# 前　言

船舶散装液体危害性评价规范系根据 MARPOL 73/78 附则Ⅱ的要求，为船舶散装运输的液体化学品的污染分类而进行的污染危害性评价和污染分类的方法，其危害评价和分类的原则和内容系根据附则Ⅱ中有害液体物质分类准则（附则Ⅱ之附录 1）以及海洋污染科学专家组关于船运有害物质危害性评价的原则确定。评价内容包括：1. 水生生物积累性试验；（即本标准）；2. 水生生物沾染试验；3. 水生生物急性毒性试验；4. 哺乳动物毒性试验；5. 休息环境舒适性影响；6. 分类程序和方法。鉴于导则中危害性 C（经口急性毒性）及 D（皮肤接触和吸入毒性）均为哺乳动物试验内容，故合为一个分标准；另外，环境舒适性的评价系根据物质对人的毒性、刺激性以及由其理化特性决定的对环境影响的持久性等综合评价，无具体试验方法，所以不单列分标准，而并入评价程序和分类中。

本标准由中华人民共和国交通部提出。

本标准起草单位：交通部水运科学研究所负责起草。

本标准起草人：张东宝、张毅、张秀芝。

中华人民共和国国家标准

# 船舶散装运输液体化学品危害性评价规范 水生生物积累性试验方法

GB/T 16310.2—1996

**Specification on evaluation methods of hazards of liquid chemicals transported in bulk by shipping—Bioaccumulation testing method for aquatic organism**

## 1 范围

本标准规定了在确定的试验条件下测定化学品在斑马鱼中积累特性的方法。

本标准适用于船舶散装运输液体化学品的积累特性的测定。

## 2 引用标准

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 13267—91 水质 淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法

MARPOL 73/78 附则Ⅱ 控制散装有毒液体物质污染规则

## 3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 生物浓缩常数 *BCF* biological concentration factor

稳态下，试验鱼体中的试验物质浓度($C_f$)与水环境试验物质浓度($C_w$)之比。

3.2 吸收 uptake

试验鱼从水中摄取试验物质。

3.3 释放 elimination

积累了一定量化学品的试验鱼被投放至清洁环境后，其吸收的试验物质因代谢而逐渐排出体外的过程。

3.4 稳态 steady-state

在一定的试验浓度下，鱼体从水中吸收及向水中释放试验物质的量相等的状态。

3.5 半衰期 $\gamma$ depuration half-life

试验物质被生物体排出一半量所需时间。

3.6 初始残留量 *Ro* original remains

释放试验开始时，试验物质在鱼体内的含量。

3.7 液体化学品 liquid chemicals

系指那些在温度为 37.8℃时蒸汽压力不超过 2.8 kPa/cm² 的化学品。

国家技术监督局1996-05-16批准 1996-12-01实施

## 4 原理

在确定的试验条件下，通过2～4周的吸收试验及其后的释放试验，测定化学品在鱼体内的生物浓缩常数和生物半衰期，由此评价化学品的生物积累性。

## 5 试验生物和试验溶液的配制

### 5.1 试验生物

试验鱼种是斑马担尼鱼(真骨鱼总目、鲤科)[Brachydanio rerio Hamiltun-Buchanan(Teleosteicyprinidue)]。试验鱼体长30±5 mm，体重0.3±0.1 g，选自同一驯养池中来源相同的鱼。试验前该鱼群应在与试验条件相同的环境条件下，在溶解氧充足的水中至少驯养两周。试验前24 h停止喂食，每天清除粪便及食物残渣。驯养期间死亡率不超过5%，否则，该批鱼不得用作试验鱼。

试验鱼应无明显的疾病和肉眼可见的畸型。试验前两周内不应对其做疾病处理。

### 5.2 试验稀释水

将自来水自然曝气三天或用充气泵曝气1 h，使溶解氧达到饱和值，氯基本除尽。pH值7.8±0.5。

### 5.3 制备试验物质储备液

配制试验物质储备液所用试剂为分析纯，将已知量的试验物质溶于一定体积的稀释水、去离子水或蒸馏水中。储备液应当天配制。对于化学性质较稳定的物质，可配制供两天以上使用的溶液，配好后低温保存。对于难溶解的物质，可使用超声波装置，也可加入对鱼低毒、无积累特性的助溶剂。并应同时进行两组不含试验物质的对照试验。一组含有的助溶剂为试验溶液中的最高浓度，另一组是不含助溶剂的稀释水。

## 6 仪器设备

试验容器用玻璃或其他惰性物质制成，应不明显吸附试验物质。常用设备、尼龙或其他软惰性材料制成的抄网应专用。

6.1 试验容器应有足够大的容积，水量一般按每升水1 g鱼计算。试验介质与空气间有足够大的界面(每10 L试验液要有大约800 $cm^2$的界面积)。初次使用的试验容器用前应仔细清洗。试验后，倒空容器，用清洗剂清洗，再用大量清水冲洗，干燥后备用。试验容器临用前用稀释水冲洗。

6.2 脂肪提取器

6.3 提取及测试生物体内残留试验物质所需的其他仪器。

6.4 萃取及测试水中试验物质所需的其他仪器。

## 7 试验条件

7.1 试验溶液的配制与贮存、鱼的管理及全部操作和积累试验都应在无污染物的大气环境中进行。

7.2 试验液中溶解氧不少于4 mg/L，试验期间水温选择18～25℃。试验温度波动不超过1℃。

7.3 每天在换液前1～2 h投食一次，投饵量为20 mg/g鱼。

## 8 试验步骤

8.1 根据试验物质对斑马鱼的96 h$LC_{50}$，确定两个试验浓度：高浓度不超过1/50×$LC_{50}$，低浓度高于化学品在水中检出限的2.5倍。

8.2 取三个容器，均加入稀释水，其中1个为对照试验，另两个加入不同量储备液以制备8.1条设定的2个浓度的试验液。如果用助溶剂溶解试验物质，则需按5.3条设置含助溶剂的对照试验。将试验液恒温后，按下列方法向各浓度中投放100条鱼。

用尼龙或其他软惰性材料编织的小孔抄网，从驯养鱼群中随机捞鱼[illegible]验容器中，在鱼转移过程

中，因操作不慎掉下之鱼或其他操作不善之鱼弃去不用，所有的鱼须在 30 s 内转移完毕。

8.3 每 8～24 h 更新一次试验液（视试验物质的性质，*DO* 等具体情况而定）。转移鱼时从低浓度向高浓度过渡，避免因使用抄网造成各容器间试验物质的明显转移。

8.4 建立试验生物体内残留试验物质的提取、浓缩和分析方法。

8.5 建立水中试验物质浓度的测试方法。

8.6 取样

8.6.1 对于辛醇/水的分配系数的对数（$\log P_{ow}$）不大于 5 的物质，吸收试验进行 2 周，取样日程为试验开始后的第 3、5、8、9、10、11、12、13、14 天，对于 $\log P_{ow}>5$ 的物质，吸收试验进行 4 周，取样日程为试验开始后的第 10、15、20、22、23、24、25、26、27、28 天，每次采集 7 条鱼组成一个样本。取鱼样的同时采取适量水样。

8.6.2 高浓度组吸收试验结束后，立即将鱼转入清水中，用流水系统进行释放试验，释放时间为吸收试验时间的 2 倍。采样时间为试验总时间的 0.0278、0.0556、0.1111、0.2222、0.3333、0.5000、0.6667、0.8333、1.000 倍。每次采集 7 条鱼组成一个样本。

8.7 样品处理

鱼样先用清水冲洗，去除吸附于体表的试验物质及其他杂质，用滤纸吸干体表的水，然后用解剖针刺入鱼脑或剪断鱼鳃盖以上的脊髓，将鱼处死。称量并记录样本总湿重。将等重量的无水硫酸钙或无水硫酸镁与鱼样一同研磨，使其脱水。混匀后用适当溶剂在脂肪提取器中抽提若干时间，直至鱼组织中试验物质全部转移至溶剂中，将所得溶液浓缩至适当体积。水样亦用有机溶剂萃取，并浓缩至适当体积。样品采集后应立即进行分析或将生物样品称重后保存在冰箱中。水样若不能立即分析须用有机溶剂萃取后保存。

在合适的测试条件下，分析水样及鱼样中试验物浓度。

8.8 对照组试验鱼的取样及样品处理按 8.6 及 8.7 条进行。

8.9 每天至少在采样同时测一次 *DO*、pH 及温度。

## 9 结果的表述

9.1 计算 *BCF*

将吸收试验中 $C_f$（鱼体中化学品浓度）及 $C_w$（水中化学品浓度）的变化对时间作图，检查试验是否达到稳态。由稳态下 $C_f$ 对 $C_w$ 的比值，求得生物浓缩常数 *BCF*。

9.2 计算生物半衰期（$\gamma$）

将释放试验中的鱼体内残留量的倒数 $1/R_t$ 对时间作图，所得到的应是直线，并符合下列方程：

$$1/R_t = K \times t + C$$

$$C = 1/Ro$$

由图中得到 $K$ 及 $C$，则：

$$\gamma = 1/(K \times Ro)$$

式中：$K$——释放速率常数；

$C$——常数；

$t$——时间；

$R_t$——试验物在鱼体内残留量。

## 10 试验报告

在试验报告中，要求列出下列资料及数据：

a）试验条件，控温及曝气情况；

b）与试验有关的化学、生物和物理数据，包括驯养鱼的详细情况及每升水中载鱼克数；

c) 配制稀释水，储备液及试验液的方法。试验用水特性、pH、硬度、*DO* 等；

d) 列表表示不同浓度试验液的 $C_f$ 及 $C_w$ 数据，说明采用的化学分析方法；

e) 试验鱼及对照鱼的死亡率，行为反应异常的情况；

f) 记录试验时间，取样时间；

g) 计算 *BCF*、$\gamma$。