汤云、张翔

标准所技术管理负责人：陈艳卿

环境监测司项目管理负责人：张宗祥

目 录

1 项目背景.....	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 工作过程.....	1
2 标准制订的必要性分析.....	2
2.1 致突变物的环境危害.....	2
2.2 相关标准和环保工作的需要.....	3
3 国内外相关分析方法研究.....	4
3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法.....	4
3.2 国内相关分析方法研究状况.....	5
3.3 现有蚕豆根尖微核试验方法与本方法标准的关系.....	5
4 标准制订的基本原则和技术路线.....	7
4.1 标准制订的基本原则.....	7
4.2 标准制订的技术路线.....	8
5 方法研究报告.....	9
5.1 方法研究的目标.....	9
5.2 术语和定义.....	10
5.3 方法原理.....	11
5.4 试剂和材料.....	11
5.5 仪器和设备.....	20
5.6 样品.....	21
5.7 分析步骤.....	22
5.8 结果计算与表示.....	30
5.9 质量保证和质量控制.....	34
5.10 实验室内各类水样的验证结果.....	34
6 方法验证.....	35
6.1 方法验证方案.....	35
6.2 方法验证过程.....	36
7 与开题报告的差异说明.....	38
7.1 方法性能方面.....	38
7.2 操作步骤方面.....	38
7.3 结果判定方面.....	38
8 标准实施建议.....	39
参考文献.....	39
附一 方法验证报告.....	41

《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2009年3月16日,根据中华人民共和国环境保护部(原国家环境保护总局)《关于开展2009年度国家环境保护标准制修订项目工作的通知》(环办函(2009)221号)的要求^[1],《水质 致突变遗传毒性测定 蚕豆根尖微核试验法》标准制订项目被列入国家环境保护标准制(修)订计划,项目统一编号:994。2010年11月5日,根据开题论证会意见,标准名称修改为《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》。

本标准项目主要承担单位:常州市环境监测中心(江苏省环境保护水环境生物监测重点实验室);参加单位:中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室。

1.2 工作过程

1) 成立标准编制组

2009年5月,接到本标准编制任务后,常州市环境监测中心成立标准方法编制组(以下简称“编制组”),成员以多年从事生物监测及环境科研工作的高级工程师和工程师为主。

2) 查询国内外相关标准和文献资料

2009年6月~11月,编制组完成资料收集、文献调研、仪器调试,追踪蚕豆根尖细胞微核技术在国内外的最新研究成果及发展趋势,分析该技术在我国相关领域的应用现状及前景,并对其在我国环境监测领域应用中的优势和不足进行探讨,在此基础上初步拟定标准方法制订的基本原则和技术路线。

3) 召开研讨会,开展方法试验

2009年12月,邀请行业内专家召开专题讨论会,就标准编制的重点、难点和关键问题进行充分研讨,确定试验方案。2010年1月~10月,编制组开展了标准方法各环节试验条件初探、参比物质筛选等研究工作,编写《水质 致突变遗传毒性测定 蚕豆根尖微核试验法》的开题论证报告和标准文本草案。

4) 开题论证,确定标准制订的技术路线

2010年11月,环境保护部科技标准司在北京召开本标准开题论证会,论证委员会要求将标准名称修改为《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》,标准适用范围明确为“地表水、地下水、废水、垃圾渗滤液的蚕豆根尖微核致突变性测定”,将“结果表达与污染程度的划分”改为“结果判定”。同时要求编制组明确下一步的工作方向:增加受试生物技术要求的规范性附录;通过实验明确参比物质种类;进而以参比物质、代表性样品或基体模拟样品开展方法验证。

5) 落实意见,深入开展方法试验

2010年12月~2012年8月,根据开题论证意见,编制组按照《国家环境保护标准制修订工作管理办法》(国家环境保护总局2006年第41号)、《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168—2010)和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》(环

科函〔2009〕10号)的要求深入开展试验研究,确立了标准方法最佳试验过程条件参数、参比物质种类及最佳浓度,期间由于受试生物松滋青皮豆供应量长期受限,试验周期较长。

6) 组织方法验证工作

2012年9月~10月,编制组组织6家有资质实验室进行本方法的验证工作,随后对数据进行汇总和整理分析。

7) 建立基地,解决受试生物保种难题

2013年7月,编制组与华中师范大学的陈光荣和金波老师签订无偿转让协议,将受试生物松滋青皮豆的保种权交由常州市环境监测中心。编制组通过实地踏勘和筛选,在自然环境较好的常州市溧阳大溪水库边建设了保种场。2014年6月,对收获的松滋青皮豆进行微核率本底值检验,满足本标准规定的质量控制技术要求。

8) 编写标准征求意见稿和编制说明(含方法验证报告)初稿

2012年11月~2015年4月,编写完成《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》的标准文本征求意见稿和编制说明初稿。

9) 征求意见稿和编制说明专家研讨

2015年5月~10月,召开《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》标准文本征求意见稿和编制说明初稿的专家研讨会,专家建议补充国内外分析方法中的主要技术内容和指标;方法验证报告中对方法准确度的测试结果的相关表述应纳入质量保证与质量控制条款;进一步规范文本表述,统一数据结果有效位数;同时口头提出标准名称应为三段式,待标准正式征求意见稿后修改。编制组根据专家意见进行了修改。

10) 征求意见稿和编制说明修改

2015年11月~2017年7月,对受试生物松滋青皮豆保种场地的环境背景进行监测,并将保种收获的松滋青皮豆无偿提供给中国疾病预防控制中心和北京市疾病预防控制中心进行试验,收集更多方法条件的验证数据。同时,编制组根据环境监测司的最新要求,按照《国家环境保护标准制修订工作管理办法》(国环规科技〔2017〕1号)及《国家环境保护标准“十三五”发展规划》(环科技〔2017〕49号)文件要求,进一步完善标准征求意见稿和编制说明。5月提交至技术支持单位审核,根据审核反馈意见修改,7月再次提交技术支持单位,审核通过后,正式行文向环境保护部监测司申请召开征求意见稿技术审查会。

11) 征求意见稿技术审查

2017年8月4日,在北京正式召开本标准征求意见稿技术审查会,会议审查结论为通过,同时形成如下修改意见:进一步规范术语和定义;调整、简化分析步骤,完善文本结构;增加资料性附录,包括记录和报告格式及相关图片;进一步完善编制说明。编制组根据专家意见进行修改完善后,正式提交本标准征求意见稿及编制说明。

2 标准制订的必要性分析

2.1 致突变物的环境危害

1) 致突变物和致突变作用

致突变物又称诱变物,使突变率超过自发突变率水平的环境因素。包括物理性致突变物

(如紫外线、电离辐射等), 生物性致突变物(如某些病毒), 化学性致突变物(如改变碱基结构的非烷化剂、烷化剂、需代谢活化的芳香族化合物、碱基类似物、嵌入剂、有丝分裂毒物等)。致突变作用是指使生物遗传物质发生非自然的突变过程。可分为三类: ①点突变或基因突变的发生; ②致断裂作用, 染色体发生断裂, 导致染色体片断的获得、丢失或重排; ③致非整倍体作用, 指获得或丢失一个或多个完整的染色体^[2]。形成细胞微核的致突变作用主要是致断裂作用。

2) 致突变物的环境危害

致突变物具有较强的生物危害性, 即使是痕量的存在都会对环境安全及人体健康产生较大风险。它主要表现为“三致”效应, 即致癌、致畸和致突变作用, 其中致突变作用又是致畸作用和致癌作用的生物学基础。致突变物通过直接接触或食物链的传递作用于生物体, 特别是通过饮用水、农产品等与环境密切相关的产品作用于人, 其污染往往导致环境中生物和人群新生个体畸形率及成体癌症发病率大大增加。致突变物污染较重的水域常可见畸形蛙、畸形鱼等水生动物, 我国中东部集中分布的“癌症村”也与环境致突变物的污染密切相关。因此, 致突变物的污染对生态系统中生物群落的健康发展以及人类社会的健康水平具有极大危害, 应纳入环境监测与管理的指标体系。

2.2 相关标准和环保工作的需要

1) 环境监管的迫切需求

随着化学工业的快速发展, 进入环境的致突变物剧增, “三致”效应危害凸显, 环境风险的增加使得生态安全和人体健康受到潜在威胁。目前我国医疗卫生系统将人外周血淋巴细胞微核率测定作为监控辐射污染等造成的慢性职业病、预防肿瘤等恶性疾病的重要检测手段。通过检测目标组人群与对照组人群的淋巴细胞微核率是否存在显著性升高, 来判断目标组人群的潜在疾病风险^[3-5]。在环境风险监控方面, 我国的环境监测分析方法标准、环境质量和污染物排放(控制)标准体系中, 已经纳入了某些具有遗传毒性的特定污染物指标。如监测分析方法标准中有《动、植物中六六六和滴滴涕测定 气相色谱法》(GB/T 14551—2003)、《水质 苯系物的测定 气相色谱法》(GB 11890—1989)等, 对应的环境质量标准《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)、《渔业水质标准》(GB 11607—1989)以及污染物排放标准《污水综合排放标准》(GB 8978—1996)、《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918—2002)中对六六六、滴滴涕、苯胺类等遗传毒物也做出了分级限值规定。但是众所周知, 环境中的遗传毒物不胜枚举, 某一环境介质中很可能同时存在多种遗传毒物, 其协同作用下还可能对生物产生更强的遗传危害, 因此很有必要对环境介质中的综合遗传毒性物质进行监管。但是目前在我国环境监管的整个标准体系中, 暂未纳入任何能有效反映环境遗传毒性综合效应的指标, 这一缺失, 使环境遗传毒性风险无法被科学全面的评估和判断。在此前提下, 本标准的制订就具有突破性意义, 它将能作为表征环境介质的致突变综合遗传毒性效应指标引入环境监管标准, 例如该标准对已在制定中的《废水综合毒性评价技术规范》具有潜在应用价值, 为开展环境生态风险监测和评价提供技术支撑, 满足对环境介质致突变性监管的迫切需求。

2) 环境保护重点工作的要求

早在上世纪 80 年代, 对环境致突变性的监测已开始受到足够重视, 并在基础医学、环

境毒理学、污染生态学中进行广泛的研究应用，但由于监测分析方法尚不成熟，推广进程比较缓慢。随着对环境风险监管需求越来越迫切，尽快制订完善的环境介质致突变性的监测技术方法被提上日程，以适应当前饮用水源保护、城市污水排放监管、重点污染源减排、重金属污染评估防治等环保重点工作的需求。关注环境污染对人体健康和生态安全的影响，提升环境致突变性的监测技术能力显得尤为必要。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法

遗传毒性测定可采用细菌、动物及植物等各种生物作为受试生物，可采用基因突变试验、染色体畸变试验及微核试验等多种手段，微核试验是遗传毒性试验中比较有代表性的一类试验。近年来随着替代（replacement）、减少（reduction）、优化（refinement）的“3R”原则在动物实验设计中推行，出于对动物福利的考虑，要求尽可能采用低等或非实验动物代替高等实验动物进行实验，这使得利用植物为受试生物检测遗传毒性的技术在国际上受到重视。

众所周知，蚕豆是经典的遗传实验生物，蚕豆根尖也是较为理想的遗传毒性测试材料，它首先应用于染色体畸变试验，随后扩展到微核试验。早在 1959 年，放射生物学家就开始用蚕豆的根尖细胞来进行 X-射线的遗传损伤研究^[6]，此后蚕豆根尖染色体畸变技术逐渐发展成熟，作为一种检测化学品遗传学毒性的方法为人们所熟知^[7]。1988 年国际化学品安全委员会（IPCS）组织了一次涉及 6 个国家 17 个实验室的大型试验，分别用几种不同的植物检测系统来鉴定未知样本的致突变性，结果表明：蚕豆根尖染色体畸变试验的假阴性率最低，可以检出最多的阳性致突变物^[8]。1982 年 Degrassi 和 Rizzoni 研究 X-射线、丝裂霉素 C 等多种诱变剂对蚕豆根尖（次生根）微核的效应，建立了蚕豆根尖细胞微核试验系统，他们指出微核试验与染色体畸变试验相比，同样具有准确、快速、明显的剂量反应关系等特点，操作更简便，也更适于大批量样品的检测，特别适合环境遗传毒性监测^[9]。

20 世纪 70 年代，Heddle 和 Schmid 利用啮齿类动物骨髓细胞建立了微核试验检测方法^[10,11]，此后各国都在不断研究探索微核试验技术。微核试验方法分为体内和体外试验，应用领域包括医药卫生检测、食品安全检测、化妆品安全检测、环境监测等方面。目前，国际上正式颁布的环境致突变性微核试验方法标准，主要有美国国家环境保护局（EPA）颁布的 EPA: OPPTS 870.5395-1998 《Health Effects Test Guidelines. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test（健康效应测试导则 哺乳动物红细胞微核试验）》；世界经济合作与发展组织（OECD）颁布的《Guideline for Testing of Chemicals No. 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test(化学品测试导则 474 号 哺乳动物红细胞微核试验)》（2014-9-26）和《Guideline for Testing of Chemicals No. 487, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test（化学品测试导则 487 号 体外哺乳动物细胞微核试验）》（2015-7-28）；国际标准化组织（ISO）颁布的 ISO 21427-1-2006 《Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae（水质 利用微核测定评估遗传毒性 第 1 部分：两栖动物幼体微核试验）》、ISO 21427-2-2006《Water

quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 2: Mixed population method using the cell line V79 (水质 利用微核测定评估遗传毒性 第2部分:细胞系 V79 微核试验)》、ISO 29200-2013《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test (土壤质量 高等植物遗传毒性效应评估 蚕豆微核试验)》。其中 ISO 29200-2013 标准对本标准制订具有重要参考意义,该标准主要适用于土壤(或土壤材料)、土壤渗滤液的遗传毒性评估,也可用于化学品、水和废水等的遗传毒性评价。

微核测试的关键仪器设备是光学生物显微镜,微分干涉、荧光标记、图形处理等当前先进的显微镜相关技术对改善微核观察和识别起到积极的作用。此外,美国自然基因科技有限公司(NatureGene Corp., USA)研发了基于图形自动捕获和鉴别技术的用于测定淋巴细胞微核的智能全自动微核分析系统,对研发微核的全自动辨识技术起到很好的启发借鉴作用。近年来,基于流式细胞仪的微核自动化检测技术得到很好的发展,它与传统镜检技术相比,具有高通量检测的显著优势,成为极具潜力的微核检测平台。

3.2 国内相关分析方法研究状况

国内关于微核试验技术的报道最早见于1978年,是中国科学院云南动物研究所关于病人放射治疗时人外周血淋巴细胞微核率和染色体畸变率的关系的研究^[12]。国内外大量的对比试验研究表明,微核试验在敏感性、特异性和准确性方面与经典的染色体畸变分析方法基本相当,同时具有经济、简单、快速的特点,具有较好的应用前景^[13],至20世纪80年代中期,国内连续举办了5次有影响的微核技术培训班,共培训近百家大专院校和研究单位的研究人员300多名,对微核试验在我国的推广应用起到很大作用。此外,1984年中国环境诱变剂学会成立,其每两年召开一次全国性学术会议,对微核试验技术的交流推广起到积极作用^[14]。目前,微核试验广泛应用于药品、食品添加剂、农药、化妆品、环境污染物的遗传毒性检测以及职业暴露人群遗传损害监测方面,卫生、商检、食品等行业已制定和颁布的微核检测方法相关标准有:《化妆品安全性评价程序和方法(3.3.4 动物骨髓细胞微核试验)》(GB 7919—1987)、《淋巴细胞微核估算受照剂量的方法》(WS/T 187—1999)、《危险品哺乳动物红细胞微核试验方法》(SN/T 2178—2008)、《化学品体内哺乳动物红细胞微核试验方法》(GB/T 21773—2008)、《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》(GB 15193.5—2014)等,这些标准反映出目前我国微核检测技术的发展水平,对本标准制定具有很好的借鉴作用。

1983年华中师范大学的陈光荣、金波老师等在国内首先建立蚕豆根尖(初生根)微核试验方法。1986年原国家环境保护局将该方法列入《环境监测技术规范》(生物监测(水环境)部分)规范方法,1992年编入《水生生物监测手册》(东南大学出版社),随后又编入《水和废水监测分析方法》(第四版,中国环境科学出版社,2002年),成为用于检测环境水样和废水遗传毒性的方法。在蚕豆根尖微核检测实验器材方面,上海交通大学开发了主要用于教学的蚕豆根尖微核试验试剂盒,对推广蚕豆根尖微核试验起到很好的支持。

3.3 现有蚕豆根尖微核试验方法与本方法标准的关系

现有成熟的蚕豆根尖微核试验方法,国际上是以蚕豆次生根为受试材料的

ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》方法，国内是以蚕豆初生根为受试材料的《水和废水监测分析方法》（第四版）中蚕豆根尖微核试验方法（B类方法）。由于受试器官不同，导致两种试验技术方法在浸种催根时间、根尖处理等试验条件上有所差异。本标准方法的制定以《水和废水监测分析方法》（第四版）方法为基础，参照借鉴 ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》方法，并对关键检测条件进行实验优化筛选，与上述两种方法的比较见表 1 和图 1。

表 1 国内外相关试验方法主要技术指标比较

指标	ISO 29200-2013 方法	水和废水监测分析方法 (第四版)	本标准方法
适用范围	适用于土壤（或土壤材料）、土壤渗滤液的遗传毒性评估，也可用于化学品、水和废水等的遗传毒性评价	适用于环境水样或污水的遗传毒性评价，化学品或污染物的安全性评估	适用于环境样品 地表水、地下水、废水、垃圾渗滤液 的致突变性测定
受试生物/器官	阿瓜杜尔塞蚕豆 / 次生根	松滋青皮豆 / 初生根	松滋青皮豆 / 初生根
细胞染色剂	醋酸-地衣红染色液	席夫氏 (Schiff) 试剂, 热配法	席夫氏 (Schiff) 试剂, 冷配法 (Kodousek 法)
参比物质及浓度	马来酰肼 / 固相 1.12 mg/kg、液相 1.12 mg/L	无	环磷酰胺, 20.0 mg/L , 实验优化所得 (ISO 21427-1-2006 两栖动物幼体微核试验环磷酰胺 20.0 mg/L, ISO 21427-2-2006 细胞系 V79 微核试验环磷酰胺浓度 2.5 mg/L)
样品采集	渗滤液装入玻璃容器	无	使用 棕色玻璃瓶 （或 聚丙烯、聚四氟乙烯、聚乙烯 材质的容器）按照 HJ/T 91 或 HJ/T 164 规定要求采集水样，满瓶密封
样品运输与保存	渗滤液 4 °C±3 °C 保存不超过 24 h	4 °C 保存	0 °C~5 °C 避光运输和保存，不超过 48 h ；需长期保存，则尽快于 -18 °C 保存，不超过 2 个月 （参照 ISO 5667-16-2017）
样品预处理（温度调节）	试验开始前，24 °C±1 °C 恒温	无	低于 -18 °C 保存的水样，不超过 25 °C 解冻，或在 2 °C~8 °C 冷藏过夜解冻（参照 ISO 5667-16-2017）；试验开始前， 25 °C±1 °C 恒温避光 平衡 2 h
样品预处理（pH 调节）	调节至 5~8	无	当 pH<5.5 或 >8.5 时， 调节 pH 至 5.5~8.5 （《农田灌溉水质标准》（GB 5084—2005））
实验用水准备	无	无	25 °C±1 °C 平衡 2 h
浸种	6 h~24 h	26 h~30 h	26 h~30 h ，一般可为 27 h ，实验优化所得
催根	渗滤液 7 d 左右	分两步操作：先催根 12 h~30 h 选取初生根露出 2.0 mm~3.0 mm 发根良好的种子，再继续催根 36 h~48 h 至大部分初生根长至 2.0 cm~3.0 cm	合并操作步骤，直接催根 62 h~66 h 后，挑选初生根 1.5 cm~2.0 cm 且生长发育良好的豆种用于后续试验，实验优化所得
受试水样急性毒性预试验	稀释倍数不超过 2，样品浓度梯度需覆盖大范围（如 0.01%~100%）	无	检测受试水样是否存在急性毒性，按 10 倍稀释 至少 5 个逐级稀释浓度的样品（含原液），保证 至少有一个 稀释

指标	ISO 29200-2013 方法	水和废水监测分析方法 (第四版)	本标准方法
			样品中所有根尖均不出现急性毒性受害症状；找出根有急性毒性受害症状的最低浓度 x ，被测样品按 $x/2.5$ 、 $x/5$ 、 $x/10$ 等 3 个稀释浓度正式进入催根步骤
根尖处理	30 h~48 h	4 h~6 h	6 h ，实验优化所得
根尖恢复培养	无	22 h~24 h	24 h
根尖固定	卡诺氏液固定过夜	卡诺氏液固定 24 h	卡诺氏液 固定 2 h，不超过 24h
孚尔根染色水解	1.0 mol/L HCl 在 60 °C 水解 6 min	5.0 mol/L HCl 在 28 °C 水解 25 min	1.0 mol/L HCl 在 60 °C 水解 10 min (实验优化所得)
制片	截取第二个 1.0 mm 左右顶部根尖	截取 1.0 mm 左右根尖	截取第二个 1.0 mm 左右顶部根尖
镜检	3 平行×至少 2 压片×观察 1 000 个细胞，有丝分裂指数>20‰	3 根尖×观察 1 000 个细胞	3 平行×至少 2 根尖×观察 1 000 个细胞，有丝分裂指数>20‰
对照试验	每批样品测试时，分别进行阴性和阳性对照试验，阳性对照与阴性对照相比微核率有显著性差异	每批受试水样测试时，进行阴性对照试验，阴性对照微核率≤10‰	每批受试水样测试时，分别进行 阴性和阳性对照试验 ，阴性对照微核率≤6.6‰，阳性对照微核率取值范围 15.8‰~30.8‰ （ISO 21427-1-2006 两栖动物幼体微核试验阴性对照微核率 <i>Xenopus laevis</i> ≤1‰， <i>Pleurodeles waltl</i> ≤2‰；阳性对照与阴性对照相比微核率有显著性差异）
结果判定	用非参数方法（如 Kruskal -Wallis 检验结合邓恩多重比较法），比较样品与阴性对照的显著差异，来评价样品是否存在致突变性	以微核率结果所处的区间直接划分受试水样污染等级；以受试水样与阴性对照微核率比值计算污染指数，进行污染分级	利用适当的 统计学方法 （如 u 检验 ），比较 受试水样与空白水样 （阴性对照）的根尖微核总数 是否存在显著差异 ，来评价受试水样是否存在致突变性（国内外微核试验标准方法都仅比较上述显著性差异）



图 1 国内外相关分析方法主要技术流程

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

本标准依据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（国环规科技〔2017〕1号）、

《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》（环科函〔2009〕10号）和 HJ 168—2010《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》要求，以国内外最新的标准方法和相关文献研究成果为编制基础。同时考虑到国内现有监测机构的技术水平、管理水平、经济条件等实际情况，确保所编制标准能够在全国范围内推广应用。标准制订主要遵循基本原则如下：

1) 方法性能满足相关环保标准（例如已在制定中的《废水综合毒性评价技术规范》）和环保工作的要求；

2) 方法准确可靠，对原有方法《水和废水监测分析方法》（第四版）中的蚕豆根尖微核试验方法（B类方法）进行技术修正和完善，筛选、优化和明确各试验环节条件参数，确定参比物质、参比浓度及其微核率取值范围，提高方法的性能，为相关环保管理标准的制订和环境监管工作的开展奠定技术方法基础；

3) 方法具有普遍适用性，原理科学、取材方便、操作简明，易于推广使用，适合各级环境监测部门日常检测工作。

4.2 标准制订的技术路线

蚕豆根尖微核试验方法是检测水质致突变性的常用监测指标，目前国内普遍使用以初生根为受试器官的蚕豆根尖微核测试技术，具有浸种催根周期短、取样部位容易控制、分生组织细胞较多等优势。该方法本身技术难度不高、试验周期相对较短、实验环境要求不苛刻、实验所需仪器常规、测试成本低，在市级站甚至县级站都可快速形成能力，在环境监测领域具有广泛的应用前景。

目前我国尚无蚕豆根尖微核致突变性相应的检测标准方法，接受度较高的是以初生根为受试器官的测试体系，但在测试技术的发展实践中也暴露出一些问题，这在一定程度上限制了方法的推广应用。例如对受试生物缺少限定和质控，导致试验结果可比性不佳；对浸种催根、根尖处理等时间未精准控制，导致试验结果存在偏差；孚尔根染色的条件参数不够优化，容易造成水解过度；测试体系中缺少参比物质及其最佳参比浓度限定，影响了对试验准确性的把控；这些需要确认和探讨的内容正是本标准制定的关键技术环节。

本标准制定的技术路线以《水和废水监测分析方法》（第四版）中的蚕豆根尖微核试验方法（B类方法）为主要技术体系，重点参照 ISO 29200-2013《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》方法。同时，针对原技术体系中存在缺失的关键技术环节开展系列试验，筛选最佳条件参数，对技术方法进行补充和完善，最后通过配制参比水样和实际受试水样实验室内及实验室间的比对，确认所制定的方法准确可靠，实现蚕豆根尖微核技术的规范化和标准化，为本方法标准在环境管理中的应用奠定基础。编制组编制标准方法的技术路线分为：开题、实验研究、方法验证、征求意见、审查和发布等五个阶段（见图2）。

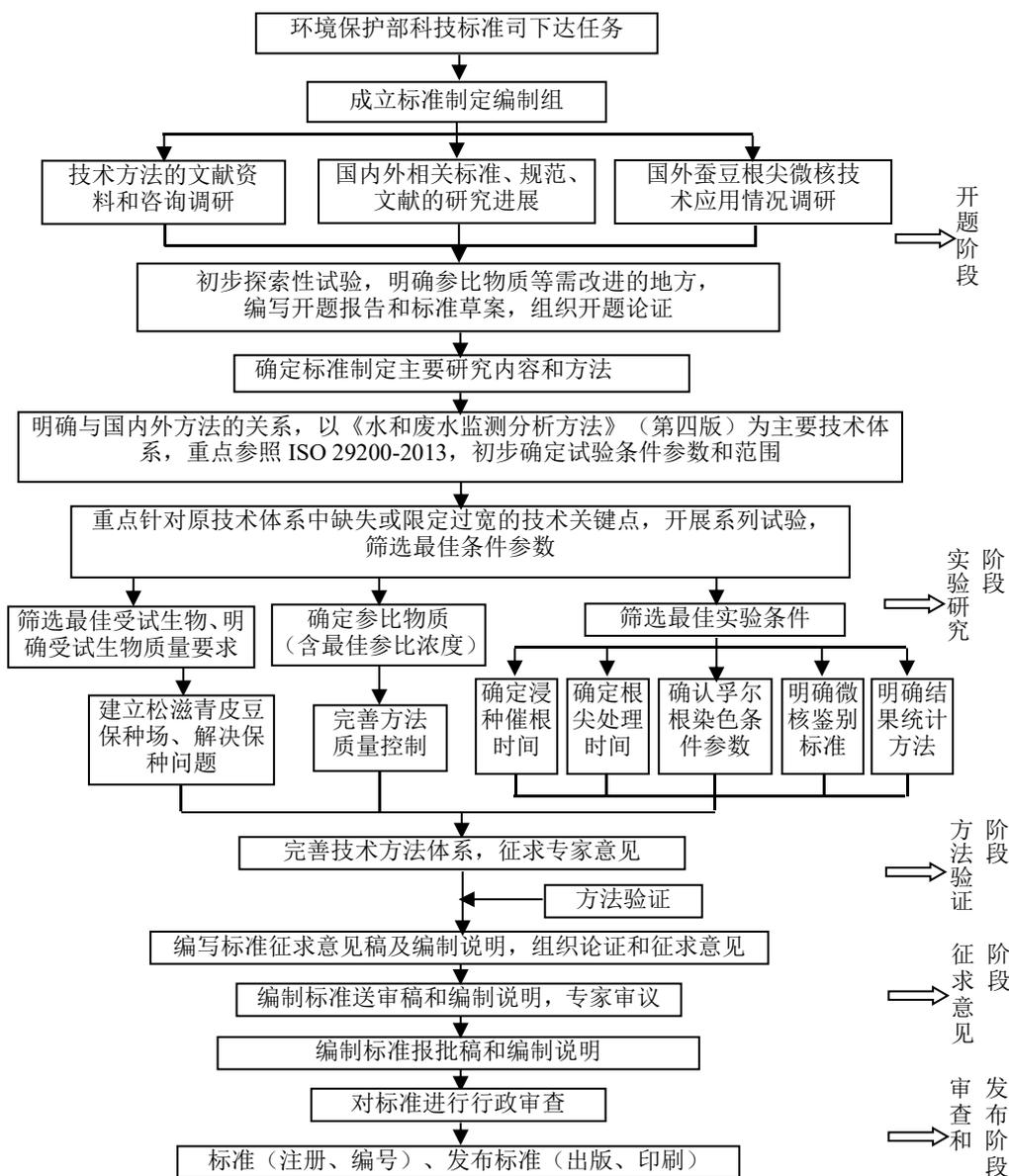


图 2 标准制订技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

5.1.1 本方法标准适用的环境要素、被测对象

根据开题论证时专家组意见，本标准规定了水质致突变性测定的蚕豆根尖微核试验方法，适用于环境样品地表水、地下水、废水、垃圾渗滤液的致突变性测定。

5.1.2 本方法标准拟达到的技术要求

本方法测定的是水质的致突变遗传毒性综合效应，测试目标非单一物质，测定结果以受试水样与清洁对照水样根尖细胞中微核率水平的差异来判断受试水样致突变遗传毒性的存在与否，由于各受试水样成分和性质不同，不适于套用检出限和测定范围的概念。

微核致突变性遗传毒性试验的方法性能适宜于用精密度来衡量。微核率较低的受试水

样其微核率测定结果的离散程度较大；反之，离散程度较小。因此不宜对任意受试水样的平行样给出统一的精密度控制要求，故本方法以特定的受试水样（环磷酰胺参比水样， $\rho=20.0\text{ mg/L}$ ）的平行样对精密度进行控制，确定 2 个平行样微核率均应介于 15.8‰~30.8‰（见 5.9.3）。

本方法测定受试水样致突变性的有无，其测定的是生物效应的存在与否，而不是某一特定污染物质的量，不宜用准确度作为方法性能的指标。这里，我们以空白水样和参比水样微核率是否满足其取值范围来对方法的有效性和敏感性进行质量控制，通过验证试验确定空白水样（实验用水）和参比水样（环磷酰胺， $\rho=20.0\text{ mg/L}$ ）微核率取值范围分别为 $\leq 6.6\%$ （见表 6）和介于 15.8‰~30.8‰（见表 7）。

通过确定方法性能指标，对原有方法《水和废水监测分析方法》（第四版）中的蚕豆根尖微核试验方法（B 类方法）进行技术修正和完善，提高方法可靠性和结果可比性。

5.2 术语和定义

5.2.1 微核 micronucleus

在细胞有丝分裂（减数分裂）后期，由于整条染色体或染色体片段滞留细胞质中，末期以后，它们在子细胞的细胞质内形成单个或多个小核，因比主核小得多，故称微核。

以上定义，综合参考 ISO 21427-1-2006 《Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae》和 ISO 21427-2-2006 《Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 2: Mixed population method using the cell line V79》中对微核的定义“small particles consisting of acentric fragments of chromosomes and/or entire chromosomes which lag behind at anaphase stage of cell division and form, after telophase, single or multiple micronuclei in the cytoplasm.——在细胞分裂和新细胞形成的有丝分裂后期，由于染色体片段或/和整条染色体运动滞后，末期以后，在细胞质中形成单个或多个微核”；《危险品哺乳动物红细胞微核试验方法》（SN/T 2178—2008）中对微核的定义“在细胞的有丝分裂后期，染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍然滞留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝点断片，或因纺锤体受损而丢失的整条染色体。它在末期以后，单独形成一个或几个规则的次核，被包含在子细胞的胞质内而形成，因比主核小，故称为微核”；及《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》（GB 15193.5—2014）中对微核的定义“细胞有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍留在细胞质中的整条染色单体或染色体的无着丝断片或环。在末期单独形成一个或几个规则的次核，被包含在细胞的胞质内而形成”。

5.2.2 有丝分裂指数 mitotic index

观察每 1 000 个细胞中，处于有丝分裂期（即 M 期，包含前期、中期、后期、末期）的所有细胞数占总细胞数的比率。

根据 ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》中对有丝分裂指数的定义“number of cells in division per 1 000 cells observed when all of the stages of the mitosis are taken into account, from the prophase

(when the chromosomes begin to condense) up to the telophase (when the chromatin of the two nuclei formed at each pole of the cell finishes decondensing)——观察每 1 000 个细胞中的细胞分裂数，所有处于有丝分裂期的细胞都应被计数，从前期（当染色体开始凝结）直至末期（当细胞完成解凝，染色质在两极形成两个子细胞核）”。

5.2.3 参比物质 reference substance

测试中，用于验证方法敏感性的已知阳性对照物质（依据 ISO 5667-16《Water quality — Sampling—Part 16: Guidance on biotesting of samples》中对参比物质的定义“known substance to verify the sensitivity of the method——用于验证方法敏感性的已知物质”）。

5.3 方法原理

将经过浸种催根后长出的蚕豆初生根暴露于受试水样中处理一定时间，经恢复培养、固定染色后，制片镜检，以蚕豆根尖初生分生组织区（参见图 13）细胞及其微核为观察对象，由于致突变物质或因素可引起细胞微核的增加，通过比较受试水样与空白水样处理后蚕豆根尖细胞中微核率水平的差异，判断受试水样致突变遗传毒性的存在与否。

5.4 试剂和材料

5.4.1 受试生物

5.4.1.1 受试生物验证

1984 年~1985 年，华中师范大学选用水胺硫磷、马拉硫磷、乐果等农药，对产自湖北、四川、江苏、浙江等省份 14 种蚕豆（分别由湖北省农科院品种资源研究室、华中农学院农学系提供）的敏感性进行筛选，通过运用方差分析、F 检验和 SSR 测验对实验结果进行统计学分析，筛选结果表明松滋青皮豆是最理想的高敏感性品种^[15,16]。松滋青皮豆原产于湖北省松滋县，是一种中粒（千粒重 600 g~1 100 g 之间为中粒蚕豆^[17]）绿色蚕豆，经长期纯化保种，其遗传特性相对稳定，作为水质致突变性试验的受试生物被国内广泛接受，在我国大部分地区均可引种繁殖。

为验证松滋青皮豆用作受试生物的可行性，本标准研究期间，先后从江苏沿江地区农科所购买海门大青皮豆、通蚕 6 号和启豆 2 号，从常州市蔬菜种子站购买常州本地青皮豆等蚕豆，与松滋青皮豆进行了空白本底和毒物敏感性比对试验。结果表明，海门大青皮豆、通蚕 6 号、启豆 2 号、常州青皮豆对毒物敏感性明显较差，同时启豆 2 号和常州青皮豆的本底微核率明显偏高（见表 2），松滋青皮豆的本底微核率低且对毒物敏感性高，是最佳受试生物。考虑到试验结果的可比性，蚕豆根尖微核致突变性试验的受试生物统一为松滋青皮豆，不建议随意选择本地蚕豆种作为受试生物。

表 2 5 种蚕豆在空白水样和不同浓度参比物质处理下的根尖微核率（单位：%）

蚕豆种类 (产地)	松滋青皮豆 (湖北省松滋县)			海门大青皮豆 (江苏省海门市)			通蚕 6 号 (江苏省南通市)			启豆 2 号 (江苏省启东市)			常州青皮豆 (江苏省常州市)		
	\bar{x}_i	S_i	RSD,%	\bar{x}_i	S_i	RSD,%	\bar{x}_i	S_i	RSD,%	\bar{x}_i	S_i	RSD,%	\bar{x}_i	S_i	RSD,%
空白水样（去离子水）	4.7	1.8	37.7	4.8	1.7	34.5	8.5	2.4	27.8	11.8	2.9	24.9	15.8	2.8	17.7
2.0 mg/L 环磷酰胺	11.7	2.6	22.3	7.3	1.7	23.5	11.8	2.1	17.6	13.5	2.6	19.2	17.2	2.3	13.4
20.0 mg/L 环磷酰胺	20.8	3.0	14.2	12.8	2.2	17.0	17.2	2.7	15.9	15.3	2.7	17.9	19.3	2.3	11.9

100 mg/L 环磷酰胺	28.5	3.3	11.5	14.2	1.7	11.7	20.2	2.5	12.3	17.5	4.1	23.3	21.0	2.1	9.9
200 mg/L 环磷酰胺	24.8	4.0	16.1	12.2	1.8	14.6	22.2	4.0	18.1	19.5	2.2	11.3	24.0	3.3	13.8

5.4.1.2 受试生物特性

1) 松滋青皮豆是国内广泛接受用于水质致突变性测试的敏感受试生物,用于试验和保种的松滋青皮豆均应有可靠证明溯源至经华中师范大学原生物系筛选出的敏感豆种。

2) 通过测定,松滋青皮豆每千粒重一般为 706 g~787 g (见图 3、表 3), 属中粒蚕豆。



图 3 松滋青皮豆

表 3 松滋青皮豆 1 000 粒重测定结果

测定组编号	每 1 000 粒重 (g)	测定组编号	每 1 000 粒重 (g)
1	745	10	745
2	750	11	790
3	740	12	740
4	735	13	755
5	750	14	765
6	760	15	725
7	720	16	745
8	750	17	750
9	730	18	740
平均值 \bar{x} (g)		746	
99%置信区间 (g)		706~787	

3) 经浸种、催根后,统计总豆种数,及霉变、不出根、根尖枯死的豆种数,出根率=(总豆种数-霉变、不出根、根尖枯死的豆种数)/总豆种数×100%,一般应≥90% (《粮食作物种子 第 2 部分:豆类》(GB 4404.2—2010)中要求蚕豆种子发芽率≥90%),试验前将松滋青皮豆自然晾晒 2~3 天有利于出根。

4) 催根结束后,应选取根长较为一致的根尖用于后续试验,选取根长 1.5 cm~2.0 cm 发育良好、粗细一致的根尖较为合适。蚕豆次生根长出前,初生根生长充分的阶段应是本试验的最佳试验阶段。根的长度与蚕豆生长发芽所处的阶段有关,一批种子浸种催根后,生长快慢有所不同,根长大于 2.0 cm 的蚕豆,在根尖恢复培养后期往往已长出次生根;而

根长小于 1.5 cm 的蚕豆，生长缓慢，达到次生根生长需要更长时间，同时过短的根尖不便于根尖处理（将根尖暴露于水样中）的实验操作；根长 1.5 cm~2.0 cm 的蚕豆，生长健壮且较为同步，经根尖恢复培养后刚好处于次生根长出前的临界阶段。因此，考虑选用根长 1.5 cm~2.0 cm 的蚕豆最为合适。

催根后，根长 1.5 cm~2.0 cm 发育良好、粗细一致的根尖一般≥25%，其可供参考的 99%置信区间为 24.7%~55.7%（见表 4）。

表 4 每 100 粒松滋青皮豆催根（25 °C 下催根 64 h）后根长测量结果

测定批次	<1.5 cm		1.5 cm~2.0 cm		>2.0 cm	
	数量 (个)	占比 (%)	数量 (个)	占比 (%)	数量 (个)	占比 (%)
1	46	46.0	35	35.0	19	19.0
2	45	45.0	42	42.0	13	13.0
3	35	35.0	52	52.0	13	13.0
4	50	50.0	38	38.0	12	12.0
5	39	39.0	41	41.0	20	20.0
6	53	53.0	33	33.0	14	14.0
7	42	42.0	47	47.0	11	11.0
8	46	46.0	36	36.0	18	18.0
9	57	57.0	35	35.0	8	8.0
10	41	41.0	43	43.0	16	16.0
1.5 cm~2.0 cm 占比平均值 \bar{x} (%)				40.2		
99%置信区间 (%)				24.7~55.7		

5.4.1.3 受试生物质量要求

松滋青皮豆可采用直接购买或自行保种的方式获取，其来源应参考 5.4.1.2 受试生物特性 1) 的要求。新接收的试验用松滋青皮豆，须挑选颗粒饱满、豆皮青绿或青棕色、大小一致、无病虫害、表面无明显缺损的豆种。同时，以 1 个空白水样和 2 个参比水样对其按试验分析步骤测定根尖微核，受试生物质量应满足 5.9 的要求。

表 5 受试生物质量要求主要指标

序号	指标	内容	来源	水和废水监测分析方法（第四版）
1	有丝分裂指数	所有进行镜检的根尖，每一根尖的细胞微核计数区有丝分裂指数应>20‰	ISO 29200-2013 中 7.3.2 要求	无要求
2	空白水样微核率	空白水样（阴性对照）微核率≤6.6‰	实验室间验证所得	≤10.0‰
3	参比水样微核率	参比水样（阳性对照， $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺溶液）微核率取值范围 15.8‰~30.8‰	实验室间验证所得	无要求
4	参比水样平行样	2 个平行测试的参比水样微核率介于 15.8‰~30.8‰	实验室间验证所得	无要求

1) 有丝分裂指数：在进行空白水样和参比水样根尖微核镜检时，每一根尖微核计数区的根尖细胞有丝分裂指数（处于有丝分裂期的细胞数占总细胞数的比率）>20‰（根尖细胞暴露于受试水样，形成微核的基础是细胞的有丝分裂，要求被观察的组织处于较为活跃的有丝分裂状态，其有丝分裂指数参见 ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》中 7.3.2，要求>20‰）。

2) 空白水样微核率：空白水样（实验用水）微核率≤6.6‰，取 6 家验证实验室对空白

水样微核率测定结果的 99%置信限上限（见表 6）。

表 6 6 家验证实验室对空白水样微核率测定结果 (单位:%)

组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	
1	3.0	7	4.0	13	2.3	19	4.8	25	5.7	31	3.0	
2	3.2	8	4.3	14	3.3	20	3.5	26	4.2	32	2.8	
3	4.7	9	1.3	15	3.2	21	3.5	27	2.0	33	4.8	
4	1.8	10	3.8	16	3.8	22	2.5	28	5.2	34	2.7	
5	2.5	11	2.8	17	2.8	23	6.3	29	4.2	35	4.0	
6	3.3	12	4.5	18	3.0	24	6.3	30	2.7	36	3.3	
							\bar{x}_i	3.6				
99%置信区间 (%)							0.6~6.6					

3) 参比水样微核率: 参比水样(环磷酰胺, $\rho=20.0$ mg/L)微核率取值范围 $23.3\% \pm 7.5\%$, 即 $15.8\% \sim 30.8\%$, 取 6 家验证实验室对参比水样微核率测定结果的 99%置信区间(见表 7)。

表 7 6 家验证实验室对 $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺微核率测定结果 (单位:%)

组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	
1	21.8	7	23.0	13	24.0	19	23.7	25	18.8	31	25.0	
2	22.7	8	23.5	14	27.7	20	23.2	26	22.0	32	22.7	
3	27.5	9	21.5	15	26.5	21	20.0	27	25.2	33	25.5	
4	23.3	10	19.7	16	28.5	22	25.8	28	27.0	34	22.0	
5	27.3	11	17.8	17	19.2	23	24.5	29	24.5	35	21.3	
6	20.5	12	20.8	18	26.0	24	17.2	30	25.5	36	25.0	
							\bar{x}_i	23.3				
99%置信区间 (%)							15.8~30.8					

5.4.1.4 受试器官

ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》方法以蚕豆次生根为受试器官, 主要适合于蚕豆根尖在均匀性较差的土壤介质中长期暴露, 适用于土壤致突变性物质的测定; 本标准针对水质致突变性测定, 水样的均匀性和测试的短时性更适于初生根为受试器官的测试体系, 因此沿用国内长期使用的接受度较高的《水和废水监测分析方法》(第四版)方法中采用的初生根作为受试器官。

5.4.1.5 受试生物保种

为解决保种问题, 2013 年编制组与蚕豆根尖微核试验敏感种松滋青皮豆筛选者——华中师范大学的陈光荣和金波老师签订协议, 将松滋青皮豆的保种权无偿转让给常州市环境监测中心, 并传授了豆种栽培及保存关键技术。

一般而言, 松滋青皮豆的保种应注意下列事项:

- 1) 松滋青皮豆在我国大部分地区均可引种繁殖, 根据当地气候条件合理安排种植时间;
- 2) 种植地应选择生态条件较好, 无工业“三废”、农药和放射性污染的场地;
- 3) 为保持品系纯正, 避免与其它品种杂交, 种植地周边 1 km 范围内不得混种其他蚕豆品种, 最好每年轮作种植;
- 4) 注意保持较宽行距, 避免植株生长过长、发生倒伏;
- 5) 种植期间不施用化肥农药, 以保持较低的本底微核率;
- 6) 成熟收获后, 豆种及时晒干, 装入牛皮纸袋或大信封内贮存, 于专用冰箱 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷藏, 保存期不超过 2 年;

7) 如保存年限过长等原因导致豆种出根率偏低时,可挑选经催根后生长情况良好的豆种栽培复壮。

2013年后,松滋青皮豆的保种传代由常州市环境监测中心负责,随后编制组在自然环境较好的溧阳大溪水库边建立了专门的保种场,其灌溉水和土壤质量分别符合《农田灌溉水质标准》(GB 5084—2005)(见表8)和《土壤环境质量标准》(GB 15618—1995)中的二级标准(见表9)。2014年收获豆种15 kg,经检定,蚕豆根尖本底微核率3.4‰,满足受试生物的质量要求;2015年和2016年分别收获豆种12 kg和25 kg左右。

表8 松滋青皮豆保种场灌溉水质测定结果 (单位:mg/L)

测试项目	测定结果	农灌水标准值	结果评价
pH值(无量纲)	7.35	5.5~8.5	符合
化学需氧量	42.3	200(旱作)	符合
总汞	$<4 \times 10^{-5}$	0.001	符合
镉	$<1 \times 10^{-3}$	0.01	符合
铬(六价)	$<4 \times 10^{-3}$	0.1	符合
铅	$<1.0 \times 10^{-2}$	0.2	符合
挥发酚	$<5.0 \times 10^{-3}$	1	符合
石油类	<0.01	10(旱作)	符合

表9 松滋青皮豆保种场土壤质量测定结果 (单位:mg/kg)

测试项目	测定结果	二级标准值	结果评价
pH值(无量纲)	6.58	自然背景	符合
镉	0.419	0.60	符合
汞	0.066	0.50	符合
砷	7.66	30(旱地)	符合
铜	19.9	100(农田)	符合
铅	30.5	300	符合
铬	43.1	200(旱地)	符合
锌	42.3	250	符合
镍	15.6	50	符合
α-六六六	$<5 \times 10^{-5}$		
β-六六六	$<5 \times 10^{-5}$		
γ-六六六	$<5 \times 10^{-5}$	0.50	符合
δ-六六六	$<5 \times 10^{-5}$		
p,p'-DDD	$<5 \times 10^{-5}$		
o,p'-DDT	$<6 \times 10^{-5}$		
p,p'-DDE	$<5 \times 10^{-5}$	0.50	符合
p,p'-DDT	$<5 \times 10^{-5}$		

5.4.2 试剂

标准文本中所有试剂配制方法,依据《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168—2010)规定,对《水和废水监测分析方法》(第四版)蚕豆根尖微核试验方法中的表述进行规范。

5.4.2.1 除非另有说明,分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂。

5.4.2.2 经实验验证,按照《水和废水监测分析方法》(第四版)中蚕豆根尖微核试验方法(B类方法)所列配制要求,下列试剂满足实验需求:

1) 无水乙醇-冰乙酸混合液(卡诺氏液): 3+1

将无水乙醇(C_2H_6O)和冰乙酸($C_2H_4O_2$)按3:1的体积比混合,临用现配。

2) 乙醇溶液: $\varphi(C_2H_6O) = 70\%$

量取无水乙醇（ C_2H_6O ）70 ml，用水定容至 100 ml。

3) 乙酸分散液： $\phi(C_2H_4O_2) = 45\%$

量取冰乙酸（ $C_2H_4O_2$ ）45 ml，用水定容至 100 ml，临用现配。

5.4.2.3 经实验验证，下列试剂与《水和废水监测分析方法》（第四版）中蚕豆根尖微核试验方法（以下简称“第四版方法”）中所列试剂相比，进行了调整改进：

1) 实验用水：

第四版方法中实验用水为自来水或蒸馏水，自来水中往往含有杂质或余氯，对实验有可能造成影响；为保证实验结果稳定可靠，实验用水调整为实验用水满足 GB/T 6682 中三级水要求的去离子水或蒸馏水，经验证，实验结果稳定，满足试验要求。

2) 盐酸溶液： $c(HCl) = 1.0 \text{ mol/L}$

孚尔根染色过程中，盐酸溶液分别应用于根尖水解、席夫氏（Schiff）试剂和 SO_2 漂洗液配制等步骤。经实验验证，在席夫氏（Schiff）试剂和 SO_2 漂洗液配制中，使用第四版方法中 $c(HCl) = 1.0 \text{ mol/L}$ 的盐酸溶液能满足实验要求。但在根尖水解过程中，第四版方法中根尖水解条件为使用 $c(HCl) = 5.0 \text{ mol/L}$ 盐酸溶液，28 °C 下水解，水解时间难于把控，且水解效果不佳。参照 ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》方法，且经后续实验验证，使用 $c(HCl) = 1.0 \text{ mol/L}$ 盐酸溶液，60 °C 下根尖水解效果更好（见表 16 和图 12）。因此，孚尔根染色过程中，根尖水解、席夫氏（Schiff）试剂和 SO_2 漂洗液配制等步骤所用盐酸溶液统一为 $c(HCl) = 1.0 \text{ mol/L}$ 盐酸溶液。

当受试水样 $pH > 8.5$ 时，需调节 pH，用 $c(HCl) = 1.0 \text{ mol/L}$ 盐酸溶液调节 pH 值（参照 ISO 11348-3 《Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-Part 3: Method using freeze-dried bacteria》中 5.4）。

配制方法为：量取 8.3 ml 浓盐酸，缓慢加入少量水中，搅拌混匀后用水定容至 100 ml。

3) 席夫氏（Schiff）试剂：

第四版方法中席夫氏（Schiff）试剂配制方法为：称取 0.5 g 碱性品红（ $C_{20}H_{19}N_3$ ）加入 100 ml 水中，煮沸后沸腾搅拌 5 min，待溶液冷却至 58 °C 时过滤至具塞棕色试剂瓶中，再冷却至 25 °C 时加入 $c(HCl) = 1.0 \text{ mol/L}$ 盐酸溶液 10 ml 和 1.0 g 偏重亚硫酸钠（ $Na_2S_2O_5$ ）或偏重亚硫酸钾（ $K_2S_2O_5$ ），充分振荡并塞紧瓶塞，避光静置 24 h 后，如溶液呈无色透明即可使用。

查阅文献，分别采用了 2 种冷配法（Kodousek 法、陈啸梅法）和 2 种热配法（第四版方法、传统配制法）配制席夫氏（Schiff）试剂。根据实验验证，其中 Kodousek 法染色效果最好（见图 4），因此本标准中采用该方法。

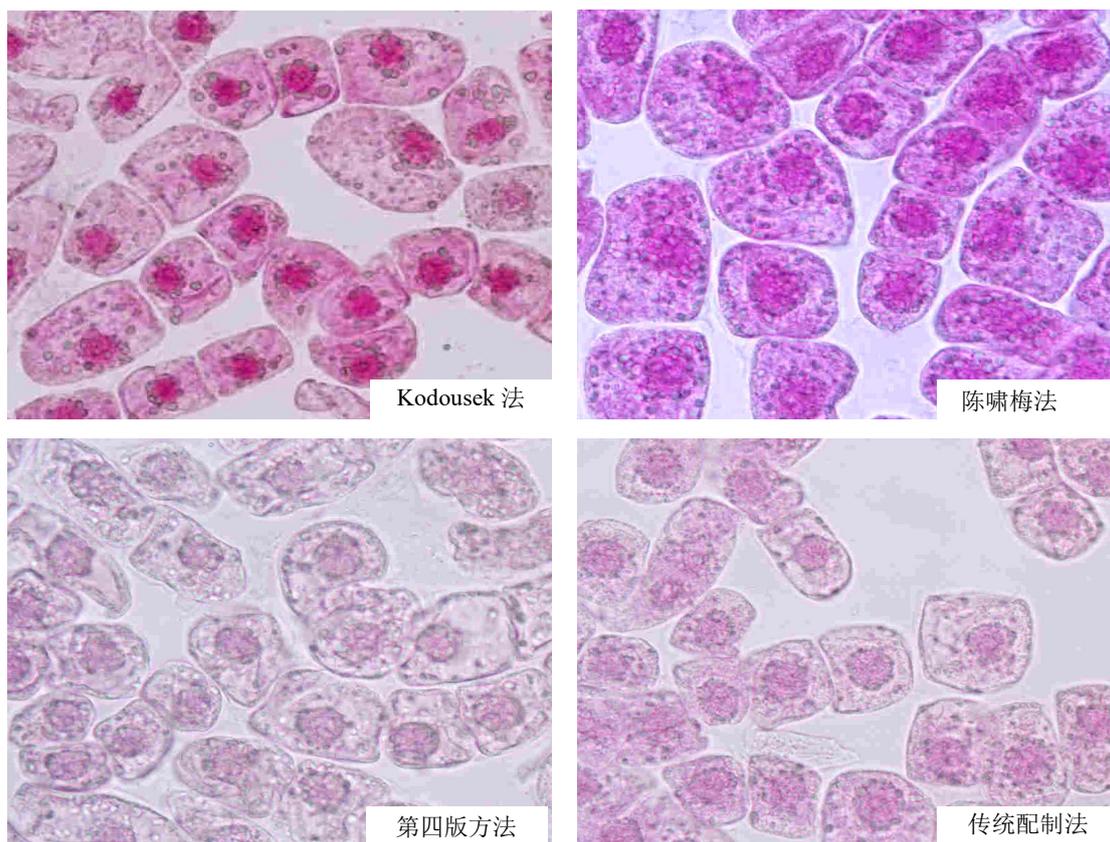


图 4 不同席夫氏 (Schiff) 试剂配制方法染色效果 (放大 400 倍)

席夫氏 (Schiff) 试剂配制方法调整为: 量取 5.0 ml 无水乙醇 (C_2H_6O) 加入 100 ml 烧瓶, 再称取 0.5 g 碱性品红 ($C_{20}H_{19}N_3$) 加入烧瓶中, 振荡溶解 10 min。称取 2.5 g 偏重亚硫酸钠 ($Na_2S_2O_5$) 或偏重亚硫酸钾 ($K_2S_2O_5$) 溶于 93 ml 水中, 溶液加入前述烧瓶摇匀混合, 继续加入 1.5 ml 浓盐酸, 避光振荡至完全溶解, 溶液呈浅黄色。加入 0.2 g 活性炭, 振荡 3 min, 过滤使之无色即可使用。

席夫氏 (Schiff) 试剂在 4 °C 避光条件下保存期 6 个月, 如溶液呈粉红色或出现沉淀, 则不可再用。席夫氏 (Schiff) 试剂也可使用市售的成品试剂, 市售的试剂往往质量更稳定, 染色效果更好 (本标准制定过程中分别使用了北京雷根生物技术有限公司、南京森贝伽生物科技有限公司、德国默克 (MERCK) 公司的席夫氏 (Schiff) 成品试剂效果均较好, 其中德国默克 (MERCK) 公司的席夫氏成品试剂染色效果最佳)。

4) SO_2 漂洗液: $\omega (Na_2S_2O_5 \text{ 或 } K_2S_2O_5) = 0.5\%$

第四版方法中 SO_2 漂洗液配制方法可用, 但配制过程中分为贮存液和使用液, 同时贮存液并未标明保存条件和期限。由于偏重亚硫酸钠 (或偏重亚硫酸钾) 稳定性不佳, 溶液不宜久存, 因此不建议配制贮存液。

调整配制方法为: 称取 10.0 g 偏重亚硫酸钠 ($Na_2S_2O_5$) 或偏重亚硫酸钾 ($K_2S_2O_5$) 溶于水中, 定容至 100 ml, 得到 $\omega (Na_2S_2O_5 \text{ 或 } K_2S_2O_5) = 10\%$ 偏重亚硫酸钠或偏重亚硫酸钾溶液。分别吸取该溶液和 $c (HCl) = 1.0 \text{ mol/L}$ 的盐酸溶液各 5.0 ml 混合后, 用水定容至 100 ml, 临用现配。

5.4.2.4 增加下述试剂:

氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH}) = 1.0 \text{ mol/L}$

当受试水样 $\text{pH} < 5.5$ 时，需调节 pH ，用 $c(\text{NaOH}) = 1.0 \text{ mol/L}$ 氢氧化钠溶液调节（参照 ISO 11348-3 《Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—Part 3: Method using freeze-dried bacteria》中 5.3）。

配制方法为：称取 4.0 g 氢氧化钠，加入少量水中，搅拌溶解后用水定容至 100 ml。

5.4.3 参比物质

5.4.3.1 参比物质的选取

参比物质是指在测试中为验证方法敏感性的已知物质。参比物质作为阳性对照物，是生态毒理试验有效性控制必不可少的重要保证，因此，本标准明确增加相关内容。

通过查阅文献资料，同时考虑到所选用的参比物质应性质稳定、廉价易得、且皮肤接触毒性较小等因素，初步确定参比物质从有关标准及文献中选用较多的重铬酸钾^[18-21]、甲胺磷^[21,22]、环磷酰胺^[20,21,23-30]（有关微核试验的 ISO 标准 21427-1-2006 和 21427-2-2006 中选用）筛选。由于 ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test（土壤质量 高等植物遗传毒性效应评估 蚕豆微核试验）》标准发布时间为 2013 年末，本标准验证时间为 2012 年 9 月~10 月，因此备选的参比物质中未选取上述标准中的马来酰肼。实际上，上述备选的参比物质已有较好的代表性。

经过比对试验发现，重铬酸钾在高浓度时容易引发急性毒性抑制效应，致蚕豆根死亡；甲胺磷在低浓度区间的毒物敏感性略差，且甲胺磷毒性较强，作为农药已禁用，其纯物质在市场上难以采购；环磷酰胺的剂量-效应关系最好，且是广泛应用的抗癌药物，人体接触有一定安全性，因此最终确定环磷酰胺为参比物质（见表 10 和图 5）。

表 10 3 种毒物不同浓度处理下的蚕豆根尖微核率 (单位:%)

处理浓度 (mg/L)	重铬酸钾	甲胺磷	环磷酰胺
空白水样 (去离子水)	4.2	4.2	3.2
0.1	5.3	4.3	6.2
0.5	8.0	5.2	7.5
1.0	9.7	6.2	8.3
5.0	12.0	13.3	12.8
10.0	15.3	16.2	17.2
50.0	13.2	24.7	29.5
100	7.5	30.3	27.5
200	8.2	27.0	28.8

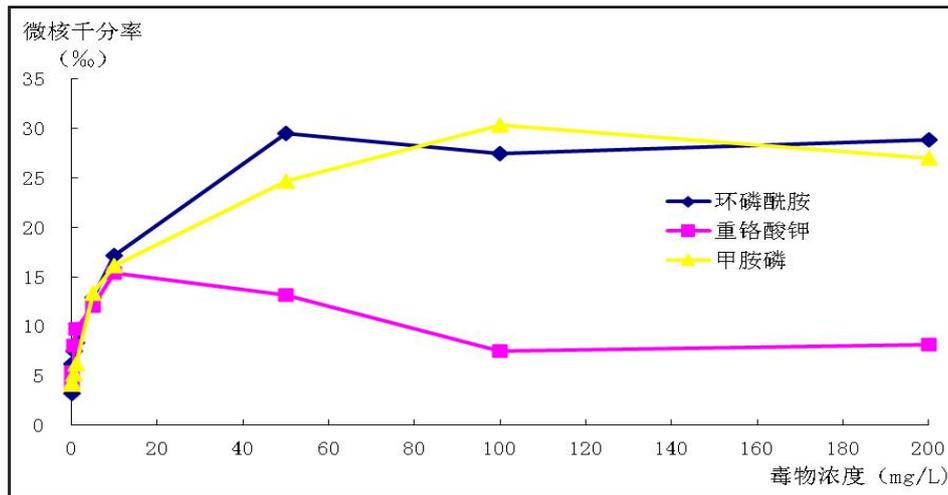


图 5 3 种毒物的剂量反应曲线

5.4.3.2 参比溶液浓度选取

根据文献研究表明，环磷酰胺处理后蚕豆根尖细胞分裂指数降低，且其抑制强度表现为处理浓度和作用时间的双重依赖，低浓度组抑制较弱，浓度增高或作用时间延长对分裂的抑制作用增强^[28]。由图 5 可见，环磷酰胺浓度大于 50.0 mg/L 后，剂量反应关系曲线趋于平缓，表明此时蚕豆根尖细胞有丝分裂抑制作用已成为主导因素，因此参比物质浓度取值（阳性对照）不宜选取大于 50.0 mg/L 的浓度，而适宜在小于 50.0 mg/L 浓度范围内选取。

在环磷酰胺浓度 0~50.0 mg/L 范围区间，进一步进行剂量反应关系试验，根据实验结果（见表 11 和图 6），环磷酰胺浓度处于 10.0 mg/L~50.0 mg/L 浓度区间时，线性方程的 r 值较高，线性相关性较好且斜率较低，曲线趋于平缓（见表 12），考虑参比物质的浓度取值（阳性对照）在 10.0 mg/L~50.0 mg/L 浓度区间内选取较为合适，同时环磷酰胺浓度应尽可能低。而 10.0 mg/L 浓度处为剂量反应曲线的拐点，此浓度点对应的微核率变异较大，不适于选为参比物质的浓度取值，因此选取 10.0 mg/L~50.0 mg/L 范围内低浓度段的整数点浓度 20.0 mg/L 作为参比物质阳性对照浓度取值。

由表 12 可见，当环磷酰胺浓度达到 20.0 mg/L 时，蚕豆根尖微核数量增加已相当明显，微核率达到 50.0 mg/L 浓度微核率峰值的 73.5%，因此选择环磷酰胺浓度 20.0 mg/L 作为参比浓度较为理想。

ISO 21427-1-2006 《Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae》标准中，同样选取 $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺溶液作为参比溶液对两栖类幼体进行微核测定。

表 11 0~50.0 mg/L 环磷酰胺浓度处理下的蚕豆根尖微核率 (单位:%)

处理浓度 (mg/L)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
空白水样 (去离子水)	4.0	1.2	30.2
1.0	8.7	2.0	22.8
2.0	10.2	1.9	18.1
5.0	12.3	1.9	15.2
10.0	17.3	2.1	12.1
20.0	22.2	2.6	11.9
30.0	25.2	2.9	11.6
40.0	27.0	2.8	10.2
50.0	30.2	2.9	9.7

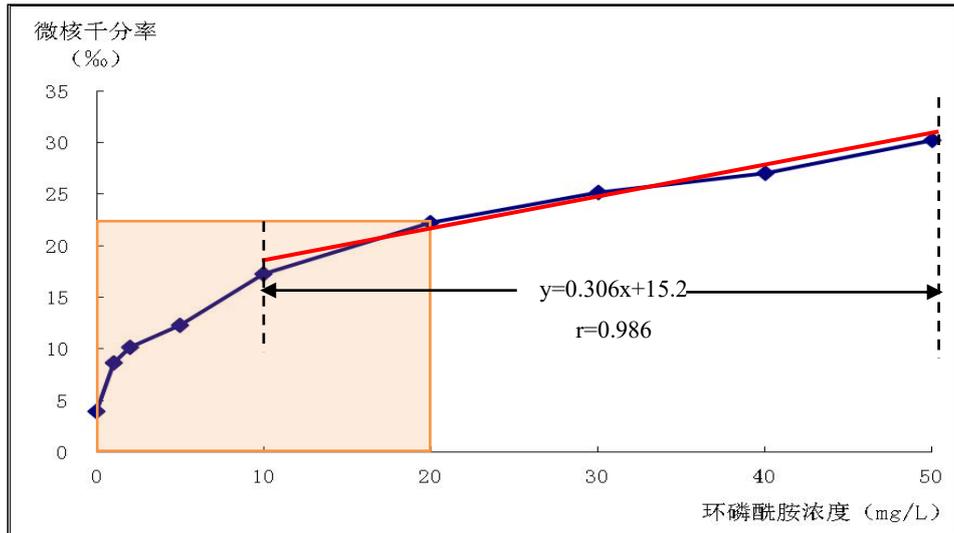


图 6 环磷酰胺阳性对照浓度取值选取

表 12 0~50.0 mg/L 环磷酰胺浓度范围内的蚕豆根尖微核率线性曲线参数

浓度点取值范围 (mg/L)	线性方程	线性斜率	r 值
0~50.0	$y=0.470x+9.2$	0.470	0.951
5.0~50.0	$y=0.367x+12.9$	0.367	0.969
10.0~50.0	$y=0.306x+15.2$	0.289	0.986
20.0~50.0	$y=0.258x+17.1$	0.258	0.995

5.4.3.3 参比溶液的配制

环磷酰胺 ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$)，生物试剂 (BR)，纯度 $\geq 99.0\%$ 。称取 0.106 g 环磷酰胺，加入少量水中，搅拌溶解后用水定容至 100 ml，得到环磷酰胺溶液 $\rho(C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P) = 1.00$ g/L。吸取该溶液 20.0 ml，用水定容至 1 000 ml，得到环磷酰胺参比溶液 $\rho(C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P) = 20.0$ mg/L，临用现配（环磷酰胺水溶液不稳定，溶解后应在短期内使用）。

5.5 仪器和设备

配制参比溶液及受试水样稀释时使用符合国家标准的 A 级玻璃量器，其他均使用符合国家标准的 B 级玻璃量器。

1) 冷藏采样箱：0 °C ~ 5 °C。

2) 生物显微镜：物镜 10×、20×、40×倍，目镜 10×或 15×倍。安装在无腐蚀性气体、无振动的实验室内，使用时环境温度 5 °C ~ 30 °C、相对湿度 45% ~ 85%（执行《生物显微镜》(GB 2985—2008) 对试验环境条件的要求)。

3) 恒温培养箱：25 °C \pm 1 °C。

4) 冰箱：0 °C ~ 4 °C。

5) 电子天平：精度 0.000 1 g。

6) 根尖处理皿：直径 $d=12$ cm、高度 $h=3$ cm、容积大于 300 ml，可自制（见图 7）。

7) 恒温水浴锅：20 °C ~ 100 °C。

- 8) 电热板。
- 9) 容量瓶：1 000 ml、100 ml。
- 10) 移液管：20 ml、5 ml。
- 11) 量筒或量杯：100 ml、10 ml。
- 12) 采样瓶、试剂瓶、烧杯、具盖指管、载玻片、盖玻片等实验室常用玻璃器皿。
- 13) 带盖搪瓷盘、医用纱布、镊子、手术刀、定性滤纸、计数器等实验室常用设备。

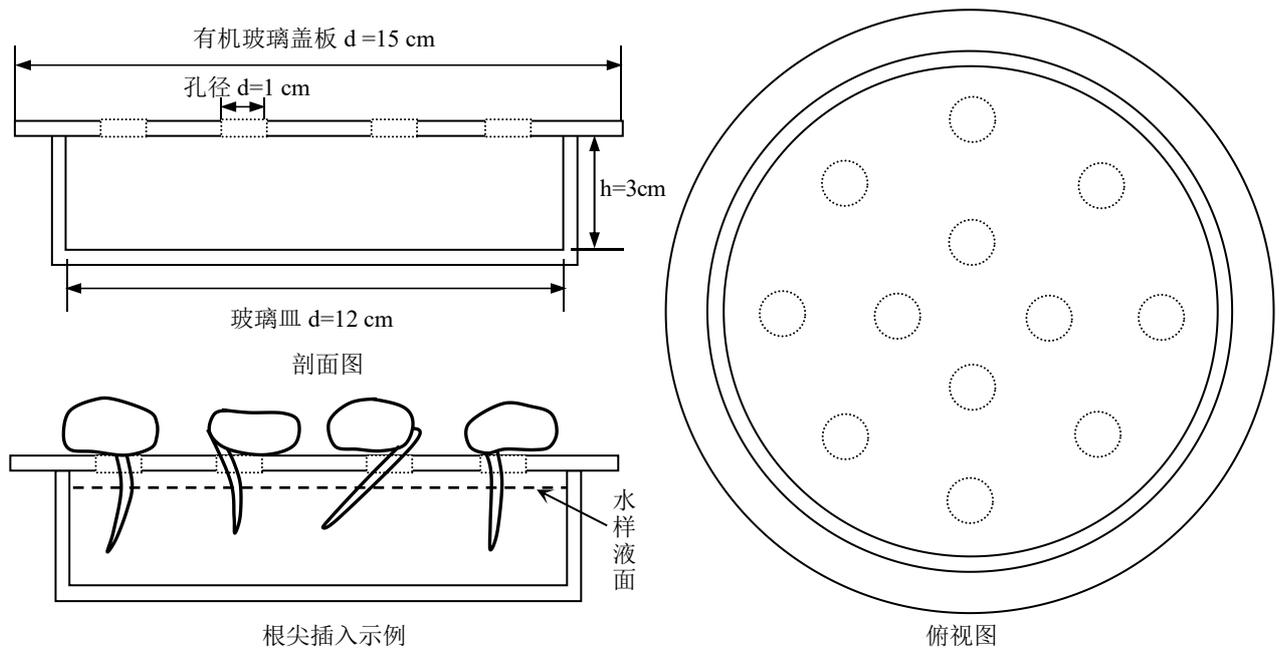


图 7 根尖处理皿示意图

5.6 样品

5.6.1 样品采集与保存

根据试验需求，使用 1 000 ml 及以上容量的棕色玻璃瓶（或聚丙烯、聚四氟乙烯、聚乙烯材质的容器）按照 HJ/T 91 或 HJ/T 164 的要求采集水样，水样沿瓶壁缓慢转入采样瓶中，水样与瓶塞之间不留空隙，满瓶密封。为保证尽快开展水样测试，采样时间应尽量安排在催根步骤的末期。水样采集后，立即于 0℃~5℃ 避光运输和保存，并尽快进行试验测定，保存时间最长不超过 48 h。水样若需长期保存，则上述水样采集后应尽快送回实验室低于 -18℃ 保存，保存前将水样按每 1 000 ml 容器盛装 500 ml~700 ml 水样的量分装，保存期不超过 2 个月（参照 ISO 5667-16-2017《Water quality—Sampling—Part 16: Guidance on biotesting of samples》中 7.2 第三段“Freeze down water samples to $\leq -18^\circ\text{C}$ as soon as possible after sampling if it is not possible to start performance of the test within 48 h. The time required for freezing and thawing should be minimized by reducing the sample volume, i.e. the size of the sample container. In general, it is appropriate to use one-litre containers for freezing (filled with max. 0.5 l to 0.7 l of sample). For tests requiring larger volumes, the

sample should be homogenized and split into sub-samples”)。

5.6.2 样品预处理

1) 温度调节

低于-18℃保存的水样，需先在不超25℃水浴轻微振荡解冻，或在2℃~8℃冷藏过夜解冻（参照ISO 5667-16-2017《Water quality—Sampling—Part 16: Guidance on biotesting of samples》）。受试水样在试验开始前，先加入根尖处理皿内，放置于恒温培养箱中，25℃±1℃恒温避光平衡2h后用于试验。

2) pH 调节

按照GB/T 6920方法测定并记录受试水样pH。当pH<5.5或>8.5时，用c(NaOH)=1.0 mol/L氢氧化钠溶液或c(HCl)=1.0 mol/L盐酸溶液调节pH至5.5~8.5，测定并记录调节后的受试水样pH。对调节前、后的受试水样同时开展试验（参照ISO 11348-3-2007《Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria》中7.2对pH调节前、后水样均需测定的要求，开展相应的蚕豆根尖微核测定，从而了解水样消除pH影响前后的致突变性差异。水样pH调节的条件及范围的确定，以《农田灌溉水质标准》（GB 5084—2005）中对农作物灌溉用水pH在5.5~8.5的要求为依据）。

5.7 分析步骤

5.7.1 实验用水准备

用于浸种、催根、根尖恢复培养的实验用水，需提前放置于恒温培养箱中25℃±1℃平衡2h，以确保豆种在浸种、催根、根尖恢复培养时的氧含量和水温处于适宜的环境条件。

5.7.2 浸种

按每一受试水样150粒左右的量取松滋青皮豆若干（确保催根后每一受试水样能够获得初生根根长达到1.5 cm~2.0 cm的豆种36粒），用去离子水或蒸馏水洗净。根据试验要求需确保每个处理浓度组最终从3个平行×（10~12）个根尖中选取6个染色情况较好的根尖用于镜检，染色效果不佳、不便于镜检观察的根尖需剔除。参考受试生物的特性，考虑出根率一般≥90%；催根结束后，根长1.5 cm~2.0 cm发育良好、粗细一致的根尖一般≥25%的实际情况，估算每一受试水样最初浸种量为130粒~160粒。

按每个烧杯中不超过300粒左右的量放入1000 ml玻璃烧杯，并加入700 ml实验用水，于恒温培养箱中25℃±1℃避光浸泡26 h~30 h至豆种充分吸胀，浸种期间换水2次，浸种水如出现浑浊，需增加换水次数。浸种时间一般为27 h，分别在18 h和24 h换水。

浸种时间长短对后续催根效果有影响，浸种时间过短则豆种吸水不充分，催根时间随之延长且出根率较低；浸种时间过长则豆种浸泡过度，耗时过长且催根时出根率降低。系列条件试验表明，25℃±1℃下浸种时间控制在24 h~48 h效果较好，此时豆种已充分吸胀，浸种催根的总耗时短且出根率高（见表13），印证了《水和废水监测分析方法（第四版）》中26 h~30 h浸种时间是合理可行的。考虑到方便安排试验周期的因素，本标准推荐的浸种时间为27 h，分别在18 h和24 h换水，以防止豆种分泌物增多出现水质浑浊。

表 13 浸种时间与催根效果的关联性

浸种时间 (h)	催根时间 (h)	浸种及催根总时间 (h)	平均出根率 (%)	效果评价
6	96~108	102~114	89.6	出根率低, 浸种催根总耗时较长
12	84~96	96~108	93.0	出根率较低, 浸种催根总耗时较长
18	72~80	90~98	94.4	出根率较低, 浸种催根总耗时较短
24	62~66	86~90	97.4	出根率高, 浸种催根总耗时最短
30	62~66	92~96	96.6	出根率高, 浸种催根总耗时较短
36	62~66	98~102	96.8	
42	62~66	104~108	97.0	出根率高, 浸种催根总耗时较长
48	62~66	110~114	96.8	
60	62~66	122~126	94.4	出根率较低, 浸种催根总耗时长
72	62~66	134~138	88.6	
96	62~66	158~162	88.0	出根率低, 浸种催根总耗时长
120	62~66	182~186	81.2	

5.7.3 催根

将裁剪的医用纱布用去离子水或蒸馏水浸洗 3 次后拧干（比对试验结果表明，纱布未经浸洗对空白水样的微核率会产生影响（见表 14）。为避免由于纱布是否浸洗所造成的差异，保证试验结果可靠性，用于催根的医用纱布应用去离子水或蒸馏水浸洗 3 次）。

表 14 医用纱布是否浸洗的空白水样微核率比较 (单位:%)

实验组	平行样数 (个)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
纱布浸洗组	9	3.6	1.0	28.7
纱布未浸洗组	9	4.3	0.9	20.9

纱布叠 4 层垫入洗净的搪瓷盘内，加少量实验用水至纱布充分润湿，倾斜搪瓷盘，在最低处仅见少量溢水为宜（见图 8，催根期间湿度的控制对出根同步性有较大影响，浸种湿度过大时，出根缓慢）。



图 8 催根时下垫纱布浸润程度展示图

浸种后的豆种用实验用水漂洗，均匀排布于搪瓷盘内，覆盖 2 层充分润湿的纱布，纱布含水量以悬挂时刚好无水下滴为宜。盖上搪瓷盘盖，于恒温培养箱中 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光催根 62 h~66 h（系列条件试验表明，62 h~66 h 催根总时间最佳，见表 13）。催根期间，每日检查 2 次，注意及时补水保持纱布刚被充分润湿的状态，随时去除不出根、霉变、根尖枯死、根尖形态或颜色异常的豆种，如下垫纱布出现粘性分泌物，及时清洗更换。催根

结束后,挑选初生根长 1.5 cm~2.0 cm 且生长发育良好的豆种(见 5.4.1.2 受试生物特性 4)) 用于后续试验。

《水和废水监测分析方法(第四版)》中催根步骤分为两步:先催根 12 h~30 h 选取初生根露出 2.0 mm~3.0 mm 发根良好的种子,再继续催根 36 h~48 h 至大部分初生根长至 2.0 cm~3.0 cm。其目的是在 12 h~30 h 期间选取活性强、生长发育良好的豆种,但由于时间跨度较长,需反复选取,操作繁琐。实际上,选取活性强、生长发育良好的豆种,可以考虑合并上述过程为一个步骤,通过在整个催根过程中挑选并去除死亡及活性差的豆种来实现,同时又优选了初生根长 1.5 cm~2.0 cm 且生长发育及出根同步性良好的豆种用于试验。本标准通过实验室间的验证比对,证实将步骤合并后催根效果良好,且更便于试验操作。

5.7.4 根尖处理

每个受试水样设 3 个平行,按 5.6.2 1) 步骤进行温度平衡并充分混匀后,加满至 3 个根尖处理皿中,与盖板间略留空隙。各平行取 10~12 粒豆种,将根尖插入盛满受试水样的根尖处理皿中,确保根尖没入受试水样至少 1.0 cm(见图 9)。

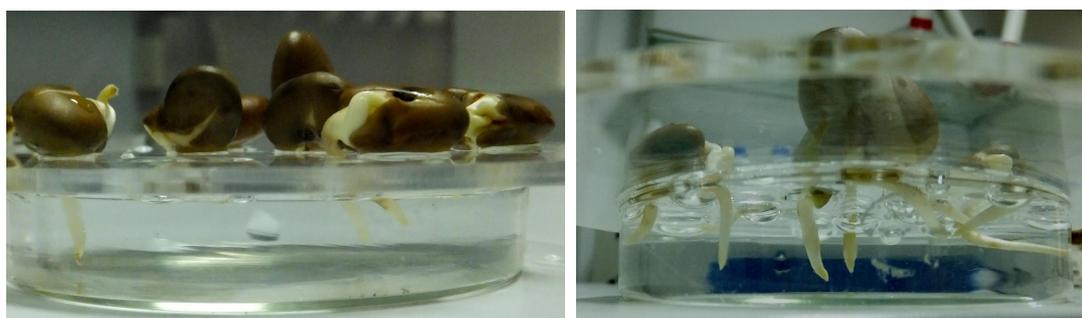


图 9 根尖处理图示

于恒温培养箱中 25 °C±1 °C 避光处理 6 h(《水和废水监测分析方法 第四版》中“蚕豆根尖微核试验”的根尖处理时间规定为 4 h~6 h,6 h 的处理时长已为 4 h 的 1.5 倍,对结果之间的可比性影响较大,因此这一设置过宽。蚕豆根尖细胞 23 °C 时有丝分裂周期为 18 h 左右^[30],6 h 的暴露时间已可使蚕豆根尖有丝分裂细胞对受试水样有足够的反应,表 15 和图 10 的验证试验结果表明,ρ=20.0 mg/L 的环磷酰胺参比水样和典型实际化工受试水样暴露 6 h 后微核率已处于微核率曲线增加的“平台期”,分别达到最大微核率的 79.2% 和 70.3%,因此本标准将受试水样处理根尖的作用时间界定为 6 h 是适合的)。

表 15 典型参比水样和实际受试水样不同处理时间下的蚕豆根尖微核率 (单位:‰)

处理时间 (h)	ρ=20.0 mg/L 环磷酰胺			常州吉恩化工城市管网接入口污水		
	\bar{x}_i	S _i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S _i	RSD _i (%)
空白	4.8	1.5	31.5	3.5	1.1	31.2
1 h	8.8	2.1	24.1	5.0	1.5	29.1
2 h	11.5	2.3	19.6	6.2	1.1	17.2
3 h	19.2	2.9	15.1	8.0	1.5	19.1
4 h	22.5	4.5	19.9	7.5	1.9	25.2
5 h	23.0	2.7	11.9	8.7	1.3	14.6
6 h	24.7	4.4	18.0	9.0	1.8	20.4

8 h	25.2	3.5	13.8	9.2	1.6	17.3
10 h	23.2	4.7	20.4	10.7	1.8	16.3
12 h	26.8	3.6	13.5	10.8	1.5	13.9
16 h	31.2	3.5	11.3	11.7	1.5	12.5
20 h	29.2	4.5	15.5	12.3	2.0	15.9
24 h	29.3	4.1	13.9	12.8	1.7	13.3

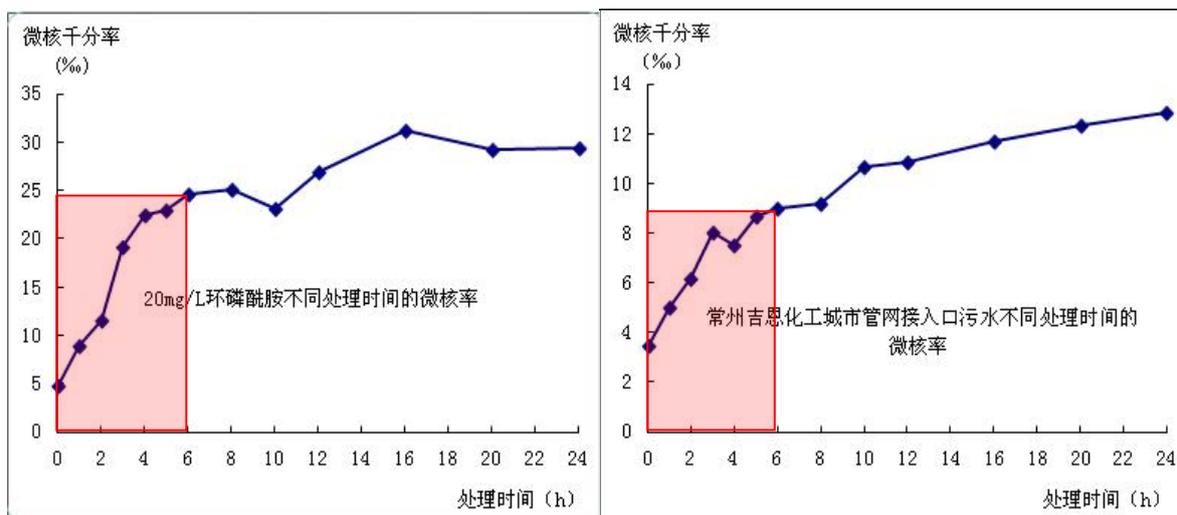


图 10 典型毒物和实样不同处理时间下的效应曲线

处理后的根尖，用去离子水或蒸馏水浸洗 3 次，每次 5 min。洗净后的豆种按 5.7.3 的温度及保湿条件恢复培养 24 h。

如果测定过程中，根出现 5.7.5 中描述的急性毒性受害症状，则受试水样按 5.7.5 规定进行急性毒性预试验后，重新进入本步骤；否则，试验豆种直接进入 5.7.6 步骤。

5.7.5 受试水样急性毒性预试验

将受试水样按 10 倍稀释的方法（急性毒性测定时，通常采用 10 倍稀释因子初选适宜的浓度范围，采用不超过 2 倍稀释因子进行正式的毒性试验。参照 ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》和 ISO 21427-1-2006 《Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae》中对测试浓度稀释倍数不超过 2 的要求，同时确保正式试验的浓度样品中至少有一组无急性毒性）制备成至少 5 个逐级稀释浓度的样品（含原液），保证至少有一个稀释浓度样品中所有根尖均不出现死亡、干枯、形态或颜色异常等急性毒性受害症状（见图 11）。



正常蚕豆根尖



图 11 正常根尖与急性毒性受害症状根尖图示

每一稀释浓度样品取 5 粒催根后的豆种，按 5.7.4 步骤对根尖进行处理，并判断根有无急性毒性受害症状，找出根有急性毒性受害症状的最低浓度 x ，被测样品按 $x/2.5$ 、 $x/5$ 、 $x/10$ 等 3 个稀释浓度正式进入 5.7.4 步骤。3 个稀释浓度被测样品中，无急性毒性样品对应的豆种进入 5.7.6 步骤。

根尖处理前，对于存在急性毒性可能性较大的受试水样，可直接进行急性毒性预试验。如受试水样无急性毒性，则受试水样以原液的浓度进入 5.7.4 步骤。

5.7.6 根尖固定

将上述处理后的根尖，切取顶端 1.0 cm 左右，每一根尖处理皿中的根尖对应放入一个具盖指管（称为“根尖指管”）内，加卡诺氏液（能完好保持根尖细胞的形态，增强孚尔根染色效果）固定 2 h，最长不超过 24 h（卡诺氏液中含有冰醋酸，固定时间过长会产生水解效应，影响后续孚尔根染色）。固定后的根尖如不及时染色制片，则弃去卡诺氏液，用去离子水或蒸馏水洗净根尖，加入 φ (C_2H_6O) = 70% 乙醇溶液浸没，于 4 °C 冰箱内保存备用，尽快染色镜检。

5.7.7 孚尔根染色

固定后的根尖，用去离子水或蒸馏水浸洗 2 次，每次 5 min。将 c (HCl) = 1.0 mol/L 盐酸溶液在 60 °C 水浴平衡后，快速加入根尖指管内至根尖浸没并加盖，将根尖指管放入 60 °C 水浴锅中水解根尖 10 min，水解时间视根尖软化程度可适度增减，至根尖软化呈白色略带透明为宜（镊子轻捏，根尖不破、较软但有弹性），快速弃除盐酸溶液。

孚尔根染色过程中水解步骤是关键，染色过程主要是碱性品红与醛基发生作用呈紫红色。核酸的水解有两个过程，第一过程是嘌呤碱很快被除掉，脱氧核糖中的醛基暴露出来；第二过程是组蛋白和核酸越来越多地被除掉，醛基随之脱落。在短时间的的水解作用后，第一个过程占优势，这时候染色效果最佳，随着水解作用的持续进行，第二个过程逐渐变成优势，染色效果减弱甚至细胞核分解。

《水和废水监测分析方法》（第四版）中“蚕豆根尖微核试验”的孚尔根染色条件规定“用 5.0 mol/L HCl 水解液 28 °C 水解幼根 25 min 左右”。经试验验证在此条件下水解过度，容易造成根尖细胞核破裂且染色效果不佳，此条件下将水解时间控制在 6 min 左右的染色效果最佳。但此水解时间很难掌控，稍有不慎即会造成染色失败。经查阅文献资料和多次比对实验，编制组将孚尔根染色中的水解条件变更为经典条件，即用 c (HCl) = 1.0 mol/L 水解液 60 °C 水解根尖，最佳水解时间经系列试验后确定为 10 min，在 6 min ~ 17 min 之间染色效果尚可（见表 16 和图 12），与 ISO 29200-2013《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》中的水解条件一致。值得注意的是，空白水样处理的根尖需要的水解时间较短；而毒性物质处理后的根尖通常会变得较硬，需

要的水解时间相对较长，因此根尖水解时间根据实际情况视根尖软化程度可适度增减。

表 16 $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺处理后的蚕豆根尖不同水解条件下的孚尔根染色效果

处理时间 (min)	5.0 mol/L HCl 水解液 28 °C 水解	1.0 mol/L HCl 水解液 60 °C 水解
3	水解时间过短，染色浅	水解时间过短，未染色
4	水解时间过短，染色浅	水解时间过短，未染色
5	水解时间过短，染色浅	水解时间过短，染色浅
6	水解时间最佳，染色好	水解时间偏短，染色尚可
7	水解时间过长，染色浅	水解时间偏短，染色尚可
8	水解时间过长，染色浅	水解时间偏短，染色尚可
9	水解时间过长，染色浅，细胞破裂	水解时间偏短，染色尚可
10	水解时间过长，染色浅，细胞破裂	水解时间最佳，染色好
12	水解时间过长，染色浅，细胞破裂	水解时间偏长，染色尚可
15	水解时间过长，未染色，细胞破裂	水解时间偏长，染色尚可
17	/	水解时间偏长，染色尚可
20	/	水解时间过长，染色浅
25	/	水解时间过长，染色浅
30	/	水解时间过长，染色浅，细胞破裂

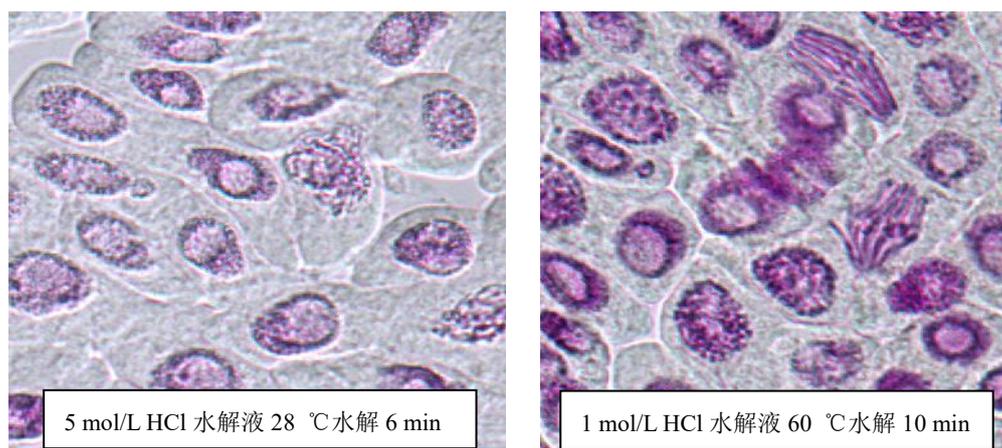


图 12 不同水解条件下的蚕豆根尖细胞最佳染色效果（放大 400 倍）

水解后的根尖，立即用去离子水或蒸馏水浸洗 2 次，每次 5 min。将席夫氏试剂加入根尖指管至根尖浸没，在暗室或避光条件下染色 1 h~2 h（染色时间在 1 h~6 h 内染色效果均可接受，染色时间过短则染色偏浅，染色时间过长则由于染色液本身也呈酸性，可能造成持续弱水解效应，减弱染色效果甚至使细胞破裂）。除去染液，用 SO₂ 漂洗液浸洗根尖 2 次，每次 5 min；再用去离子水或蒸馏水浸洗根尖 2 次，每次 5 min。将根尖浸泡于新换入的去离子水或蒸馏水中，0 °C~4 °C 冰箱内保存，尽快制片镜检。

5.7.8 制片

选取染色效果良好的根尖制片，用镊子轻取根尖，在滤纸上吸净表面水分后，置于载玻片上，用手术刀截取第二个 1.0 mm 左右顶部根尖（《水和废水监测分析方法》（第四版）中“蚕豆根尖微核试验”制片时“截取 1.0 mm 左右根尖”，但实际镜检时发现根尖最前端 1.0 mm 部分根冠特化细胞较密集，不是最佳微核观测计数区；参照 ISO 29200-2013《Soil

quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》取第二个 1.0 mm 左右顶部根尖，此区域是原分生组织经暴露恢复培养后形成的初生分生组织区域，最适合微核观测，见图 13）。吸取 1 滴 $\rho(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2)=45\%$ 乙酸分散液浸没根尖，用手术刀将根尖充分捣碎，加盖玻片（避免产生气泡），盖玻片上叠放滤纸，轻轻敲打分散根尖组织，拇指按压制成薄片，使根尖细胞成单层分散状。

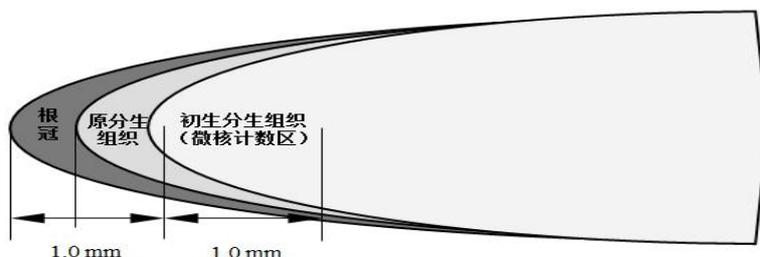


图 13 根尖细胞微核计数区示意图

5.7.9 镜检

将制备好的压片置于生物显微镜下，低倍镜下找到根尖细胞接近方形或椭圆形、分布均匀、不重叠的区域，转入高倍镜下观察计数。每一根尖指管中至少观察 2 个根尖，各根尖指管中观察的根尖数量应相同，每个根尖观察 1 000 个细胞并统计处于有丝分裂期的细胞数及微核数量。

5.7.10 有丝分裂细胞及微核判定

有丝分裂细胞的周期包括分裂间期和有丝分裂期两个阶段，其中有丝分裂期可分为前期、中期、后期、末期，其细胞识别参见图 14。

微核判定参考图 15，其主要特征为：

- 1) 大小为主核的 1/3 以下，且与主核分离或相切；
- 2) 着色反应和折光性与主核一致，内部有明显的染色质颗粒，色泽比主核稍浅或相当；
- 3) 形态圆形、椭圆形或不规则。

5.7.11 对照试验

每批受试水样测试时，以实验用水为空白水样，以参比溶液为参比水样，按 5.6.2 样品预处理 1) 温度调节及上述实验步骤 5.7.1~5.7.10 分别进行阴性对照和阳性对照试验，同时参比水样进行平行测试。

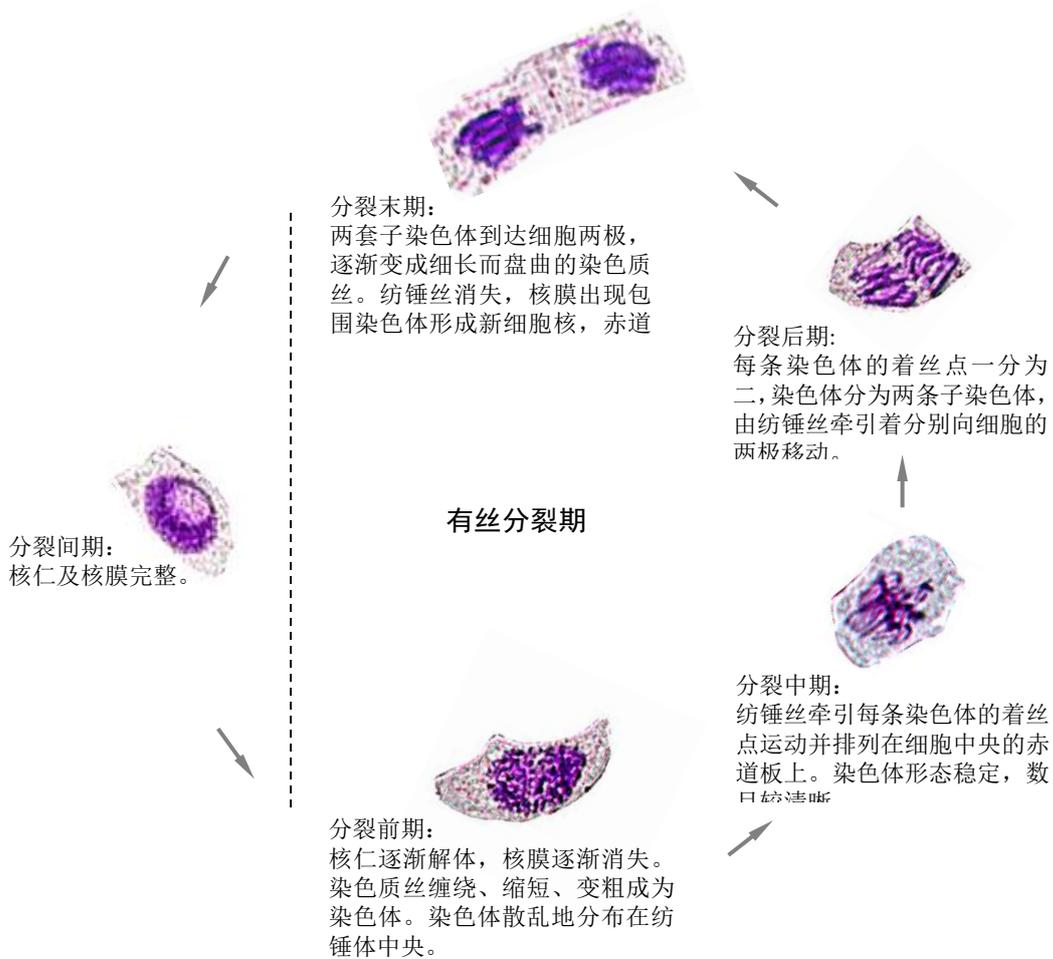
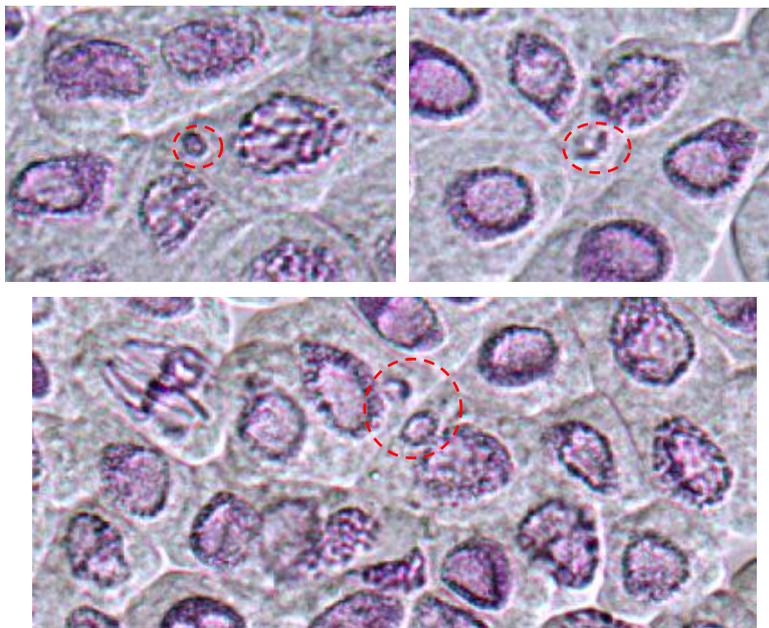
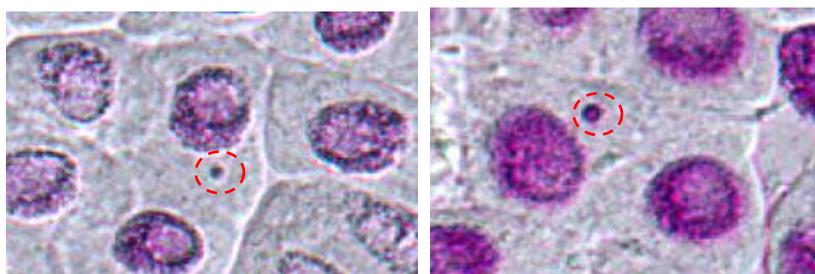


图 14 有丝分裂细胞参考图



典型微核照片



典型伪微核照片

图 15 微核判定参考图（放大 400 倍）

5.8 结果计算与表示

5.8.1 结果计算

每 3 个平行的根尖指管所对应的 1 个被测样品，共统计至少 6 个根尖。

每一根尖有丝分裂指数按公式（1）计算：

$$I = \frac{M}{1000} \times 1000\% \quad (1)$$

式中：I——单个根尖有丝分裂指数，‰；

M——观察 1 000 个细胞中所有处于有丝分裂期（有丝分裂前期、中期、后期、末期）的细胞数，个；

被测样品微核率按公式（2）计算：

$$MCN = \frac{\sum_{i=1}^n R_i}{n \times 1000} \times 1000\% \quad (2)$$

式中：MCN——被测样品的微核率（保留一位小数），‰；

R_i ——被测样品第 i 个根尖 1 000 个观察细胞中的全部微核数，个；

n ——同一被测样品中观察根尖的总数（为 ≥ 6 的 3 的倍数），个。

5.8.2 结果判定

根尖细胞中微核出现情况符合泊松（Poisson）分布，利用适当的统计学方法（如 u 检验），比较受试水样与空白水样（阴性对照）的根尖微核总数，判断两者是否存在显著差异（参考《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》（GB 15193.5—2014）中 6.1 “数据处理”的要求，利用适当的统计学方法如泊松（Poisson）分布或 u 检验，对受试样品各剂量组与溶剂对照组的含微核细胞率进行比较。另外，《医用数理统计方法》（第三版，人民卫生出版社，P 155 页）指出 Poisson 分布两样本均数比较可用 u 检验）。对于存在急性毒性的受试水样，计算每一稀释浓度样品的根尖微核总数，取最高者进行上述比较。若差异显著，则受试水样存在致突变性；若差异不显著，则在本测定方法下受试水样不存在致突变性。

国内外微核致突变性试验的相关标准，对试验结果均不做致突变性程度分级，只做致突变性存在与否的判定，例如国外的 ISO 29200-2013《Soil quality—Assessment of genotoxic

effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》、ISO 21427-1-2006《Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae》、ISO 21427-2-2006《Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 2: Mixed population method using the cell line V79》，国内的《危险品哺乳动物红细胞微核试验方法》（SN/T 2178—2008）、《化学品 体内哺乳动物红细胞微核试验方法》（GB/T—21773—2008）、《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》（GB 15193.5—2014）等，均是根据统计学方法对受试样品与阴性对照的差异显著性做出判定。从环境管理的角度看，是不允许有该类污染物排放的。

差异性判定 u 检验按公式（3）计算，当 $u > 1.96$ 时（ $p < 0.05$ 水平），存在显著性差异。

$$u = \frac{\left| \sum_{i=1}^n W_i - \sum_{i=1}^n K_i \right|}{\sqrt{\sum_{i=1}^n W_i + \sum_{i=1}^n K_i}} \quad (3)$$

式中： W_i ——受试水样第 i 个根尖观察到的全部微核数，个；

K_i ——空白水样第 i 个根尖观察到的全部微核数，个。

上述差异性比较方法，引用《医用数理统计方法》（第三版，人民卫生出版社）中第七章 7.9 “Poisson 分布的应用”中“4. 两样本均数的比较”的 u 检验计算公式及差异性判别标准（ $u_{0.05}=1.96$ ，即 $p < 0.05$ 水平时， u 检验差异性判断的临界值为 1.96）。

5.8.3 试验报告

试验报告要求包括但不限于以下信息：

- 1) 受试生物的种名、来源、收获年份；
- 2) 受试水样的采样地点、保存方法、保存时间、水样性质（如水样类别、pH 调节前后的值等）；
- 3) 存在急性毒性的受试水样，具有急性毒性的最低浓度，用于后续试验的各稀释浓度；
- 4) 每一被测样品对应的所有镜检根尖的细胞有丝分裂指数范围及是否符合 5.9.1 质量控制要求；
- 5) 每一被测样品对应的所有镜检根尖的微核总数；
- 6) 对照试验结果中空白水样（阴性对照）和参比水样（阳性对照）微核率，并判定是否符合 5.9.2 的质量控制要求；
- 7) 参比水样（阳性对照）平行样微核率，并判定是否符合 5.9.3 的质量控制要求；
- 8) 受试水样（或其各稀释浓度样品）的微核率，受试水样与空白水样差异性比较的统计学判断方法、判断标准、计算结果及受试水样致突变性存在与否的判断结论。

原始记录表和试验报告表格式参见表 17 和表 18。

表 17 蚕豆根尖微核致突变性试验原始记录

采样地点				水样类别				分析方法及依据			
采(送)样日期				水样保存方法				根尖处理日期			
水样 pH 值				是否需调节				水样调节后 pH 值			
是否存在急性毒性				存在急性毒性的最大稀释倍数							
样品编号	稀释浓度	镜检结果	根尖 1	根尖 2	根尖 3	根尖 4	根尖 5	根尖 6	……	有丝分裂指数 范围或 微核率 均值 (‰)	
空白水样	/	观察细胞数(个)									
		有丝分裂期细胞数(个)									
		微核数(个)									
参比水样-1	环磷酰胺 ρ=20.0 mg/L	观察细胞数(个)								/	
		有丝分裂期细胞数(个)									
		微核数(个)									
参比水样-2	环磷酰胺 ρ=20.0 mg/L	观察细胞数(个)								/	
		有丝分裂期细胞数(个)									
		微核数(个)									
……	……	观察细胞数(个)									
		有丝分裂期细胞数(个)									
		微核数(个)									
填表人:				审核人:				填表日期:			

表 18 蚕豆根尖微核致突变性试验报告表

采样地点		采样人员		水样类别				
采(送)样日期		水样保存时间		水样保存方法				
水样测试日期		分析方法及依据						
受试生物种名		受试生物收获年份		受试生物来源				
水样 pH 值		是否需调节水样 pH 值		水样调节后 pH 值				
水样是否存在急性毒性		存在急性毒性的最大稀释倍数		用于后续试验的 3 个稀释浓度				
空白水样微核率(‰)		参比水样-1 微核率(‰)		参比水样-2 微核率(‰)				
空白水样、参比水样根尖处理及恢复培养后, 是否有根尖存在急性毒性受害症状								
差异显著性比较方法		显著性差异判断标准						
样品编号	稀释浓度	镜检根尖数(个)	有丝分裂指数范围(%)	所有镜检根尖的微核总数(个)	微核率均值(‰)	差异性判定计算结果	与空白水样比较是否存在显著性差异	水样是否存在致突变性
结论	1、判定各被测样品有丝分裂指数范围是否均>20%； 2、判定空白水样(阴性对照)微核率是否满足≤6.6‰； 3、判定参比水样(阳性对照)及参比水样平行样的微核率是否满足 15.8‰~30.8‰； 4、分别判定各被测样品是否存在致突变性。							

5.9 质量保证和质量控制

5.9.1 有丝分裂指数

受试水样、空白水样、参比水样等处理后的所有进行镜检的根尖，每一根尖的细胞微核计数区有丝分裂指数应 $>20\%$ （参见 ISO 29200-2013 《Soil quality—Assessment of genotoxic effects on higher plants—*Vicia faba* micronucleus test》中 7.3.2，要求 $>20\%$ ）。

5.9.2 对照试验

每批次受试水样测试时，需按 5.7.11 进行对照试验，符合下列要求，试验结果方为有效。否则，查明原因后重新进行试验。

1) 空白水样（阴性对照）和参比水样（阳性对照）根尖处理及恢复培养后，根尖不能有急性毒性受害症状；

2) 空白水样微核率 $\leq 6.6\%$ （见表 6）；

3) 参比水样微核率取值范围 $23.3\% \pm 7.5\%$ ，即 $15.8\% \sim 30.8\%$ （见表 7）。

5.9.3 平行样

对照试验中参比水样进行平行测试，2 个平行样微核率介于 $15.8\% \sim 30.8\%$ （ $\rho=20.0 \text{ mg/L}$ 环磷酰胺微核率 99% 置信区间最大值 30.8% 、最小值 15.8% ，极端情况下两者间相对偏差为 32.2% ）。

5.10 实验室内各类水样的验证结果

5.10.1 空白水样和参比水样的验证

对空白水样（实验用水）、参比水样（ $\rho=20.0 \text{ mg/L}$ 环磷酰胺）进行实验室内验证，结果见表 19。

表 19 空白水样和参比水样验证结果

微核率	空白水样（实验用水）	参比水样（ $\rho=20.0 \text{ mg/L}$ 环磷酰胺）
平行样数（个）	100	30
有丝分裂指数范围（%）	22~127	25~114
测定平均值	3.8‰	23.2‰
测定最小值	1.2‰	19.5‰
测定最大值	6.3‰	28.5‰
质量控制要求	$\leq 6.6\%$	15.8‰~30.8‰
是否符合	符合	符合

5.10.2 实际水样的验证

对 2 种地表水（京杭运河同安桥、魏村水厂饮用水源水）、地下水（春江镇沈家塘）、生活污水（城北污水处理厂出口）、2 种工业废水（常州吉恩化工城市管网接入口、常州亚邦化学有限公司污水处理设施进口）、垃圾渗滤液（常州市生活废弃物处理中心）等水样进行蚕豆根尖微核测定的验证，结果见表 20。

表 20 实际水样验证结果

样品类别	采样地点	平行样数 (个)	有丝分裂指数 范围(‰)	根尖微核率(‰)		
				\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
空白水样	实验用水	6	32~124	3.2	0.8	26.3
参比水样	20.0 mg/L 环磷酰胺	6	27~105	23.3*	3.5	14.9
地表水	京杭运河同安桥断面	6	33~116	4.3	1.2	27.1
地表水	魏村水厂饮用水源水	6	29~102	3.9	1.2	30.7
地下水	春江镇沈家塘 3 号	6	30~109	3.5	1.1	32.6
生活污水	城北污水处理厂出口	6	26~106	5.0	1.2	23.5
工业废水	常州吉恩化工城市管网接入口	6	23~95	9.0*	1.7	19.0
工业废水 (具急性毒 性)	常州亚邦化学有限公司污水处 理设施进口 (x/2500 稀释浓度)	6	22~86	11.3*	2.0	17.6
垃圾渗滤液	常州市生活废弃物处理中心	6	23~101	7.3*	1.6	22.4

* 受试水样与空白水样(阴性对照)存在显著差异(u 检验, p<0.05 水平), 具有致突变性。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 参与方法验证的实验室、验证人员的基本情况

共有 6 家单位参加了方法验证工作, 验证单位及参与验证人员相关信息见表 21。

表 21 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称	从事分析工作年限(年)	单位名称
汤琳	教授级高工	12	上海市环境监测中心
李备军	高级工程师	23	上海市环境监测中心
顾卿	工程师	5	浙江省环境监测中心
徐杭英	工程师	5	浙江省环境监测中心
厉以强	教授级高工	26	江苏省环境监测中心
李娣	工程师	5	江苏省环境监测中心
陈明	工程师	5	南京市环境监测中心站
李敏	工程师	7	南京市环境监测中心站
徐恒省	高级工程师	11	苏州市环境监测中心
李继影	工程师	6	苏州市环境监测中心
张宗祥	高级工程师	14	泰州市环境监测中心站
孙海涛	工程师	4	泰州市环境监测中心站

6.1.2 方法验证方案

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168—2010)的规定, 组织 6 家以上有资质的实验室进行验证。工作主要内容是方法精密度验证试验, 方法有效性和敏感性的测定试验。

实施方法验证前, 编制组根据初步制定好的标准文本设计了试验作业指导书和验证方

案，联系并分发试验作业指导书及验证方案至参加验证的 6 家实验室，确定具有生物监测上岗资质的技术人员，具备检定有效期内的相关仪器设备，提前采购并配置好所需试剂，协调验证试验同步开始的时间。

编制组于催根结束前一天上午，组织实际受试水样的采样和参比水样的实验室配制工作，采集 2 种实际受试水样（地表水、化工废水）各 15 L，立即 0℃~5℃ 冷藏避光运输回实验室分样；配制 3 种浓度的环磷酰胺参比水样（ $\rho=2.0\text{ mg/L}$ 、 $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 、 $\rho=50.0\text{ mg/L}$ ）各 15 L，分样后 0℃~5℃ 冷藏暂存。下午，编制组协调 3 组人员分别将 3 种不同浓度的参比水样和 2 种实际受试水样各 2 L 送达各验证实验室，水样送达后均于 0℃~5℃ 冰箱冷藏保存至第二天上午统一时间对水样进行蚕豆根尖微核致突变性试验测定。

方法有效性和敏感性的测定：标准编制组将自制参比水样（ $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺，水样体积 2 L）分配到各验证实验室，同时实验室自备空白水样（实验用水，水样体积 2 L），各验证实验室分别按本研究制定的检测方法进行蚕豆根尖微核致突变性测定，每个水样平行测定 6 次，分别计算空白水样和参比水样微核率 99%置信区间，获取其质量控制要求的取值范围。

方法精密度的验证：标准编制组将 3 种不同浓度的参比水样（低微核率 $\rho=2.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺、中微核率 $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺、高微核率 $\rho=50.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺，水样体积各 2 L）以及 2 种实际受试水样（阴性实际受试水样常州市环境监测中心池塘水、阳性实际受试水样常京化学接管口排放废水，水样体积各 2 L）分配到各验证实验室，同时实验室自备空白水样（实验用水，水样体积 2 L），各验证实验室分别按本研究制定的检测方法进行蚕豆根尖微核致突变性测定，每个水样均平行测定 6 次。分别计算水样微核率的平均值、标准偏差、相对标准偏差。

编制组将《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》方法验证的结果进行汇总及统计分析，编写验证报告。

6.2 方法验证过程

1) 首先，通过筛选确定有资质和相关能力的方法验证单位，提前采购并配置好所需试剂，确定验证时间。在方法验证前，编制组要通过各种交流形式让参加验证的操作人员都熟悉方法原理、操作步骤及流程，并确定好验证水样准备时间。验证过程中使用的仪器、设备、试剂等应在有效期内并符合方法的要求。

2) 《方法验证报告》见附一。

3) 方法有效性和敏感性

6 家验证单位对蚕豆根尖微核率测定方法的有效性和敏感性进行测定，使用空白水样（实验用水）和自制参比水样（ $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺）进行测定，平行测定 6 次。结果见表 22。

以 6 家验证实验室对空白水样微核率测定结果的 99%置信上限为取值上限，即空白水样（实验用水）微核率质量控制要求 $\leq 6.6\%$ ；以 6 家验证实验室对自制参比水样微核率测定结果的 99%置信区间为取值范围，即参比水样（ $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺）微核率质量控制要求介于 15.8%~30.8%。

表 22 6 家验证实验室对空白水样和自制参比水样微核率测定结果 (单位:‰)

空白水样 (实验用水)						自制参比水样 ($\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺)					
组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i	组号	x_i
1	3.0	13	2.3	25	5.7	1	21.8	13	24.0	25	18.8
2	3.2	14	3.3	26	4.2	2	22.7	14	27.7	26	22.0
3	4.7	15	3.2	27	2.0	3	27.5	15	26.5	27	25.2
4	1.8	16	3.8	28	5.2	4	23.3	16	28.5	28	27.0
5	2.5	17	2.8	29	4.2	5	27.3	17	19.2	29	24.5
6	3.3	18	3.0	30	2.7	6	20.5	18	26.0	30	25.5
7	4.0	19	4.8	31	3.0	7	23.0	19	23.7	31	25.0
8	4.3	20	3.5	32	2.8	8	23.5	20	23.2	32	22.7
9	1.3	21	3.5	33	4.8	9	21.5	21	20.0	33	25.5
10	3.8	22	2.5	34	2.7	10	19.7	22	25.8	34	22.0
11	2.8	23	6.3	35	4.0	11	17.8	23	24.5	35	21.3
12	4.5	24	6.3	36	3.3	12	20.8	24	17.2	36	25.0
	\bar{x}_i				3.6		\bar{x}_i				23.3
99%置信区间 (‰)				0.6~6.6		99%置信区间 (‰)				15.8~30.8	

4) 方法精密度

6 家实验室对蚕豆根尖微核率测定方法的精密度进行验证, 对空白水样、3 种不同浓度的自制参比水样 (低微核率 $\rho=2.0$ mg/L 环磷酰胺、中微核率 $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺、高微核率 $\rho=50.0$ mg/L 环磷酰胺, 水样体积各 2 L) 以及 2 种实际受试水样 (阴性实际受试水样常州市环境监测中心池塘水、阳性实际受试水样常京化学接管口排放废水, 水样体积各 2 L) 进行测定, 每个水样均平行测定 6 次。结果见表 23。

表 23 蚕豆根尖微核率精密度测试数据汇总表 (单位: ‰)

实验 室编号	空白水样 (实验用水)			$\rho=2.0$ mg/L 环磷酰胺			$\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺			$\rho=50.0$ mg/L 环磷酰胺			常州市环境监测 中心池塘水			常京化学接管 口排放废水		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
1	3.8	1.3	33.3	11.4	1.1	10.1	22.7	2.2	9.6	29.8	2.7	9.2	3.9	1.7	43.8	8.3	1.5	17.9
2	3.6	0.6	16.4	12.9	1.3	10.4	23.6	2.1	8.7	31.3	3.8	12.2	3.6	1.6	42.8	8.9	1.3	14.9
3	3.3	1.4	43.1	11.3	1.4	12.4	24.4	3.0	12.1	31.4	3.6	11.6	3.5	1.6	45.2	8.2	2.8	34.1
4	3.3	1.2	36.4	10.1	1.0	10.2	24.4	3.3	13.6	30.5	2.2	7.3	4.3	1.1	24.6	8.6	2.4	27.9
5	3.8	1.4	37.7	10.9	1.3	11.8	22.4	3.6	16.1	28.9	3.7	12.7	3.9	1.2	30.3	8.8	2.4	27.8
6	3.9	1.4	35.2	10.3	1.6	15.7	22.5	3.5	15.7	28.9	3.8	13.2	4.0	1.4	33.8	9.1	2.3	25.2
$\bar{\bar{x}}_i$		3.6			11.1			23.3		30.1			3.9		8.6			
S'		0.3			1.0			0.9		1.1			0.3		0.4			
RSD'		7.4			8.9			3.9		3.6			7.4		4.2			
r		3.5			3.7			8.4		9.5			4.0		6.1			
R		3.3			2.9			8.7		10.2			4.3		6.6			

6 家实验室精密度验证的结果是: 空白水样(MCN=3.6‰), $\rho=2.0$ mg/L(MCN=11.1‰)、 $\rho=20.0$ mg/L (MCN=23.3‰)、 $\rho=50.0$ mg/L (MCN=30.1‰) 的自制环磷酰胺参比水样,

阴性实际受试水样（地表水，MCN=3.9‰）、阳性实际受试水样（化工废水，MCN=8.6‰）的蚕豆根尖微核率实验室内的相对标准偏差范围分别为：16.4%~37.7%、10.1%~15.7%、8.7%~16.1%、7.3%~13.2%、24.6%~45.2%、14.9%~34.1%；实验室间的相对标准偏差分别为7.4%、8.9%、3.9%、3.6%、7.4%、4.2%；重复性限（‰）为3.5、3.7、8.4、9.5、4.0、6.1；再现性限（‰）为3.3、2.9、8.7、10.2、4.3、6.6。

7 与开题报告的差异说明

标准征求意见稿与开题报告相比，存在如下差异：

7.1 方法性能方面

由于本方法测定的是水质的致突变遗传毒性综合效应，测试目标非单一物质，各受试水样成分和性质不同，不适于套用检出限和测定范围的概念；同时本方法测定受试水样致突变性的有无，其测定的是生物效应的存在与否，而不是某一特定污染物质的量，也不宜用准确度作为方法性能的指标。

本标准方法性能方面除考虑精密度外，还考虑方法的有效性和敏感性。我们以空白水样和参比水样微核率是否满足其取值范围来对方法的有效性和敏感性进行质量控制。

7.2 操作步骤方面

增加“实验用水准备”步骤，规定用于浸种、催根、根尖恢复培养的实验用水预先恒温至实验温度（于恒温培养箱中 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温平衡2 h），以消除由于实验用水水温对受试生物产生的环境条件刺激，避免由于实验用水本身对实验结果产生影响。

将开题报告中的“预实验”步骤改为“附录D（规范性附录）受试水样急性毒性预试验”，更加明晰这一操作步骤本身的含义，同时科学细化了对具有急性毒性受试水样的稀释制备过程。

操作步骤中明确“对照试验”的设置，与后续“质量保证和质量控制”中的要求相呼应，完善了实验流程的严谨性。

7.3 结果判定方面

将开题报告中“结果表达与污染程度的划分”调整为“结果判定”，不使用“污染指数”对测定结果进行判别和污染等级划分。

首先，本标准测定的是水质是否存在致突变性，而不是水体受污染程度，水环境受到污染时，并不一定表现出致突变性，两者没有直接对应关系。其次，蚕豆根尖细胞微核率的大小，与致突变物质浓度的高低，并不一定存在正向关系，当水环境中致突变物质浓度过高时，反而会抑制蚕豆根尖细胞有丝分裂甚至根尖的生长，使根尖细胞微核率降低，表现出更强的急性毒性或亚急性毒性效应。因此，本标准不再引入“污染指数”的概念，对水质致突变性测定结果进行判别和污染等级划分。

本标准采用国内外微核致突变性试验相关标准中普遍采用的统计学方法，对试验结果进行判定，判定受试水样与阴性对照水样的差异显著性，做出受试水样致突变性存在与否

的结论。

8 标准实施建议

本方法标准对水质致突变效应进行测定，可作为有关水环境、垃圾填埋场风险评估指南、规范等管理标准的检测技术方法支撑。可应用于“三致”污染风险较高的农药、印染、电镀、化工等特定行业的污水排放标准，对污水排放的综合毒性及致突变性进行监管。对正在制定的《废水综合毒性评价技术规范》具有潜在应用价值。因此，总体而言，本标准对水环境风险评估、污水排放等管理过程的环境介质致突变性监管具有较大的应用价值。

本标准对监测硬件条件的要求不高，基层环境监测站均可开展此项工作，各级监测站在该项目能力的形成上应更注重人员和管理，积累监测人员的实际操作经验，不断提高其分析测试水平，控制受试生物的质量，强调阳性、阴性等对照试验的过程控制，确保监测质量，有效服务环境管理。

参考文献

- [1] 国家环境保护总局. 关于开展 2009 年度国家环境保护标准制修订项目工作的通知（环办函[2009]221 号）.
- [2] 《环境科学大辞典》编辑委员会.环境科学大辞典[M].北京：中国环境科学出版社.1991, 第 841 页.
- [3] 梁婧, 罗环, 陈斌. 职业性铅接触工人外周血淋巴细胞微核率的变化[J]. 首都医科大学学报, 2013,34(5):720-723.
- [4] 周媛媛, 王进, 余宁乐. 江苏省 2 642 名放射工作人员外周血淋巴细胞染色体畸变及微核率分析[J]. 职业与健康, 2016,32(14):1891-1893.
- [5] 王秋艳, 牛国庆, 李冬梅. 砷化物、铅、苯、聚氯乙烯作业工人外周血淋巴细胞微核检测分析[J]. 中国工业医学杂志, 2015,28(1):76.
- [6] Read J. Radiation Biology of *Vicia Faba* in Relation to the General Problem [M]. London: Black Well Press, 1959: 59-61.
- [7] 陈瑞娇, 李均祥. 蚕豆根尖微核试验在环境致突变物检测中的应用[J]. 韶关学院学报, 2006,27(9):87-91.
- [8] Grant W F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens[J]. Mutat Res, 1994, 310:175.
- [9] Degassi F,Rizzoni M. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh water pollution[J]. Mutat Res, 1982,97:19-33.
- [10] Heddle J A. A rapid in vivo test for chromosomal damage[J]. Mutat Res, 1973, 18:187-190.
- [11] Schmid W. The micronucleus test[J]. Mutat Res, 1975, 31:9-15.
- [12] 云南省动物研究所二室. 食管癌病人放射治疗时外周血淋巴细胞微核率的变化以及和染色体畸变率的关系[J]. 遗传学报, 1978, 5(2):142-146.

- [13] Heddle J A ,Cimino M C , Hayashi M , . Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past , Present and Future[J] . Environ Mole Mutagen, 1991, 18:277-291 .
- [14] 曹佳. 微核试验在中国的应用、发展与展望[J]. 遗传, 2003, 25(1):73-76.
- [15] 金波, 欧光鉴, 李明. 蚕豆 (*Vicia faba*) 根尖微核试验敏感品种的筛选[J]. 华中师范大学学报, 1984,2:101-108.
- [16] 欧光鉴, 金波, 陈光荣. 蚕豆 (*Vicia faba*) 根尖微核试验敏感品种筛选的续报[J]. 华中师范大学学报, 1985,1:87-90.
- [17] 蚕豆[S]. GB/T 10459—2008, 中国标准出版社.2009 年.
- [18] 张燕. Cr⁶⁺对蚕豆根尖细胞的遗传毒性[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(23):5711-5713.
- [19] 高惠仙, 王向东. 蚕豆根尖微核实验监测几种重金属污染研究[J]. 太原师范学院学报 (自然科学版), 2009,8(3):107-113.
- [20] 李红, 丁晓雯, 石晶. 蚕豆根尖微核实验阳性结果判断标准研究[J]. 生物工程, 2010,31(10):229-231.
- [21] 葛成岩. 蚕豆根尖细胞微核监测体系的质量控制 [J]. 环境科学与管理, 2007,32(10):162-163.
- [22] 唐正义, 胡蓉, 卿东红. 3 种农药诱发蚕豆根尖细胞微核试验研究[J]. 西南交通大学学报, 2006,41(6):788-792.
- [23] Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae[S]. ISO 21427-1-2006.
- [24] Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—part 2: Mixed population method using the cell line V79[S]. ISO 21427-2-2006.
- [25] 王鹏. 不同浓度的环磷酰胺对蚕豆根尖细胞微核率的影响[J]. 辽宁师专学报, 2006,8(1):101-102.
- [26] 丁晓雯, 李红, 王海燕. 环磷酰胺对蚕豆根尖细胞微核率的影响[J]. 食品科学, 2010,31(1):194-197.
- [27] 庄昉成, 杨寅楣. 环磷酸胺诱导蚕豆根尖细胞微核的剂量——效应关系[J]. 重庆环境科学, 1990,12(4):56-57.
- [28] 仪慧兰, 秦海峰, 李红孩. 环磷酰胺诱发蚕豆体细胞遗传损伤的研究[J]. 植物研究, 2004,24(4):439-442.
- [29] 李宏. 环磷酰胺诱发蚕豆根尖细胞染色体畸变的分析[J]. 渝州大学学报 (自然科学版), 1998,15(3):28-33.
- [30] 段昌群, 王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨[J]. 植物学报, 1995,37(1):14-24.
- [31] 朱正威, 赵占良. 生物——分子与细胞[M].北京: 人民教育出版社, 2007:112-113.
- [32] 郭祖超. 医用数理统计方法 (第三版) [M].北京: 人民卫生出版社, 1988:149-155.

附一 方法验证报告

方法验证报告

方法名称：水质 蚕豆根尖微核致突变性试验

项目主编单位：常州市环境监测中心

验证单位：上海市环境监测中心、浙江省环境监测中心、江苏省环境监测中心、苏州市环境监测中心、南京市环境监测中心站、泰州市环境监测中心站

项目负责人及职称：滕加泉 高级工程师

通讯地址：常州市浦前张家村 149 号 电话：0519-86691381

报告编写人及职称：周俊 工程师

报告日期：2014 年 12 月 18 日

本方法参加验证的 6 家实验室分别为：（1）上海市环境监测中心，（2）浙江省环境监测中心，（3）江苏省环境监测中心，（4）南京市环境监测中心站，（5）苏州市环境监测中心，（6）泰州市环境监测中心站。

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168—2010）的规定，组织 6 家以上有资质的实验室进行验证。工作主要内容是方法精密度验证试验，方法有效性和敏感性的测定试验。

1 验证方案的制定及实施

实施方法验证前，编制组根据初步制定好的标准文本设计了试验作业指导书和验证方案，联系并分发试验作业指导书及验证方案至参加验证的 6 家实验室，确定具有生物监测上岗资质的技术人员，具备检定有效期内的相关仪器设备，提前采购并配置好所需试剂，协调验证试验同步开始的时间。

编制组于催根结束前一天上午，组织实际受试水样的采样和参比水样的实验室配制工作，采集 2 种实际受试水样（地表水、化工废水）各 15 L，立即 0℃~5℃ 冷藏避光运输回实验室分样；配制 3 种浓度的环磷酰胺参比水样（ $\rho=2.0\text{ mg/L}$ 、 $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 、 $\rho=50.0\text{ mg/L}$ ）各 15 L，分样后 0℃~5℃ 冷藏暂存。下午，编制组协调 3 组人员分别将 3 种不同浓度的参比水样和 2 种实际受试水样各 2 L 送达各验证实验室，水样送达后均于 0℃~5℃ 冰箱冷藏保存至第二天上午统一时间对水样进行蚕豆根尖微核致突变性试验测定。

方法有效性和敏感性的测定：标准编制组将自制参比水样（ $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺，水样体积 2 L）分配到各验证实验室，同时实验室自备空白水样（实验用水，水样体积 2 L），各验证实验室分别按本研究制定的检测方法进行蚕豆根尖微核致突变性测定，每个水样平行测定 6 次，分别计算空白水样和参比水样微核率 99% 置信区间，获取其质量控制要求的取值范围。

方法精密度的验证：标准编制组将 3 种不同浓度的参比水样（低微核率 $\rho=2.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺、中微核率 $\rho=20.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺、高微核率 $\rho=50.0\text{ mg/L}$ 环磷酰胺，水样体积各 2 L）以及 2 种实际受试水样（阴性实际受试水样常州市环境监测中心池塘水、阳性实际受试水样常京化学接管口排放废水，水样体积各 2 L）分配到各验证实验室，同时实验室自备空白水样（实验用水，水样体积 2 L），各验证实验室分别按本研究制定的检测方法进行蚕豆根尖微核致突变性测定，每个水样均平行测定 6 次。分别计算水样的平均值、标准偏差、相对标准偏差。

编制组将《水质 蚕豆根尖微核致突变性试验》方法验证的结果进行汇总及统计分析，编写验证报告。

2 原始数据

2.1 实验室基本情况

附表 1 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
汤琳	教授级高工	12	上海市环境监测中心
李备军	高级工程师	23	上海市环境监测中心
顾卿	工程师	5	浙江省环境监测中心
徐杭英	工程师	5	浙江省环境监测中心
厉以强	教授级高工	26	江苏省环境监测中心
李娣	工程师	5	江苏省环境监测中心
陈明	工程师	5	南京市环境监测中心站
李敏	工程师	7	南京市环境监测中心站
徐恒省	高级工程师	11	苏州市环境监测中心
李继影	工程师	6	苏州市环境监测中心
张宗祥	高级工程师	14	泰州市环境监测中心站
孙海涛	工程师	4	泰州市环境监测中心站

附表 2 参加验证单位仪器情况登记表

验证实验室	仪器名称	规格型号	性能状况
上海市环境监测中心	生化培养箱	LRH-250	正常
上海市环境监测中心	恒温水浴锅	HH-S11-6	正常
上海市环境监测中心	显微镜	BH-2	正常
浙江省环境监测中心	恒温培养箱	DHP9162	正常
浙江省环境监测中心	恒温水浴锅	HH-6	正常
浙江省环境监测中心	显微镜	DM2500	正常
江苏省环境监测中心	恒温振荡培养箱	LRH-250Z	正常
江苏省环境监测中心	恒温水浴锅	HH-S2	正常
江苏省环境监测中心	显微镜	BX50	正常
南京市环境监测中心站	隔水培养箱	GHP-9270	正常
南京市环境监测中心站	恒温水浴锅	HHS21-4	正常
南京市环境监测中心站	显微镜	CX-41	正常
苏州市环境监测中心	生化培养箱	WMZK-1	正常
苏州市环境监测中心	恒温水浴锅	HHS11-2-II	正常
苏州市环境监测中心	显微镜	BX51	正常
泰州市环境监测中心站	隔水式恒温培养箱	GSP-9160MBE	正常
泰州市环境监测中心站	恒温水浴锅	601-C	正常
泰州市环境监测中心站	显微镜	XTZ-D	正常

附表3 参加验证单位使用试剂登记表

试剂名称	验证实验室	生产厂商
实验用水	上海市环境监测中心	满足三级纯水要求的去离子水
	浙江省环境监测中心	满足三级纯水要求的去离子水
	江苏省环境监测中心	满足三级纯水要求的去离子水
	南京市环境监测中心站	满足三级纯水要求的去离子水
	苏州市环境监测中心	满足三级纯水要求的去离子水
	泰州市环境监测中心站	满足三级纯水要求的去离子水
碱性品红	浙江省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	江苏省环境监测中心	上海试剂一厂
	南京市环境监测中心站	上海试剂一厂
偏重亚硫酸钠	浙江省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	江苏省环境监测中心	上海试剂一厂
	南京市环境监测中心站	上海试剂一厂
席夫氏 (Schiff) 试剂	上海市环境监测中心	德国默克 (MERCK) 公司
	苏州市环境监测中心	德国默克 (MERCK) 公司
	泰州市环境监测中心站	德国默克 (MERCK) 公司
乙醇	上海市环境监测中心	中国医药 (集团) 上海化学试剂公司
	浙江省环境监测中心	上海试剂一厂
	江苏省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	南京市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	苏州市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	泰州市环境监测中心站	上海试剂一厂
乙酸	上海市环境监测中心	上海试剂一厂
	浙江省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	江苏省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	南京市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	苏州市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	泰州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	上海市环境监测中心	上海试剂一厂
	浙江省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	江苏省环境监测中心	中国医药 (集团) 上海化学试剂公司
	南京市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	苏州市环境监测中心	中国医药 (集团) 上海化学试剂公司
	泰州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
环磷酰胺	上海市环境监测中心	美国西格玛 (SIGMA) 公司标准品
	浙江省环境监测中心	美国西格玛 (SIGMA) 公司标准品
	江苏省环境监测中心	美国西格玛 (SIGMA) 公司标准品
	南京市环境监测中心站	美国西格玛 (SIGMA) 公司标准品
	苏州市环境监测中心	美国西格玛 (SIGMA) 公司标准品
	泰州市环境监测中心站	美国西格玛 (SIGMA) 公司标准品

2.2 方法有效性和敏感性的测试数据

6家验证单位对蚕豆根尖微核率测定方法的有效性和敏感性进行测试，使用空白水样（实验用水）进行测定，平行测定6次，结果见附表4。

附表4 6家验证实验室对空白水样（实验用水）微核率测定结果（单位：%）

组号	x_i										
1	3.0	7	4.0	13	2.3	19	4.8	25	5.7	31	3.0
2	3.2	8	4.3	14	3.3	20	3.5	26	4.2	32	2.8
3	4.7	9	1.3	15	3.2	21	3.5	27	2.0	33	4.8
4	1.8	10	3.8	16	3.8	22	2.5	28	5.2	34	2.7
5	2.5	11	2.8	17	2.8	23	6.3	29	4.2	35	4.0
6	3.3	12	4.5	18	3.0	24	6.3	30	2.7	36	3.3

使用自制参比水样（ $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺）进行测定，平行测定6次。结果见附表5。

附表5 6家验证实验室对自制参比水样（ $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺）微核率测定结果（单位：%）

组号	x_i										
1	21.8	7	23.0	13	24.0	19	23.7	25	18.8	31	25.0
2	22.7	8	23.5	14	27.7	20	23.2	26	22.0	32	22.7
3	27.5	9	21.5	15	26.5	21	20.0	27	25.2	33	25.5
4	23.3	10	19.7	16	28.5	22	25.8	28	27.0	34	22.0
5	27.3	11	17.8	17	19.2	23	24.5	29	24.5	35	21.3
6	20.5	12	20.8	18	26.0	24	17.2	30	25.5	36	25.0

2.3 方法精密度的测试数据

6家验证实验室对空白水样、参比水样和实际受试水样的蚕豆根尖微核率测定方法验证结果的精密度测试数据见附表6~附表11。

附表6 空白水样（实验用水）精密度测试数据汇总表（单位：%）

实验室 编号	平行样微核率测定结果						\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	有丝分裂 指数范围
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
1	3.0	4.0	2.3	4.8	5.7	3.0	3.8	1.3	33.3	34~112
2	3.2	4.3	3.3	3.5	4.2	2.8	3.6	0.6	16.4	44~89
3	4.7	1.3	3.2	3.5	2.0	4.8	3.3	1.4	43.1	39~97
4	1.8	3.8	3.8	2.5	5.2	2.7	3.3	1.2	36.4	36~105
5	2.5	2.8	2.8	6.3	4.2	4.0	3.8	1.4	37.7	50~78
6	3.3	4.5	3.0	6.3	2.7	3.3	3.9	1.4	35.2	27~82

附表7 参比水样（ $\rho=2.0$ mg/L 环磷酰胺）精密度测试数据汇总表（单位：%）

实验室 编号	平行样微核率测定结果						\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	有丝分裂 指数范围
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
1	11.3	11.0	9.5	12.7	11.5	12.5	11.4*	1.1	10.1	27~86
2	13.3	10.3	13.2	12.8	13.2	14.3	12.9*	1.3	10.4	53~113
3	13.0	10.2	9.5	11.7	10.7	12.7	11.3*	1.4	12.4	25~72
4	8.7	10.7	8.8	10.7	11.0	10.5	10.1*	1.0	10.2	27~102
5	10.7	9.0	11.8	11.2	10.2	12.7	10.9*	1.3	11.8	26~66
6	10.8	10.2	8.0	11.2	9.2	12.7	10.3*	1.6	15.7	38~91

* 受试水样与空白水样（阴性对照）存在显著差异（u检验， $p<0.05$ 水平），具有致突变性。

附表 8 参比水样 ($\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺) 精密度测试数据汇总表 (单位: %)

实验室 编号	平行样微核率测定结果						\bar{x}_i	S_i	$RSD_i(\%)$	有丝分裂 指数范围
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
1	21.8	23.0	24.0	23.7	18.8	25.0	22.7*	2.2	9.6	32~79
2	22.7	23.5	27.7	23.2	22.0	22.7	23.6*	2.1	8.7	24~86
3	27.5	21.5	26.5	20.0	25.2	25.5	24.4*	3.0	12.1	41~76
4	23.3	19.7	28.5	25.8	27.0	22.0	24.4*	3.3	13.6	26~103
5	27.3	17.8	19.2	24.5	24.5	21.3	22.4*	3.6	16.1	34~77
6	20.5	20.8	26.0	17.2	25.5	25.0	22.5*	3.5	15.7	32~89

* 受试水样与空白水样 (阴性对照) 存在显著差异 (u 检验, $p<0.05$ 水平), 具有致突变性。

附表 9 参比水样 ($\rho=50.0$ mg/L 环磷酰胺) 精密度测试数据汇总表 (单位: %)

实验室 编号	平行样微核率测定结果						\bar{x}_i	S_i	$RSD_i(\%)$	有丝分裂 指数范围
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
1	30.5	29.7	25.0	31.7	29.2	33.0	29.8*	2.7	9.2	23~69
2	31.2	25.7	29.5	37.3	31.5	32.5	31.3*	3.8	12.2	29~94
3	35.5	27.5	35.0	32.5	27.0	30.7	31.4*	3.6	11.6	34~99
4	30.2	33.5	29.5	32.0	30.8	27.0	30.5*	2.2	7.3	25~89
5	30.2	29.3	22.8	26.7	32.7	32.0	28.9*	3.7	12.7	22~76
6	22.2	28.3	32.7	30.8	31.8	27.8	28.9*	3.8	13.2	28~72

* 受试水样与空白水样 (阴性对照) 存在显著差异 (u 检验, $p<0.05$ 水平), 具有致突变性。

附表 10 实际受试水样 (常州市环境监测中心池塘水) 精密度测试数据汇总表 (单位: %)

实验室 编号	平行样微核率测定结果						\bar{x}_i	S_i	$RSD_i(\%)$	有丝分裂 指数范围
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
1	3.2	3.0	3.5	6.8	2.0	4.7	3.9	1.7	43.8	29~118
2	3.2	5.7	1.2	3.2	3.8	4.8	3.6	1.6	42.8	26~98
3	2.3	1.8	3.2	6.3	3.7	3.5	3.5	1.6	45.2	44~105
4	5.7	4.8	4.2	2.5	4.0	4.5	4.3	1.1	24.6	56~103
5	5.0	2.8	2.5	3.3	5.3	4.5	3.9	1.2	30.3	34~81
6	2.2	3.5	4.5	4.8	3.2	6.0	4.0	1.4	33.8	31~76

附表 11 实际受试水样 (常京化学接管口排放废水) 精密度测试数据汇总表 (单位: %)

实验室 编号	平行样微核率测定结果						\bar{x}_i	S_i	$RSD_i(\%)$	有丝分裂 指数范围
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
1	6.5	7.0	8.2	10.5	8.0	9.3	8.3*	1.5	17.9	26~92
2	9.5	9.2	9.3	10.2	6.3	9.0	8.9*	1.3	14.9	38~108
3	12.2	5.2	8.7	5.3	7.3	10.3	8.2*	2.8	34.1	40~84
4	12.2	7.3	10.0	5.8	6.7	9.7	8.6*	2.4	27.9	29~74
5	10.8	8.3	7.5	5.5	8.2	12.3	8.8*	2.4	27.8	35~93
6	11.7	5.5	11.0	7.7	10.0	8.7	9.1*	2.3	25.2	31~97

* 受试水样与空白水样 (阴性对照) 存在显著差异 (u 检验, $p<0.05$ 水平), 具有致突变性。

3 方法验证数据汇总

3.1 方法有效性和敏感性数据汇总

附表 12 是 6 家实验室方法验证中空白水样（实验用水）和自制参比水样（ $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺）的有效性和敏感性测试结果的统计分析。

附表 12 空白水样和自制参比水样的有效性和敏感性测定结果 （单位：%）

微核率	空白水样（实验用水）	参比水样（ $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺）
\bar{x}_i	3.6	23.3
S	1.2	2.9
99%置信区间	0.6~6.6	15.8~30.8

3.2 方法精密度数据汇总

附表 13 是 6 家实验室方法验证结果中蚕豆根尖微核率的精密度测试结果的统计分析。

附表 13 蚕豆根尖微核率精密度测试数据汇总表 （单位：%）

实验室 编号	空白水样 （实验用水）			$\rho=2.0$ mg/L 环磷酰胺			$\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺			$\rho=50.0$ mg/L 环磷酰胺			常州市环境监测 中心池塘水			常京化学接管口 排放废水		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
1	3.8	1.3	33.3	11.4	1.1	10.1	22.7	2.2	9.6	29.8	2.7	9.2	3.9	1.7	43.8	8.3	1.5	17.9
2	3.6	0.6	16.4	12.9	1.3	10.4	23.6	2.1	8.7	31.3	3.8	12.2	3.6	1.6	42.8	8.9	1.3	14.9
3	3.3	1.4	43.1	11.3	1.4	12.4	24.4	3.0	12.1	31.4	3.6	11.6	3.5	1.6	45.2	8.2	2.8	34.1
4	3.3	1.2	36.4	10.1	1.0	10.2	24.4	3.3	13.6	30.5	2.2	7.3	4.3	1.1	24.6	8.6	2.4	27.9
5	3.8	1.4	37.7	10.9	1.3	11.8	22.4	3.6	16.1	28.9	3.7	12.7	3.9	1.2	30.3	8.8	2.4	27.8
6	3.9	1.4	35.2	10.3	1.6	15.7	22.5	3.5	15.7	28.9	3.8	13.2	4.0	1.4	33.8	9.1	2.3	25.2
$\bar{\bar{x}}_i$	3.6			11.1			23.3			30.1			3.9			8.6		
S'	0.3			1.0			0.9			1.1			0.3			0.4		
RSD'	7.4			8.9			3.9			3.6			7.4			4.2		
r	3.5			3.7			8.4			9.5			4.0			6.1		
R	3.3			2.9			8.7			10.2			4.3			6.6		

4 方法验证结论

4.1 有效性和敏感性

以 6 家验证实验室对空白水样微核率测定结果的 99%置信上限为取值上限，即空白水样（实验用水）微核率质量控制要求 $\leq 6.6\%$ ；以 6 家验证实验室对自制参比水样微核率测定结果的 99%置信区间为取值范围，即参比水样（ $\rho=20.0$ mg/L 环磷酰胺）微核率质量控制要求介于 15.8%~30.8%。

4.2 精密度

6 家实验室分别对空白水样（MCN=3.6%）， $\rho=2.0$ mg/L（MCN=11.1%）、 $\rho=20.0$ mg/L（MCN=23.3%）、 $\rho=50.0$ mg/L（MCN=30.1%）的自制环磷酰胺参比水样，阴性实际受试

水样（地表水，MCN=3.9‰）、阳性实际受试水样（化工废水，MCN=8.6‰）的蚕豆根尖微核率进行了测定，实验室内的相对标准偏差范围分别为：16.4%~37.7%、10.1%~15.7%、8.7%~16.1%、7.3%~13.2%、24.6%~45.2%、14.9%~34.1%；实验室间的相对标准偏差分别为7.4%、8.9%、3.9%、3.6%、7.4%、4.2%；重复性限（‰）为3.5、3.7、8.4、9.5、4.0、6.1；再现性限（‰）为3.3、2.9、8.7、10.2、4.3、6.6。