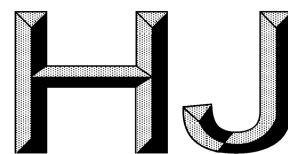


附件6



中华人民共和国国家生态环境标准

HJ □□□—202□

水质 急性毒性的测定 发光细菌法

Water quality—Determination of the acute toxicity—Luminescent
bacteria method

（征求意见稿）

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言	ii
1 适用范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	2
5 干扰和消除	3
6 试剂和材料	3
7 仪器和设备	5
8 样品	5
9 分析步骤	6
10 结果计算与表示	10
11 有效性、敏感性与精密度	12
12 质量保证和质量控制	13
13 测试报告	13
附录 A（资料性附录） 有色试样的测定	15
附录 B（资料性附录） 发光细菌菌液细胞密度计数方法	17
附录 C（规范性附录） 生物发光光度计技术指标控制要求	20
附录 D（资料性附录） 测试管排列与测定及 LID 测试样品稀释示例	21
附录 E（规范性附录） 海水试样的测定	23
附录 F（资料性附录） 系列浓度氯化汞溶液配制方案	24
附录 G（资料性附录） 线性回归分析的参数计算	25
附录 H（资料性附录） 测定结果计算示例	27

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》《中华人民共和国海洋环境保护法》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规范水质发光细菌急性毒性的测定方法，制定本标准。

本标准规定了地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水对发光细菌的急性毒性测定方法。

本标准与《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441—1995）相比，主要差异如下：

- 修改了方法适用范围、方法原理、测试的菌样体积及步骤、结果计算与表示；
- 增加了术语定义、水质生物毒性测定 LID 法、质量保证和质量控制；
- 完善了样品采集、保存和前处理方法；
- 细化了受试发光细菌和生物发光光度计的技术要求。

自本标准实施之日起，原国家环境保护局 1995 年 3 月 25 日批准发布的《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》（GB/T 15441—1995）在相应的国家生态环境标准实施中停止执行。

本标准的附录 A、附录 B、附录 D 和附录 F～附录 H 为资料性附录，附录 C 和附录 E 为规范性附录。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准主要起草单位：江苏省常州环境监测中心、中国环境监测总站。

本标准验证单位：上海市环境监测中心、江苏省环境监测中心、浙江省生态环境监测中心、江苏省苏州环境监测中心、江苏省泰州环境监测中心和江苏省淮安环境监测中心。

本标准生态环境部202□年□□月□□日批准。

本标准自202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 急性毒性的测定 发光细菌法

警告：测试中使用的氯化汞、硫酸锌等可能具有较高的毒性，测试操作时应佩戴防护器具，避免吸入呼吸道或接触皮肤和衣物。

1 适用范围

本标准规定了使用明亮发光杆菌测定水质急性毒性的发光细菌法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水对发光细菌急性毒性发光抑制率、氯化汞毒性当量浓度、最低无效应稀释倍数和效应浓度的测定。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用标准，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用标准，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。其他文件被新文件废止、修改、修订的，新文件适用于本标准。

GB 17378.3 海洋监测规范 第3部分：样品采集、贮存与运输

GB 17378.4 海洋监测规范 第4部分：海水分析

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 164 地下水环境监测技术规范

HJ 506 水质 溶解氧的测定 电化学探头法

HJ 1147 水质 pH值的测定 电极法

HJ 1396 水质 水温的测定 传感器法

JJF 2203 水质毒性分析仪校准规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

试样 test sample

样品经稀释液稀释配成的可供测试的溶液。

注：样品直接用于测试时，试样即为样品。

3.2

相对发光率 relative luminescence rate (T_t)

受试发光细菌与试样反应一定时间后，其发光强度与反应前的初始发光强度（经校正）的比值，以百分数表示。

3.3

发光抑制率 luminescence inhibition rate (H_t)

受试发光细菌与试样反应一定时间后，其发光强度的降低量与反应前的初始发光强度（经校正）的比值，以百分数表示。

注：同一个试样同一次测定的发光抑制率和相对发光率（3.2）之和为100%。

3.4

校正因子 correction factor (f_{kt})

受试发光细菌与空白对照反应一定时间后，其发光强度与反应前的初始发光强度的比值。

注：试样测试过程中， f_{kt} 值用于修正反应前的初始发光强度，以排除发光细菌发光强度自身随时间变化带来的影响。

3.5

效应浓度 effective concentration (EC_x)

在规定条件的测试周期内，受试发光细菌发光抑制率为 $x\%$ 时所对应的试样浓度。

注：例如，发光抑制率达到50%时所对应的试样浓度为 EC_{50} （即半数效应浓度）。

3.6

最低无效应稀释倍数 lowest ineffective dilution (LID)

在规定条件的测试周期内，受试发光细菌发光抑制率 $<20\%$ 时的最低稀释倍数。

3.7

参比（毒）物 reference toxicants; reference materials

为判断测试系统有效性而使用的化学物质。可用于不同实验室之间、同一实验室内不同时间或不同人员之间测定结果的可比性评价。

注：本标准简称参比物，可选用氯化汞或硫酸锌为参比物。

4 方法原理

发光细菌体内细菌荧光酶催化还原型的黄素单核苷酸及长链脂肪醛发生氧化，并放出光子，发出在避光条件下肉眼可见的蓝绿光。在规定的测试条件下，将受试发光细菌与不同稀

释倍数的试样反应 15 min，根据发光抑制率计算氯化汞毒性当量浓度、LID 或 EC_{50} ，以表征样品的急性毒性。

5 干扰和消除

5.1 样品中的悬浮颗粒物会对测定结果产生影响，可静置沉淀(1 h)或离心(5000 g, 10 min)以消除影响。

5.2 样品色度会对测定结果产生影响，对于有色样品，参见附录 A 进行干扰校正。

6 试剂和材料

6.1 受试发光细菌

6.1.1 受试发光细菌为明亮发光杆菌 T3 (*Photobacterium phosphoreum* sp. strain T3, CGMCC 1.61989 或其他等同菌株)的冻干粉， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}\sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光冷冻保存，有效期半年。市售商品应提供菌种来源、生产批次、生产日期、规格、保存条件及保质期等信息，按要求保存。

6.1.2 冻干粉应真空密闭包装完好，呈白色粉末状，加入氯化钠溶液 I (6.2.7)复苏后，应迅速溶解，呈乳白色，无明显悬浮颗粒物。

6.1.3 不同来源的受试发光细菌冻干粉在首次使用之前，应随机抽取其中至少 1 个冻干粉样本，按 9.2 步骤复苏、稀释后，发光细菌测试液 II (9.2.3)的初始细胞密度约为 10^4 个/mL，计数方法参见附录 B。

6.1.4 每批次受试发光细菌冻干粉在使用之前，应随机抽取其中至少 1 个冻干粉样本开展验证试验，校正因子、阳性对照和阴性对照测定结果应符合 12.1~12.3 的要求方可用于测试。

6.2 试剂

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂，实验用水为蒸馏水。

6.2.1 氢氧化钠 (NaOH)。

6.2.2 氯化钠 (NaCl)。

6.2.3 氯化汞 (HgCl_2)。

6.2.4 七水合硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。

6.2.5 盐酸 (HCl)： $\rho=1.18\text{ g/mL}$ ， $w\in[36.0\%, 38.0\%]$ 。

6.2.6 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1\text{ mol/L}$ 。

称取 4 g 氢氧化钠 (6.2.1)，溶于少量水中，用水定容至 100 mL。

6.2.7 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ 。

移取 8.3 mL 盐酸 (6.2.5)，溶于少量水中，用水定容至 100 mL。

6.2.8 氯化钠溶液 I： $\rho(\text{NaCl})=25\text{ g/L}$ 。

称取 2.5 g 氯化钠 (6.2.2)，溶于少量水中，用水定容至 100 mL， $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。

亦可购买与受试发光细菌（6.1）配套使用的复苏液，按要求保存。

6.2.9 氯化钠溶液Ⅱ： $\rho(\text{NaCl})=30\text{ g/L}$ 。

称取 3 g 氯化钠（6.2.2），溶于少量水中，用水定容至 100 mL。亦可购买与受试发光细菌（6.1）配套使用的稀释液，按要求保存。

6.2.10 氯化汞储备液： $\rho(\text{HgCl}_2)=1\text{ g/L}$ 。

称取 0.100 g 氯化汞（6.2.3），溶于少量氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9），用氯化钠溶液Ⅱ定容至 100 mL。室温避光条件保存，有效期 6 个月。亦可购买市售有证标准溶液，参照标准溶液证书保存。

6.2.11 氯化汞中间液： $\rho(\text{HgCl}_2)=20\text{ mg/L}$ 。

移取 10 mL 氯化汞储备液（6.2.10），用氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9）定容至 500 mL。室温避光条件保存，有效期 6 个月。

6.2.12 氯化汞工作液： $\rho(\text{HgCl}_2)=2\text{ mg/L}$ 。

移取 10 mL 氯化汞中间液（6.2.11），用氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9）定容至 100 mL。2℃～5℃冷藏避光保存，有效期 6 个月。

6.2.13 参比物氯化汞溶液Ⅰ： $\rho(\text{HgCl}_2)=0.2\text{ mg/L}$ 。

移取 10 mL 氯化汞工作液（6.2.12），用氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9）定容至 100 mL，临用现配。

6.2.14 参比物氯化汞溶液Ⅱ： $\rho(\text{HgCl}_2)=0.11\text{ mg/L}$ 。

移取 5.6 mL 氯化汞工作液（6.2.12），用氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9）定容至 100 mL，临用现配。

6.2.15 硫酸锌（以 Zn^{2+} 计）储备液： $\rho(\text{Zn}^{2+})=1.4\text{ g/L}$ 。

称取 0.614 g 七水合硫酸锌（6.2.4），溶于少量氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9），用氯化钠溶液Ⅱ定容至 100 mL。2℃～5℃冷藏避光保存，有效期 6 个月。

6.2.16 硫酸锌（以 Zn^{2+} 计）工作液： $\rho(\text{Zn}^{2+})=28\text{ mg/L}$ 。

移取 10 mL 硫酸锌储备液（6.2.15），用氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9）定容至 500 mL。2℃～5℃冷藏避光保存，有效期 6 个月。

6.2.17 参比物硫酸锌（以 Zn^{2+} 计）溶液Ⅰ： $\rho(\text{Zn}^{2+})=2.8\text{ mg/L}$ 。

移取 10 mL 硫酸锌工作液（6.2.16），用氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9）定容至 100 mL，临用现配。

6.2.18 参比物硫酸锌（以 Zn^{2+} 计）溶液Ⅱ： $\rho(\text{Zn}^{2+})=1.6\text{ mg/L}$ 。

移取 5.6 mL 硫酸锌工作液（6.2.16），用氯化钠溶液Ⅱ（6.2.9）定容至 100 mL，临用现配。

7 仪器和设备

- 7.1 采样瓶：棕色磨口具塞玻璃瓶，或聚乙烯、聚丙烯、聚四氟乙烯材质的塑料瓶，容积 ≥ 250 mL。
- 7.2 冷藏箱：可移动，具有 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏功能。
- 7.3 温度计：测量范围 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，最小分度 $\leq 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 7.4 pH计：测量范围 $0\sim 14$ ，最小分度为 0.1 个pH单位。
- 7.5 溶解氧仪：测量范围 $0\text{ mg/L}\sim 20\text{ mg/L}$ ，最小分度为 0.1 mg/L 。
- 7.6 盐度计：测量范围 $0\sim 80$ ，最小分度为 0.1 。
- 7.7 生物发光光度计：技术指标控制要求见附录C。
- 7.8 测试管：与生物发光光度计（7.7）配套，玻璃材质，圆柱形，具 2 mL 、 5 mL 两种规格，可通过固定盖形成套管，套管示意图参见附录A。
- 7.9 移液器： $10\text{ }\mu\text{L}\sim 100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}\sim 1000\text{ }\mu\text{L}$ 可调，配备相应量程的吸液嘴。
- 7.10 冰箱或冷库：具有 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下冷藏功能和 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻功能。
- 7.11 实验室常用器皿和设备。

8 样品

8.1 样品采集

- 8.1.1 地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水样品的采样频次、采样时间以及采样位置分别按HJ 91.2、HJ 164、HJ 91.1和GB 17378.3相关章节执行。
- 8.1.2 采样时，样品沿瓶壁缓慢倒入采样瓶（7.1），注意避免冲击产生气泡，直至样品在采样瓶中过量溢出，形成凸面，盖紧瓶盖。颠倒采样瓶，观察数秒，确保瓶内无气泡，如有气泡应重新采样。
- 8.1.3 宜在采样时，测定水温、pH、溶解氧、盐度等水质参数。

8.2 样品保存与运输

样品采集后，应立即置于冷藏箱（7.2）中， $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光保存和运输。到达实验室后， $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏（7.10）避光保存，并在采样后的48 h内开展测试。若不能在48 h内进行测试，宜采用聚乙烯、聚丙烯或聚四氟乙烯材质的塑料瓶保存和运输样品，到达实验室后，将样品混匀后按每 500 mL 容量盛装 $250\text{ mL}\sim 350\text{ mL}$ 的量分装，并立即置于冰箱或冷库（7.10）中， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻保存，保存期不超过2个月。

8.3 样品预处理

8.3.1 温度

冷冻保存的样品可在 $\leq 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中缓慢振荡解冻，或在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光条件下隔夜解冻。待样品完全解冻后，应尽快开展测试。测试开始前，将样品放置于设定的测试温

度条件（9.1.1）下约 1 h，按 HJ 1396 的要求测定样品温度，待温度达到设定要求后用于测试。

8.3.2 pH

8.3.2.1 通常不调节样品 pH 值。

8.3.2.2 若需排除样品 pH 的影响，按 HJ 1147 或 GB17378.4 方法测定样品 pH 值，当 pH <6.0 或 >8.0 时，使用氢氧化钠溶液（6.2.6）或盐酸溶液（6.2.7）调节样品 pH 值，地表水、地下水、生活污水、工业废水样品调节至 7.0 ± 0.2 ，海水样品调节至 7.5 ± 0.2 ，酸碱调节溶液的使用量应不超过样品体积的 5%。

注：pH 调节前、后的样品，均应开展测试。

8.3.3 溶解氧

8.3.3.1 通常不调节样品溶解氧浓度。

8.3.3.2 若需排除溶解氧的影响，按 HJ 506 方法测定样品的溶解氧浓度，当样品的溶解氧浓度 <3.0 mg/L 时，可采用缓慢搅拌的方式充氧，使样品溶解氧浓度 ≥ 3.0 mg/L。

注：溶解氧调节前、后的样品，均应开展测试。

8.3.4 盐度

8.3.4.1 地表水、地下水、生活污水、工业废水样品通常需要调节盐度，参照 GB 17378.4 方法测定样品盐度，当盐度 <30 时，用氯化钠（6.2.2）调节样品盐度至 30 ± 2 。

8.3.4.2 海水样品通常不调节盐度，按 GB 17378.4 方法测定样品盐度，当盐度 <30 时，用氯化钠（6.2.2）调节样品盐度至 30 ± 2 。

9 分析步骤

9.1 测试环境条件和仪器

9.1.1 将测试温度设置在 20 °C ~ 25 °C 之间，且同一批试样在测试过程中温度变化幅度 $\leq \pm 1$ °C。

9.1.2 打开生物发光光度计（7.7）电源，预热 15 min，调零，备用。

9.2 发光细菌准备

9.2.1 发光细菌冻干粉复苏

打开装有发光细菌冻干粉的包装瓶，按每 0.5 g 冻干粉 1 mL 的比例，用移液器（7.9）移取一定体积预冷的氯化钠溶液 I（6.2.8），并快速注入冻干粉瓶中，充分混匀形成复苏菌液。菌液应为乳白色均匀液体，静置后无絮凝沉淀，2 min 后在避光条件下肉眼可见微弱的蓝绿光。在 $4 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ 条件下，复苏约 30 min，备用，4 h 以内使用有效。

9.2.2 发光细菌测试液 I

按 1: 19 比例移取一定体积的复苏菌液（9.2.1）和氯化钠溶液 II（6.2.9），于一支干净的试管中混匀，形成发光细菌测试液 I，置于测试温度条件（9.1.1）下，备用。

注：例如，依次移取 100 μL 复苏菌液和 1900 μL 氯化钠溶液 II 于干净的试管中，混匀。

9.2.3 发光细菌测试液 II

按 1: 99 比例移取一定体积的复苏菌液（9.2.1）和氯化钠溶液 II（6.2.9），于一支干净的试管中混匀，形成发光细菌测试液 II，置于测试温度条件（9.1.1）下，备用。

注 1：例如，依次移取 100 μL 复苏菌液和 9.9 mL 氯化钠溶液 II 于干净的试管中，混匀。

注 2：市售冻干粉的复苏和测试液的准备也可按其说明书操作，但其测试液细胞密度应符合 6.1.3 要求。

9.3 发光抑制率测试

9.3.1 准备

以样品为试样，测定其发光抑制率，为氯化汞毒性当量浓度测试、LID 测试、 EC_{50} 测试提供参考。按空白对照、样品、阳性对照、阴性对照的顺序排列测试管（7.8），分别设置 2 个平行，测试管的排列方式可参见附录 D 图 D.1。

9.3.2 测定初始发光强度

依次移取 100 μL 发光细菌测试液 I（9.2.2）加入排列好的测试管（9.3.1）中，按加测试液的顺序依次将测试管放入生物发光光度计（7.7）检测舱中，测定初始发光强度（ I_0 ）。测试管之间加发光细菌测试液和测定初始发光强度的时间间隔宜保持一致，间隔时间为 5 s~20 s。

9.3.3 加样

对于非海水样品，以氯化钠溶液 II（6.2.9）作为空白对照和阴性对照，以参比物氯化汞溶液 II（6.2.14）或参比物硫酸锌溶液 II（6.2.18）作为阳性对照；对于海水样品，对应的空白对照、阳性对照和阴性对照见附录 E。按 9.3.2 的顺序，依次分别移取 900 μL 空白对照、样品（8.3）、阳性对照、阴性对照加入对应的测试管（9.3.2）中，混匀。加样后即开始计时，测试管之间加样的时间间隔与 9.3.2 保持一致。

9.3.4 测定反应终止发光强度

反应时间 $t = 15 \text{ min}$ 后，按 9.3.2 的顺序依次测定反应终止发光强度 I_t 。

9.3.5 发光抑制率计算

按 10.1 计算平均发光抑制率 \overline{H}_t ，并根据实际需要进一步开展氯化汞毒性当量浓度测试（9.4）、LID 测试（9.5）或 EC_{50} 测试（9.6）。

9.4 氯化汞毒性当量浓度测试

9.4.1 准备

根据 9.3.5 结果，当样品的平均发光抑制率满足 $0\% < \overline{H}_t < 100\%$ 时，可开展氯化汞毒性当量浓度测试。参见附录 F 要求配制系列浓度的氯化汞溶液。分别准备样品组和氯化汞溶液组的测试管（7.8），其中，样品组测试管按空白对照 I、样品、阴性对照顺序排列，氯化汞溶液组测试管按空白对照 II、系列浓度氯化汞溶液顺序排列，分别设置 2 个平行，测试管的排列方式可参见附录 D 图 D.2。

9.4.2 测定初始发光强度

依次移取 100 μL 发光细菌测试液 I（9.2.2）加入排列好的样品组测试管（9.4.1）中，再依次移取 500 μL 发光细菌测试液 II（9.2.3）加入排列好的氯化汞溶液组测试管（9.4.1）中，按加测试液的顺序依次将测试管放入生物发光光度计（7.7）检测舱中，测定初始发光强度（ I_0 ）。测试管之间加发光细菌测试液和测定初始发光强度的时间间隔宜保持一致，间隔时间为 5 s~20 s。

9.4.3 加样

对于非海水样品，以氯化钠溶液 II（6.2.9）作为空白对照和阴性对照；对于海水样品，对应的空白对照和阴性对照见附录 E。按 9.4.2 的顺序，依次分别移取 900 μL 空白对照 I、样品（8.3）、阴性对照加入样品组对应的测试管（9.4.2）中，混匀，再依次分别移取 500 μL 空白对照 II、系列浓度氯化汞溶液（9.4.1）加入氯化汞溶液组对应的测试管（9.4.2）中，混匀。加样后即开始计时，测试管之间加样的时间间隔与 9.4.2 保持一致。

9.4.4 测定反应终止发光强度

反应时间 $t = 15 \text{ min}$ 后，按 9.4.2 的顺序依次测定反应终止发光强度 I_t 。

9.5 LID 测试

9.5.1 样品稀释

根据 9.3.5 结果，当样品的平均发光抑制率 $\overline{H}_t < 20\%$ 时，则无需对样品进行稀释及测试，该样品的 LID 值为 1；当样品的平均发光抑制率 $\overline{H}_t \geq 20\%$ 时，将氯化钠溶液 II（6.2.9）、人工海水（附录 E）分别作为非海水样品、海水样品的稀释液，取一定量的样品加入对应的稀释液，分别配制稀释倍数为 2 倍和 3 倍的试样，按两个等比级数（2、4、8、16、32 等，以及 3、6、12、24 等）的稀释倍数组合逐级稀释，稀释操作示例参见附录 D 图 D.3。

9.5.2 准备

按空白对照、稀释系列试样、阳性对照、阴性对照的顺序排列测试管（7.8），分别设置 2 个平行，测试管的排列方式可参见附录 D 图 D.1。

9.5.3 测定初始发光强度

依次移取 500 μL 发光细菌测试液 II (9.2.3) 加入排列好的测试管 (9.5.2) 中, 按加测试液的顺序依次将测试管放入生物发光光度计 (7.7) 检测舱中, 测定初始发光强度 (I_0)。测试管之间加发光细菌测试液和测定初始发光强度的时间间隔宜保持一致, 间隔时间为 5 s~20 s。

9.5.4 加样

对于非海水样品, 以氯化钠溶液 II (6.2.9) 作为空白对照和阴性对照, 以参比物氯化汞溶液 I (6.2.13) 或参比物硫酸锌溶液 I (6.2.17) 作为阳性对照; 对于海水样品, 对应的空白对照、阳性对照和阴性对照见附录 E。按 9.5.3 的顺序, 依次分别移取 500 μL 空白对照、稀释系列试样 (9.5.1)、阳性对照、阴性对照加入对应的测试管 (9.5.3) 中, 混匀。加样后即开始计时, 测试管之间加样的时间间隔与 9.5.3 保持一致。

9.5.5 测定反应终止发光强度

反应时间 $t = 15 \text{ min}$ 后, 按 9.5.3 的顺序依次测定反应终止发光强度 I_t 。

9.6 EC_{50} 测试

9.6.1 限度试验

根据 9.3.5 结果, 当样品的平均发光抑制率 $\overline{H}_t \leq 50\%$ 时, 应开展限度试验。设置 6 个平行, 按 9.3 步骤测定样品的发光抑制率。若平均发光抑制率 $\overline{H}_t \leq 50\%$, 测试停止; 若平均发光抑制率 $\overline{H}_t > 50\%$, 应进一步开展预试验和正式试验。

9.6.2 预试验

当样品的平均发光抑制率 $\overline{H}_t > 50\%$ 时, 以逐级稀释倍数 (即等比数列的公比) 为 10 配制 ≥ 3 个连续浓度的试样 (如体积分数为 100%、10%、1%、0.1%、0.01% 等), 按 9.3.1~9.3.4 的要求进行测试, 以确定发光抑制率 100% (或最大发光抑制率) ~1% 所对应的试样浓度范围 (体积分数)。

9.6.3 正式试验

根据预试验确定的发光抑制率 100% (或最大发光抑制率) ~1% 所对应的试样浓度范围, 在此范围内按一定稀释倍数 (一般 ≤ 2) 对样品进行逐级稀释, 应至少选择 5 个等比系列浓度的试样进行正式试验。系列浓度试样中, 应至少包含 $50\% < \overline{H}_t \leq 90\%$ 和 $10\% \leq \overline{H}_t < 50\%$ 的试样各 1 个。按 9.3.1~9.3.4 的要求进行试样测试。

10 结果计算与表示

10.1 发光抑制率的计算

根据空白对照的发光强度变化，按公式（1）计算校正因子 f_{kt} 。

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_{k0}} \quad (1)$$

式中： f_{kt} ——经过反应时间 t 后，空白对照的校正因子；

I_{kt} ——经过反应时间 t 后，空白对照的反应终止发光强度；

I_{k0} ——空白对照的初始发光强度。

根据校正因子 f_{kt} 的平行测定结果，按算术平均计算平均校正因子 $\overline{f_{kt}}$ ，结果保留至小数点后 2 位。

按公式（2）计算试样、阳性对照、阴性对照、参比物溶液测试的初始发光强度 I_0 的校正正值 I_{ct} ：

$$I_{ct} = I_0 \times \overline{f_{kt}} \quad (2)$$

式中： I_{ct} ——经校正因子校正后的初始发光强度；

I_0 ——未经校正的初始发光强度。

按公式（3）和公式（4）分别计算试样、阳性对照、阴性对照、参比物溶液测试的相对发光率和发光抑制率：

$$T_t = \frac{I_t}{I_{ct}} \times 100\% \quad (3)$$

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} \times 100\% \quad (4)$$

式中： T_t ——经过反应时间 t 后的相对发光率；

H_t ——经过反应时间 t 后的发光抑制率；

I_t ——经过反应时间 t 后的反应终止发光强度。

根据相对发光率 T_t 和发光抑制率 H_t 的平行测定结果，按算术平均计算平均相对发光率 $\overline{T_t}$ 和平均发光抑制率 $\overline{H_t}$ ，结果最多保留 3 位有效数字。

10.2 氯化汞毒性当量浓度的计算

按公式（5）和（6）开展参比物氯化汞溶液浓度与其发光抑制效应的线性回归分析：

$$\Gamma_t = \frac{\overline{H_t}}{\overline{T_t}} \quad (5)$$

式中： Γ_t ——经过反应时间 t 后，平均发光抑制率与平均相对发光率的比值。

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + a \quad (6)$$

式中： c_t ——参比物氯化汞溶液浓度，mg/L；

b ——斜率，计算方法参见附录 G；

a ——截距，计算方法参见附录 G。

注：当 $\Gamma_t=1.00$ 时的 c_t 值即为氯化汞在反应时间 t 条件下的 EC_{50} 值，对应的 95%置信区间计算方法参见附录 G，结果保留 2 位有效数字。

参见附录 G，计算 $\lg \Gamma_t$ 与 $\lg c_t$ 的相关系数 r ，根据拟合数据点数量 n ，查显著性检验表，若 $P \leq 0.01$ 且氯化汞的 15 min $EC_{50} = 0.10 \text{ mg/L} \pm 0.02 \text{ mg/L}$ ，则结果有效，否则应检查测定和数据统计过程。

当 $0\% < \overline{H_{t\text{样品}}} \text{ (或 } \overline{T_{t\text{样品}}}) < 100\%$ 时，按公式 (5) 计算样品的 $\Gamma_{t\text{样品}}$ ，按公式 (7) 计算样品的氯化汞毒性当量浓度，结果保留 2 位有效数字，计算示例参见附录 H。

$$c_t = 10^{b \lg \Gamma_{t\text{样品}} + a} \quad (7)$$

当 $\overline{H_{t\text{样品}}} \leq 0\%$ (或 $\overline{T_{t\text{样品}}} \geq 100\%$) 或 $\overline{H_{t\text{样品}}} = 100\%$ (或 $\overline{T_{t\text{样品}}} = 0\%$) 时，无法计算氯化汞毒性当量浓度。

10.3 LID 的确定

$\overline{H}_t < 20\%$ 时的最低稀释倍数，即为最低无效应稀释倍数 LID，示例参见附录 H。

10.4 EC₅₀ 的计算

10.4.1 EC₅₀ 的计算可按公式（5）和（6）开展样品体积分数与其发光抑制效应的线性回归分析，根据线性相关系数 r 及拟合数据点数量 n ，参见附录 G 查显著性检验表，若 $P \leq 0.05$ ，则结果有效，否则应检查测定和数据统计过程。当 $r_t = 1.00$ 时的 c_t 值即为在反应时间 t 条件下的 EC₅₀ 值，对应的 95% 置信区间计算方法参见附录 G，以样品的体积分数表示，结果最多保留 3 位有效数字，计算示例参见附录 H。也可采用概率单位分析、逻辑斯蒂分析等非线性回归方法计算。

10.4.2 若数据不充分，无法计算或不需要计算 EC₅₀ 时，应报告最大发光抑制率对应的最低浓度或发光抑制率 $< 20\%$ 对应的最高浓度，以样品的体积分数表示，结果最多保留 3 位有效数字。

11 有效性、敏感性与精密度

11.1 有效性及敏感性

11.1.1 6 家实验室对参比物氯化汞溶液进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，阳性对照（氯化汞终浓度 0.10 mg/L）的发光抑制率范围为 35.3%~79.9%，满足 12.2 要求；参比物氯化汞的 15 min EC₅₀ 在 0.082 mg/L~0.12 mg/L 范围内，满足 12.5 要求。

11.1.2 6 家实验室对参比物硫酸锌溶液进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，阳性对照（Zn²⁺终浓度 1.4 mg/L）的发光抑制率范围为 35.8%~60.9%，满足 12.2 要求。

11.1.3 6 家实验室对阴性对照（6.2.9）进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，发光抑制率为 -9.5%~9.3%，满足 12.3 要求。

11.2 精密度

11.2.1 6 家实验室分别对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水（综合废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，相对发光率分别为 84.5%~105%、80.1%~108%、80.2%~106%、58.7%~79.8%、51.7%~78.6%，实验室内相对标准偏差分别为 2.1%~6.6%、2.7%~11%、2.0%~6.3%、4.6%~9.2%、1.9%~15%，实验室间相对标准偏差分别为 5.2%、5.3%、6.2%、6.2%、7.5%，重复性限分别为 12%、17%、14%、13%、16%，再现性限分别为 17%、21%、20%、17%、19%。

11.2.2 6 家实验室分别对地表水、地下水、海水、生活污水、工业废水（制药废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定 6 次，LID 分别为 1、1、1、2~4、32~64，实验室内相对标准偏差分别为 0%、0%、0%、0%~31%、13%~22%，实验室间相对标准偏差分别为 0%、0%、0%、17%、13%，重复性限分别为 0、0、0、1.6、22，再现性限分别为

0、0、0、1.9、26。

11.2.3 6家实验室分别对工业废水（综合废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，氯化汞毒性当量浓度为0.083 mg/L~0.10 mg/L，实验室内相对标准偏差为0%~4.9%，实验室间相对标准偏差分别为6.2%，重复性限为0.0065 mg/L，再现性限为0.017 mg/L。

11.2.4 6家实验室分别对工业废水（制药废水）进行了发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，EC₅₀为1.4~5.9%，实验室内相对标准偏差为6.4%~40%，实验室间相对标准偏差为47%，重复性限为2.1%，再现性限为4.4%。

11.2.5 6家实验室分别对 $\rho = 0.08$ mg/L、 $\rho = 0.10$ mg/L、 $\rho = 0.12$ mg/L的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，发光抑制率分别为21.8%~43.5%、35.3%~79.9%、85.1%~99.5%，实验室内相对标准偏差分别为4.3%~16%、3.5%~11%、0.26%~3.8%，实验室间相对标准偏差分别为13%、27%、2.9%，重复性限分别为11%、9.0%、4.6%，再现性限分别为16%、40%、9.0%。

11.2.6 6家实验室分别对 $\rho = 0.08$ mg/L、 $\rho = 0.10$ mg/L、 $\rho = 0.12$ mg/L的自制参比物氯化汞模拟试样进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，LID分别为2、2、2，实验室内相对标准偏差分别为0%、0%、0%，实验室间相对标准偏差分别为0%、0%、0%，重复性限分别为0、0、0，再现性限分别为0、0、0。

11.2.7 6家实验室分别对参比物氯化汞溶液和硫酸锌溶液进行发光细菌急性毒性的测定，每个试样平行测定6次，参比物氯化汞15min EC₅₀为0.082 mg/L~0.12 mg/L，实验室内相对标准偏差为6.3%~14%，实验室间相对标准偏差为2.8%，重复性限为0.025 mg/L，再现性限为0.024 mg/L；参比物硫酸锌（以Zn²⁺计）15min EC₅₀为1.0 mg/L~2.0 mg/L，实验室内相对标准偏差为5.0%~18%，实验室间相对标准偏差为21%，重复性限为0.48 mg/L，再现性限为0.91 mg/L。

12 质量保证和质量控制

12.1 校正因子应符合 $0.6 \leq \overline{f_{kt}} \leq 1.8$ ，且平行测定结果的相对偏差应 $\leq 15\%$ 。

12.2 阳性对照（氯化汞终浓度0.10 mg/L或Zn²⁺终浓度1.4 mg/L）的发光抑制率应符合 $20\% \leq H_t \leq 80\%$ 。

12.3 阴性对照的发光抑制率应符合 $-10\% \leq H_t \leq 10\%$ 。

12.4 相对发光率或发光抑制率平行测定结果的相对偏差应 $\leq 15\%$ 。

12.5 氯化汞毒性当量浓度测试中，参比物氯化汞的15 min EC₅₀应在0.08 mg/L~0.12 mg/L范围内。

13 测试报告

13.1 样品的类型、来源、理化特性（色、嗅、pH值、溶解氧等）、采样方法及采样时间、保存方法及保存时间；

- 13.2 样品干扰消除（色度、颗粒物）及前处理（温度、pH 值、溶解氧、盐度调节）方法；
- 13.3 受试发光细菌名称、来源、批号，冻干粉复苏及测试液准备方法；
- 13.4 仪器设备型号、状态以及温控等测试条件；
- 13.5 测试结果（发光抑制率或相对发光率、氯化汞毒性当量浓度、LID 或 EC₅₀ 等）及计算方法；
- 13.6 质量保证和质量控制要求的符合性；
- 13.7 其他对测试过程和结果具有重要影响的信息。

附录 A

(资料性附录)

有色试样的测定

A.1 有色试样干扰校正测定

A.1.1 将生物发光光度计 (7.7) 检测舱调至套管测试模式。

A.1.2 空白对照准备。分别取 2 mL 和 5 mL 测试管 (7.8) 各一支, 将 2 mL 测试管放入 5 mL 测试管之中, 形成内外套管。使用移液器 (7.9) 往内管中加入 900 μ L 或 500 μ L 氯化钠溶液 II (6.2.9), 并往外管内添加适量氯化钠溶液 II (6.2.9), 使外管的液面与内管含 1 mL 体积溶液时的液面齐平, 用固定盖固定。设置 2 个平行。

A.1.3 有色样品准备。取 5 mL 测试管 (7.8) 一支, 加入与空白对照套管的外管 (A.1.2) 中氯化钠溶液 II 相同体积的有色样品。设置 2 个平行。

A.1.4 使用移液器 (7.9) 往 2 个平行空白对照套管的内管中依次加入 100 μ L 发光细菌测试液 I (9.2.2) 或 500 μ L 发光细菌测试液 II (9.2.3), 混匀, 立即计时, 待反应 15 min 后, 将套管依次放入生物发光光度计 (7.7) 检测舱中, 测定发光强度。随即将空白对照套管的内管依次分别取出, 使用干净的吸水纸擦干外壁, 放入有色样品管 (A.1.3) 中, 用固定盖固定, 形成有色样品套管, 并将套管依次放入生物发光光度计 (7.7) 检测舱测定发光强度。

A.1.5 若需要将样品配成不同稀释倍数的系列试样, 则每个试样均应按 A.1.2~A.1.4 方法分别开展干扰校正测定。有色试样干扰校正示意图见图 A.1。

注: 校正测定中发光细菌测试液与氯化钠溶液的规格和体积应与 9.3~9.6 中对应测试步骤保持一致。

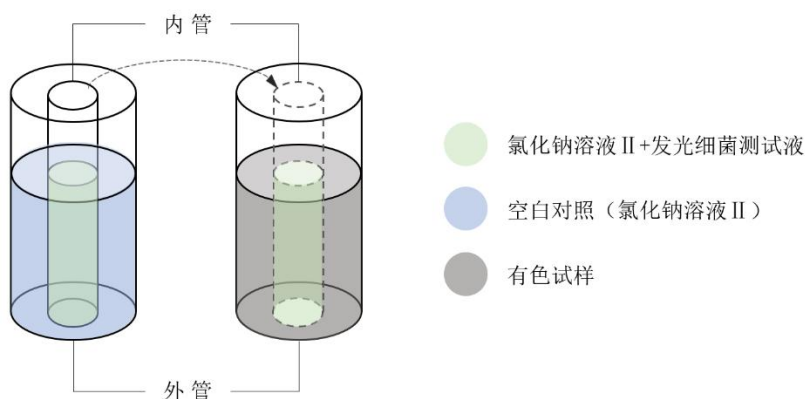


图 A.1 有色试样干扰校正示意图

A.2 有色试样干扰校正计算

按公式 (A.1) ~ (A.3) 计算有色试样对受试发光细菌发光强度的干扰校正值:

$$\Delta L_i = \frac{\Delta L_{i1} + \Delta L_{i2}}{2} \quad (\text{A.1})$$

$$\Delta L_{i1} = L_i - L_{i1} \quad (\text{A.2})$$

$$\Delta L_{i2} = L_2 - L_{i2} \quad (\text{A.3})$$

式中： ΔL_i ——有色试样 i 对受试发光细菌发光强度干扰的平均校正值；

ΔL_{i1} ——有色试样 i 对受试发光细菌发光强度干扰的校正值；

ΔL_{i2} —— ΔL_{i1} 的平行测定结果；

L_1 ——受试发光细菌在空白对照套管中测得的发光强度；

L_2 —— L_1 的平行测定结果；

L_{i1} ——与 L_1 对应的受试发光细菌在有色试样套管中测得的发光强度；

L_{i2} —— L_{i1} 的平行测定结果，与 L_2 对应的受试发光细菌在有色试样套管中测得的发光强度。

A. 3 有色试样干扰校正值的使用

A. 3. 1 根据测试目的需要，将有色试样按 9.3~9.6 相应的步骤开展测试，并按 10.1 公式(2) 计算初始发光强度 I_{ct} 。

A. 3. 2 将初始发光强度 I_{ct} 减去对应有色试样的干扰校正值 ΔL_i ，得到有色试样经校正后的初始发光强度 I'_{ct} ，即 $I'_{ct} = I_{ct} - \Delta L_i$ 。

A. 3. 3 以 I'_{ct} 代替 I_{ct} ，其余根据 A.3.1 的测定结果，按 10.1~10.4 计算。

附录 B

(资料性附录)

发光细菌菌液细胞密度计数方法

稀释涂布平皿计数法是微生物数量测定的常用方法。将不同稀释倍数的发光细菌菌液样品涂布接种在固体培养基上，在特定的物理条件下培养，单细胞会生长繁殖成肉眼可见的菌落，从而计算出原菌液中的细胞密度。

B.1 试剂

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂，实验用水为蒸馏水。

B.1.1 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)。

B.1.2 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。

B.1.3 酵母浸出汁。

B.1.4 胰蛋白胨。

B.1.5 甘油 ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)。

B.1.6 琼脂。

B.1.7 明亮发光杆菌培养基。

分别称取 30 g 氯化钠 (6.2.2)、5 g 磷酸氢二钠 (B.1.1)、1 g 磷酸二氢钾 (B.1.2)、5 g 酵母浸出汁 (B.1.3)、5 g 胰蛋白胨 (B.1.4)、7 g 甘油 (B.1.5)、17 g 琼脂 (B.1.6)，溶解于 1000 mL 水中，分装于玻璃容器中，经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，储存于冷暗处备用。在 5 °C ± 3 °C 冷藏避光条件下，保存时间不超过 1 个月。也可购买含上述成分的市售成品，按要求保存。

B.1.8 无菌复苏液。

取氯化钠溶液 I (6.2.8) 100 mL，经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

B.1.9 无菌稀释液。

取氯化钠溶液 II (6.2.9) 100 mL，经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

B.2 仪器设备

B.2.1 高压蒸汽灭菌器。

B.2.2 恒温培养箱：温度可调，温度控制偏差 ≤ 1 °C。

B.2.3 无菌涂布棒。

B.2.4 无菌平皿。

B.2.5 实验室常用玻璃器皿：移液管、试管等，使用前按无菌操作要求包扎，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.3 分析步骤

B.3.1 平板制备：将灭菌后的培养基（B.1.7）冷却至 50℃～55℃，倒入无菌平皿（B.2.4）中，每个平皿约 25 mL。待培养基冷却凝固后，翻转平皿，使底面向上，放在室温无污染处备用。

B.3.2 冻干粉复苏：以无菌操作方式，按每 0.5 g 冻干粉 1 mL 的比例，往受试发光细菌冻干粉瓶内加入一定体积预冷的无菌复苏液（B.1.8）。用力振摇 20 次～25 次，使可能存在的细菌凝团分散。

B.3.3 稀释：以无菌操作方式移取 100 μL 复苏后的菌液（B.3.2），加入盛有 9.9 mL 无菌复苏液（B.1.9）的试管中，混匀成 1:100 稀释菌液。取 1:100 稀释菌液 1 mL 加入盛有 9 mL 无菌稀释液的试管中，混匀成 1:1000 稀释菌液。按同法依次稀释成 1:10000、1:100000 稀释菌液。移取不同浓度的稀释菌液时，每次须更换移液管。

B.3.4 接种：以无菌操作方式分别移取 100 μL 充分混匀的稀释菌液（B.3.3），分别滴加到制备好的平板培养基（B.3.1）上，用无菌涂布棒（B.2.3）将菌液均匀涂开，静置约 15 min，让菌液渗入培养基中，翻转平皿，使底面向上，在 23℃±1℃条件下，于恒温培养箱（B.2.2）中培养 48 h±2 h。每个菌液浓度做 2 个平皿。移取和涂布不同稀释倍数的菌液时，每次须更换移液管和涂布棒。

B.3.5 用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿上不得有菌落生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

B.4 平皿计数

B.4.1 优先选择平均菌落数在 30～300 的平皿在避光条件下进行计数，若只有一个稀释倍数的平均菌落数符合此范围，以该平均菌落数带入公式（B.1）计算细胞密度；若有两个稀释倍数平均菌落数在 30～300 之间，分别带入公式（B.1）计算，当二者的结果比值<2 时，以两者的平均数作为细胞密度，当≥2 时，以稀释倍数较小的计算结果作为细胞密度。

B.4.2 若所有稀释倍数的平均菌落数均大于 300，以稀释倍数最大的平均菌落数带入公式（B.1）计算细胞密度。

B.4.3 若所有稀释倍数的平均菌落数均小于 30，以稀释倍数最小的平均菌落数带入公式（B.1）计算细胞密度。

B.4.4 若所有稀释倍数的平均菌落数均不在 30～300 之间，以最接近 300 或 30 的平均菌落数带入公式（B.1）计算细胞密度。

B.5 细胞密度计算

按公式（B.1）计算 1 mL 1:100 稀释菌液（B.3.3）的细胞密度：

$$N = \frac{n}{V} \times d \quad (\text{B.1})$$

式中： N ——1:100 稀释菌液中的细胞密度，个/mL；

n ——平皿计数结果，个；

V ——接种体积，mL；

d ——与平皿计数结果对应的稀释倍数。

附 录 C

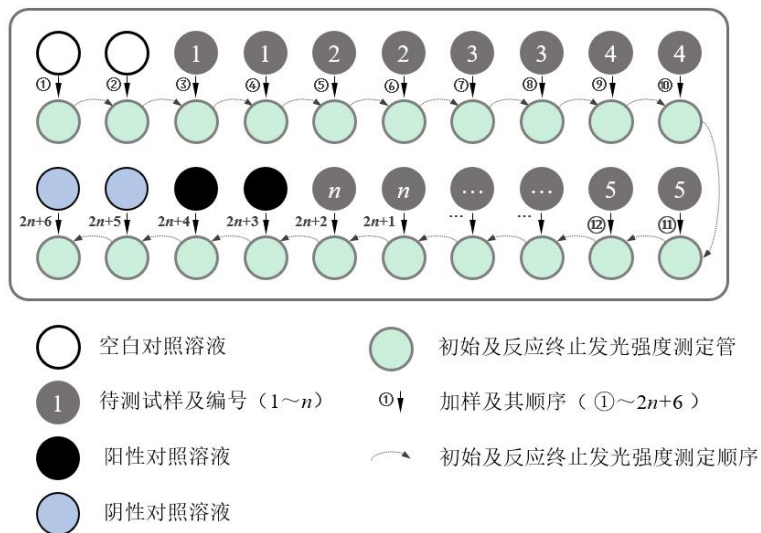
（规范性附录）

生物发光光度计技术指标控制要求

- C.1 发光有效测定范围应覆盖波长 420 nm~670 nm 的可见光区间。
- C.2 具有温度控制功能，包括受试发光细菌控温培养模块（4 °C±3 °C）和样品测试控温反应模块（20 °C~25 °C单点温度可控，温度控制偏差≤1 °C）；若不具备温控功能，应另外配备符合控温条件的仪器设备，如：使用具备相应控温条件的设备替代控温培养模块功能，并将生物发光光度计放置在具备相应控温条件的实验室内开展试验。
- C.3 按 JJF 2203 方法测定的背景噪声值较低，对试样的相对发光率、发光抑制率等测定结果的影响可忽略不计。具备调零功能，通过调零操作后的背景噪声值为 0；或背景噪声值相对于发光细菌测试液（9.2）发光强度的百分比值≤0.1%。
- C.4 按 JJF 2203 方法测定的发光强度测量重复性≤5%。
- C.5 分析有色样品须具备套管测试功能。

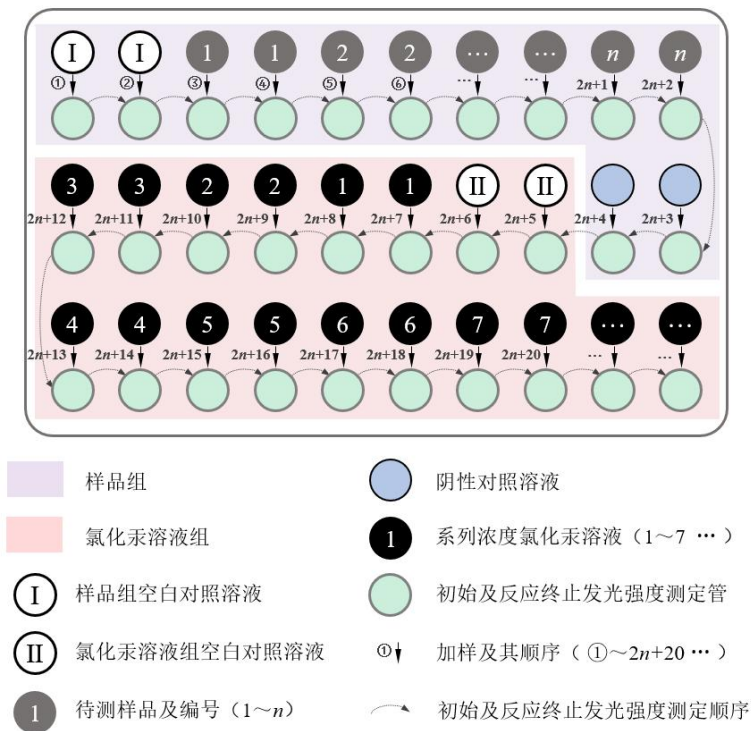
附录 D
(资料性附录)

测试管排列与测定及 LID 测试样品稀释示例



注：该示例适用于发光抑制率测试、LID 测试及 EC₅₀ 测试。

图 D.1 测试管排列与测定示例一（俯视图）



注：该示例适用于氯化汞毒性当量浓度测试。

图 D.2 测试管排列与测定示例二（俯视图）

混匀后，按箭头方向从前一个测试管中移取 750 μL 加入后一个测试管，并依次向后传递

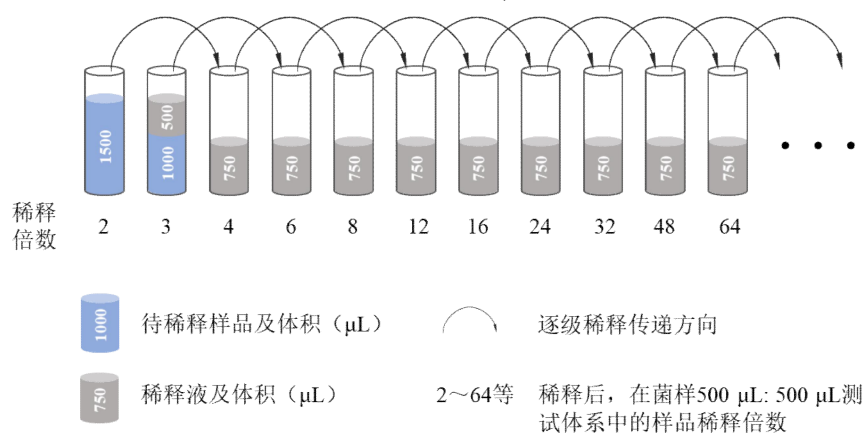


图 D. 3 LID 测试样品逐级稀释示例（正视图，以 1500 μL 试样为例）

附 录 E
(规范性附录)
海水试样的测定

E.1 概述

明亮发光杆菌 T3 为海洋菌，按“9 分析步骤”测试海水试样的急性毒性可能产生刺激发光作用，影响测定结果。因此，需要对海水试样测试过程进行适当校正。

E.2 试剂

将表 D.1 中的成分按比例溶解于水中，配制成一定体积的人工海水，其电导率、盐度、pH 值等理化特性见表 D.1。亦可购买市售人工海水，按要求保存。

表 D.1 人工海水主要成分及其理化特性

主要成分及其理化特性指标		成分浓度及理化特性
主要成分 (g/L)	NaCl	22.0
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	9.7
	Na ₂ SO ₄	3.7
	CaCl ₂	1.0
	KCl	0.65
	NaHCO ₃	0.20
	H ₃ BO ₃	0.023
理化特性指标 (20 °C)	电导率 (mS/cm)	47.0 ± 1.0
	盐度	31 ± 1
	pH 值	7.5 ± 0.2

E.3 海水试样测试

将人工海水 (D.2) 替代氯化钠溶液 II (6.2.9)，作为海水试样测试的空白对照和阴性对照，并作为参比物溶液的溶剂和试样的稀释液，配制海水试样测试用的参比物溶液和系列稀释试样。其余测试过程与非海水试样一致，按 9.2 准备发光细菌测试液，按 9.3~9.6 开展测试；有色海水参见附录 A 进行校正测定。

附录 F

（资料性附录）

系列浓度氯化汞溶液配制方案

为建立参比物氯化汞溶液浓度与其发光抑制效应关系，需要配制不少于 7 个系列浓度的氯化汞溶液。对于非海水样品测试，可按表 F.1 分别移取一定体积的氯化汞工作液（6.2.12），用氯化钠溶液 II（6.2.9）稀释并定容至 100 mL，临用现配。对于海水样品测试，使用人工海水（附录 E）代替氯化钠溶液 II（6.2.9），其余步骤同非海水样品测试中氯化汞溶液配制方法。

表 F.1 系列浓度氯化汞溶液配制

氯化汞工作液移取体积 (mL)	氯化汞溶液系列浓度 (mg/L)	在菌样 500 μ L: 500 μ L 测试体系中 氯化汞终浓度 (mg/L)
2	0.04	0.02
4	0.08	0.04
6	0.12	0.06
8	0.16	0.08
10	0.20	0.10
12	0.24	0.12
14	0.28	0.14
16	0.32	0.16
18	0.36	0.18
20	0.40	0.20
22	0.44	0.22
24	0.48	0.24

附 录 G

（资料性附录）

线性回归分析的参数计算

试样（或参比物溶液）浓度与其发光抑制效应关系线性回归方程的斜率 b 按公式（G.1）计算：

$$b = \frac{\sum (\lg \Gamma_i - \overline{\lg \Gamma_i})(\lg c_i - \overline{\lg c_i})}{\sum (\lg \Gamma_i - \overline{\lg \Gamma_i})^2} \quad (\text{G.1})$$

式中： $\overline{\lg \Gamma_i}$ —— $\lg \Gamma_i$ 的算术均值；

$\overline{\lg c_i}$ —— $\lg c_i$ 的算术均值。

回归方程的截距 a 按公式（G.2）计算：

$$a = \overline{\lg c_i} - b \overline{\lg \Gamma_i} \quad (\text{G.2})$$

线性相关系数 r 按公式（G.3）计算：

$$r = \frac{\sum (\lg \Gamma_i - \overline{\lg \Gamma_i})(\lg c_i - \overline{\lg c_i})}{\sqrt{\sum (\lg \Gamma_i - \overline{\lg \Gamma_i})^2 \sum (\lg c_i - \overline{\lg c_i})^2}} \quad (\text{G.3})$$

线性相关系数 r 显著性检验表见表 G.1。

表 G.1 相关系数检验表

$n-2$	$P \leq 0.05$ 时 $ r $ 的临界值 (\geq)	$P \leq 0.01$ 时 $ r $ 的临界值 (\geq)
1	0.997	1.000
2	0.950	0.990
3	0.878	0.959
4	0.811	0.917
5	0.754	0.874
6	0.707	0.834
7	0.666	0.798
8	0.632	0.765
9	0.602	0.735
10	0.576	0.708
11	0.553	0.684
12	0.532	0.661
13	0.514	0.641
14	0.497	0.623
15	0.482	0.606

$\lg EC_{50}$ 的标准误差 ($SE_{\lg EC_{50}}$) 按公式 (G.4) 计算:

$$SE_{\lg EC_{50}} = \sqrt{\frac{\sum (\lg c_i - \widehat{\lg c_i})^2}{n-2}} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(-\lg \Gamma_i)^2}{\sum (\lg \Gamma_i - \overline{\lg \Gamma_i})^2}} \quad (G.4)$$

式中: $\widehat{\lg c_i}$ ——基于线性回归方程及 $\lg \Gamma_i$ 测试值计算得到的预测值;

n ——线性回归分析的拟合数据点数量。

EC_{50} 的 95% 置信区间 (95%CI) 按公式 (G.5) 计算:

$$95\%CI = 10^{a \pm t_{0.025, n-2} \times SE_{\lg EC_{50}}} \quad (G.5)$$

式中: $t_{0.025, n-2}$ ——置信度 95% ($\alpha=0.05$) 及自由度 $n-2$ 时的临界值, 查表 G.2。

表 G.2 t 分布表

$n-2$	$t_{0.025}$	$n-2$	$t_{0.025}$
1	12.7062	9	2.2622
2	4.3027	10	2.2281
3	3.1824	11	2.2010
4	2.7764	12	2.1788
5	2.5706	13	2.1604
6	2.4469	14	2.1448
7	2.3646	15	2.1314
8	2.3060	16	2.1199

此外, 也可使用统计软件等商业化工具, 直接计算线性回归分析的相关参数。

附 录 H
(资料性附录)
测定结果计算示例

H.1 氯化汞毒性当量浓度计算示例

当 $0\% < \overline{H}_t < 100\%$ 时, 可使用氯化汞毒性当量浓度表征待测试样的水质发光细菌急性毒性, 计算示例见表 H.1, 试样 1# 和试样 2# 的氯化汞毒性当量浓度分别为 0.11 mg/L 和 0.081 mg/L。

表 H.1 氯化汞毒性当量浓度测试结果计算示例

氯化汞毒性当量浓度测试		\overline{H}_{15}	Γ_{15}	参比物剂量效应 线性回归分析	试样的氯化汞毒 性当量浓度 (mg/L)
实际样品	试样 1#	71.3%	2.484	/	0.11
	试样 2#	35.0%	0.538	/	0.081
参比物氯化 汞溶液 (mg/L)	0.04	4.0%	0.042	$\lg c_{15} = 0.218 \times \lg \Gamma_{15} - 1.031$ $r = 0.993$	/
	0.06	11.2%	0.126		/
	0.08	33.8%	0.511		/
	0.1	60.8%	1.551		/
	0.12	79.8%	3.950		/
	0.14	83.1%	4.917		/
	0.16	98.1%	51.632		/
阴性对照 (氯化钠溶液 30 g/L)		1.5%	/	/	/
注 1: 空白对照的 $\overline{f}_h = 0.83$ 。 注 2: 取 \overline{H}_{15} 介于 10%~90% 的结果开展参比物氯化汞浓度与发光抑制效应线性回归分析, $r = 0.993 > r_{0.01(3)} = 0.959$, 因此 $P < 0.01$; 参比物氯化汞的 15 min $EC_{50} = 0.093$ mg/L, 95%置信区间为 0.089 mg/L~0.097 mg/L。					

H.2 LID 确定示例

以 LID 表征水质发光细菌急性毒性时, 平均发光抑制率 $\overline{H}_t < 20\%$ 时的最低稀释倍数, 即为最低无效应稀释倍数 LID, 测试结果示例见表 H.2。示例中, 稀释倍数为 8 时, \overline{H}_{15} 为 22.1%, 稀释倍数为 12 时, \overline{H}_{15} 为 15.2%, 即该试样的 LID 为 12。

表 H.2 LID 测试结果示例

LID 测试		\overline{H}_{15}
稀释系列试样 (稀释倍数 D)	$D = 1$	100%
	$D = 2$	71.3%
	$D = 3$	53.2%
	$D = 4$	40.6%
	$D = 6$	27.4%
	$D = 8$	22.1%
	$D = 12$	15.2%
	$D = 16$	8.3%
	$D = 24$	1.9%
阳性对照 (氯化汞终浓度 0.01 mg/L)		55.5%
阴性对照 (氯化钠溶液 30 g/L)		1.5%
注: 空白对照的 $\overline{f}_{kt} = 0.90$ 。		

H.3 EC₅₀ 计算示例

当样品的 $\overline{H}_i > 50\%$ 时, 可使用 EC₅₀ 表征待测样品的水质发光细菌急性毒性, 计算示例见表 H.3, 该样品的 15 min EC₅₀ 为 14.4%, 95% 置信区间为 10.9%~19.0%。

表 H.3 EC₅₀ 测试结果计算示例

EC ₅₀ 测试		\overline{H}_{15}	Γ_{15}	试样剂量效应 线性回归分析	样品的 EC ₅₀ 及 95% 置信区间
稀释系列试样 (以体积分数计)	90%	96.3%	26.027	$\lg c_{15} = 0.632 \times \lg \Gamma_{15} - 0.841$ $r = 0.985$	EC ₅₀ : 14.4% 95%CI : 10.9% ~ 19.0%
	50%	80.5%	4.128		
	25%	65.0%	1.857		
	12.5%	49.8%	0.992		
	6.25%	24.7%	0.328		
	3.125%	8.2%	0.089		
阳性对照 (氯化汞终浓度 0.01 mg/L)		48.6%	/	/	/
阴性对照 (氯化钠溶液 30 g/L)		0.9%	/	/	/
注 1: 空白对照的 $\overline{f}_{kt} = 0.80$ 。					
注 2: 开展样品体积分数与发光抑制效应线性回归分析, $r = 0.985 > r_{0.01(4)} = 0.917$, 因此 $P < 0.01$ 。					