



中华人民共和国国家标准

GB/T 21805—2008

化学品 藻类生长抑制试验

Chemicals—Alga growth inhibition test

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 201(2006年)《藻类生长抑制试验》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改：

——将计量单位改为我国法定计量单位。

——将原附录 1 术语和定义调整为正文。

——增加了普通小球藻(*Chlorella Vulgaris*)为受试生物。

——将原附录 4 的内容调整到正文 6.1.2 藻类的储备培养和 6.1.3 藻类的预培养。

——删除了原附录 2 中“藻种来源”相关内容。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位：环境保护部化学品登记中心。

本标准参加起草单位：沈阳化工研究院安全评价中心、上海市检测中心、上海市环境科学研究院。

本标准主要起草人：周红、菅小东、马馨、蔡磊明、赵玉艳、戎志毅、沈根祥。

化学品 藻类生长抑制试验

1 范围

本标准规定了化学品 藻类生长抑制试验的方法概述、试验准备、试验程序、质量保证与质量控制、数据与报告。

本标准适用于测试试验条件下溶于水的化学品。如果要测试挥发性、强吸附性、有颜色、不溶或难溶于水的化学品,以及可能影响培养基中营养物质有效利用的化学品,需要对所述试验程序进行修改(如采用密闭系统、适当的试验容器)。参考文献[2]、[3]和[4]提供了部分修改方案。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

生物量 biomass

单位体积试验介质内活体生物的干重,例如毫克藻每升试验溶液。生物量通常被定义为质量,但在本标准中,定义为单位体积的质量,且以单位体积内细胞数量或荧光性等的测定替代生物量的测定。

2.2

变异系数 coefficient of variation

标准差与平均数之比,通常以百分比表示,记作 CV%。变异系数是一个无量纲的数,因而便于样本间的相互比较:对照组各平行平均比生长率的变异系数的平均值按以下方式计算:

- a) 分别计算试验各阶段各平行的平均比生长率;
- b) 计算试验各阶段对照组各平行平均比生长率的变异系数的平均值。

2.3

效应浓度 EC_x

引起受试生物生长或生长率比对照下降 $x\%$ (如 50%)时的受试物浓度。EC 有基于生长率的 E_rC 和基于生长量的 E_sC 之分。

2.4

藻类生长培养基 growth medium

含有特定营养成分的液体或胶状物质。藻类在培养基中生长并暴露于受试物。通常是将受试物溶于培养基中。

2.5

生长率 growth rate

即平均比生长率(average specific growth rate),是暴露期间藻类生物量的指数增长率。

2.6

最低可观察效应浓度 lowest observed effect concentration; LOEC

在一定暴露期内,与对照相比,对藻类生长有明显($p < 0.05$)抑制效应的最低受试物设置浓度。高于 LOEC 的所有试验浓度均可观察到与 LOEC 时相同的或更严重的毒性影响。如果未满足上述条件,应就 LOEC(以及 NOEC)的选择进行详细说明。

2.7

无可观察效应浓度 no observed effect concentration; NOEC

直接低于最低可观察效应浓度(LOEC)的受试物设置浓度。

2.8

响应变量 response variable

可替代生物量评价受试物对藻类的毒性的各种参数,如生长率和生长量。

2.9

比生长率 specific growth rate

试验期间,每天生物量的增长。生物量自然对数之差与时间之差的商。

2.10

生长量 yield

试验期间,生物量增长的测定值。试验结束时各试验容器中藻类生物量与试验开始时各试验容器中藻类生物量之差。

3 受试物信息

- a) 结构式;
- b) 纯度;
- c) 蒸气压;
- d) 水中溶解度;
- e) 正辛醇-水的分配系数(P_o);
- f) 水溶液中的定量分析方法,回收率和仪器检出限;
- g) 光化学稳定性;
- h) 在水中的生物降解性;
- i) 在试验条件下的稳定性;
- j) 光吸收性;
- k) 水解离常数(K_a)。

4 方法概述

4.1 原理

受试物的浓度不同,会对藻类产生不同的影响。将处于指数生长期的淡水绿藻和(或)蓝藻暴露于含有不同浓度受试物的水溶液中,试验周期为72 h,测定并记录24 h、48 h和72 h藻类的生物量,计算抑制率(与对照相比),得出 EC_{50} 及其95%置信区间,并统计得出最低可观察效应浓度(LOEC)和(或)无可观察效应浓度(NOEC)。虽然试验周期相对较短,但是通过藻类若干代的繁殖可以评价其效应。

测定不同时间藻类的生物量,以量化藻类的生长和生长抑制。由于藻类干重难以测定,多使用其他参数替代,如细胞浓度、荧光性和光密度等。应知晓所使用的替代参数与生物量之间的换算系数。

测定终点为生长抑制。可以试验期间平均比生长率或生物量的增加来表达。从一系列试验浓度下的平均比生长率或生长量可以获得致使藻类生长率或生长量受到 $x\%$ 抑制(如50%)的被试物质浓度,并表达为 E_xC_x 或 E_yC_x (如 E_xC_{50} 或 E_yC_{50})。

4.2 参比物

本标准使用3,5-二氯苯酚作为参比物^[1]。对于绿藻,也可使用重铬酸钾作为参比物。

定期测试参比物对藻类生长的影响,至少每年两次。

5 仪器和设备

5.1 试验容器

试验容器和其他与试验液直接接触的器皿应完全为玻璃或其他化学惰性材料制成,用于测试前应

彻底清洗并灭菌。

试验容器为具有一定容积的玻璃瓶,如三角瓶,以保证试验期间有足够的试验液用于测试,同时也保证 CO₂ 的充分交换(要有一定的表面积-体积比:125 mL 三角瓶中试验液的体积应为 40 mL~60 mL,250 mL 三角瓶应为 70 mL~100 mL,500 mL 三角瓶应为 100 mL~150 mL。)注意必须保证有足够的液体用作分析测定。

为了防止有机或无机污染物影响藻类的生长和培养基的组成,容器应用棉塞、海绵塞、滤纸、纱布(2层~3层)、锡箔纸等封闭。

挥发性化学品试验时应用磨口玻璃塞完全密封。

同一批试验的容器应规格一致。

5.2 培养设备

使用可控制温度在±2℃范围内的光照培养箱。

5.3 照度计

测定光照强度的仪器:注意,光照强度的测定方法非常重要,使用不同类型的光接受器得到的结果可能不同。最好使用 4π 的球面照度计(可接受来自各方向各角度的直射或反射光照)或 2π 球面照度计(可接受来自上方各角度的直射或反射光照)。

5.4 测定藻类生物量的仪器设备

细胞计数是最常用的替代参数,用于计数的仪器设备主要有电子颗粒计数仪、显微镜、浮游植物计数框或血球计数板、手动计数器等。应明确细胞计数和干重之间的转换关系。

也可使用分光光度计、比色计、荧光计、流动细胞计数仪等测定其他替代参数。

为了在低生物量时进行有效测定,使用分光光度计吸收池的光径必须至少为 4 cm。

5.5 其他仪器设备

- pH 计;
- 电子分析天平;
- 高压灭菌锅;
- 机械振荡器等。

6 试验准备

6.1 受试生物

6.1.1 受试生物的选择

选择一些不易附着于瓶壁上的绿藻和蓝藻作为受试生物。

a) 绿藻

- 羊角月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*);
- 栅藻(*Desmodesmus subspicatus*);
- 普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)。

b) 硅藻

- 舟形藻(*Navicula pelliculosa*)。

c) 蓝藻

- 水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*);
- 聚球藻(*Synechococcus leopoliensis*)。

上述藻类的详细信息见附录 A。

也可选用其他藻类,但应在报告中说明其品系和(或)来源,并确保在试验期间相应的试验条件下保持指数生长。

6.1.2 藻类的储备培养

得到纯藻种后,需要加以保存,以备试验时用。

藻种可在试管内固体培养基斜面上保存。在培养基中加入 0.8% 的琼脂,灭菌后倒入试管,冷却成斜面,然后接种藻类,棉塞封闭,在较低光照和温度条件下可保存较长时间。大约每隔 2 个月转接一次。

如果经常进行试验,储备培养物应在液体培养基中保存。在三角瓶中加入约 100 mL 培养基,接种藻类,在试验要求的相同温度和光照条件下培养,每周转接一次,以保持培养物生长良好,随时有足够的数量可用于试验。对于生长快速的藻类,接种量为转接前藻细胞浓度的 1%。一般应在藻类进入生长停滞期前转接。

应该经常检查储备培养中藻类的生长情况,包括形态和生长速度,以及有无菌类和其他藻类的污染。培养物有畸形生长或受到其他藻类或菌类的污染时应予废弃或采取纯化、复壮等措施。

为了避免藻种受到细菌和其他藻类的污染,必须在无菌室进行操作。

6.1.3 藻类的预培养

自储备培养物中取出一定量的藻液,接种到新鲜的无菌培养基中,在试验要求的相同条件下培养。应使藻类在 2 d~4 d 内达到指数生长。藻类生长用于试验,若藻类被污染或生长异常(如畸形等)应废弃。

6.2 试验条件

6.2.1 培养基

使用 OECD 和 AAP 的藻类培养基(附录 B)。两种培养基的 pH 值和缓冲量不同,因此,同一受试物在不同培养基中对同一藻类的影响可能不同。当受试物在培养基中离子化程度较高时。

当受试物为金属螯合物或测试 pH 值条件下对藻类有毒时,可适当修改培养基,但在报告中应说明修改后培养基的组分,并阐述使用该培养基的合理性。

6.2.2 其他条件

温度 21℃~24℃,同一试验中温差不得大于 2℃。将容器倒置并每天改变其在培养箱中的位置。如果使用了非附录 A 推荐的藻种,为了控制的要求,可能需要适当提高培养温度。

连续均匀光照,绿藻和蓝藻的最低光照强度为 100 lx,光照强度应适宜于被试生物。光谱范围 400 nm~700 nm。所推荐的绿藻生长的适宜光照强度为 4 850 lx (60 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ~ 120 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)。对于其他推荐藻种,特别是水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)在光照强度为 2 960 lx~4 440 lx (40 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ~ 60 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 时生长较好。光照强度差异应保持在 ±15% 范围内。

机械振荡器:(100±10)次/min 或定时人工摇动若干次。

7 试验程序

7.1 制备

7.1.1 受试物溶液的制备

如果受试物为易溶于水的化学物质,用经灭菌后的新鲜培养基配制受试物的储备液,其浓度为测试时所需最高浓度的 2 倍。用此储备液稀释配制成一系列不同浓度的受试物溶液,其浓度也分别为测试时所需浓度的 2 倍。

如果受试物为难溶于水的化学物质,用适当的溶剂,例如丙酮、t-丁基乙醇和二甲基甲酰胺^{[2],[3]}等,制备受试物的储备液,其浓度应是测试时所需最高浓度的 10⁴ 倍。用此储备液稀释配制成一系列不同浓度的受试物溶液,其浓度也分别为测试时所需浓度的 10⁴ 倍。应选用对藻类生长无影响的溶剂,试验液中溶剂最大允许使用量为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

7.1.2 藻液的制备

镜检并计数预培养的藻类,若藻类生长良好即可用于试验。试验液中藻类的初始生物量(干重)应小于 0.5 mg/L,因此,各种藻类在试验液中的初始细胞浓度如下:

- a) 羊角月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*), $5 \times (10^3 \sim 10^4)$ 个/mL;
- b) 栅藻(*Desmodesmus subspicatus*), $(2 \sim 5) \times 10^3$ 个/mL;
- c) 普通小球藻(*Chlorella vulgaris*) 10^4 个/mL;
- d) 舟形藻(*Navicula pelliculosa*), 10^4 个/mL;
- e) 水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*), 10^4 个/mL;
- f) 聚球藻(*Synechococcus leopoliensis*), $5 \times (10^4 \sim 10^5)$ 个/mL。

如果受试物为易溶于水的化学物质,藻液中的藻细胞浓度为初始细胞浓度的 2 倍;如果受试物为难溶于水的化学物质,藻液中的藻细胞浓度为初始细胞浓度。

7.1.3 试验液的制备

如果受试物为易溶于水的化学物质,将受试物溶液和藻液以 1:1 的比例混合,即为试验液。对照组不加入受试物溶液而加入同体积的无菌培养基。

如果受试物为难溶于水的化学物质,向一定体积的藻液中加入 10 μ L 受试物溶液,即为试验液。增设溶剂对照组,其中加入 10 μ L 溶剂。

7.2 试验操作

7.2.1 预备试验

正式试验之前,先进行较大范围浓度系列的预备试验,为正式试验设置受试物的浓度提供依据。预备试验不设平行。

7.2.2 正式试验

根据预备试验的结果进行正式试验,最好在对藻类产生 5%~75% 生长抑制效应之间以几何级数设置受试物浓度系列。正式试验至少设 5 个浓度,浓度的间隔系数大于或等于 3.2,每个浓度 3 个平行。

如果试验不需要得出无可观察效应浓度(NOEC),可以适当减少平行数而增加试验浓度。

应同时设置空白对照组,若使用溶剂,还应增设溶剂对照组,对照组至少设 3 个平行。如果条件允许,对照组平行数为处理组的 2 倍。

7.2.3 试验周期

试验周期为 72 h。但如果为了满足质量保证与质量控制的各项要求,也可根据实际情况缩短或延长试验周期。

7.2.4 藻类生长情况测定

试验开始后,每隔 24 h,即在 24 h、48 h、72 h 时,从每个试验容器中取样镜检并进行生长测定。吸取少量试验液进行测定,测定完成后,严禁将取出的试验液放回至试验容器中。测定项目包括藻细胞浓度、光密度或叶绿素等,测定方法如下:

- a) 细胞计数:在显微镜下,用 0.1 mL 计数框或血球计数板对藻细胞的数量计数。用计数框时可采用视野法,即对显微镜视野中的所有细胞计数。放大倍数 40×10 ,每片至少计数 10 个视野,如果藻细胞密度小,则要适当增加计数视野,藻数按视野累加。每次计数(同一批取样的样品)应采用相同方法(视野数目、放大倍数等)。每一样品至少计数 2 次,如计数结果相差大于 15%,应予重复计数。如工作量过大,可先取样,用鲁哥氏液固定后保存,留待以后计数。镜检计数工作量较大,有条件时可采用电子颗粒计数仪。
- b) 光密度:取一定量的测试液在分光光度计上测定其光密度,波长可选用 650 nm、663 nm 或其他波长。亦可用荧光光度计测定。
- c) 叶绿素:样品经离心或过滤后,用丙酮、乙醇或其他溶剂萃取,进行分光测定。亦可用荧光光度

计测定。

7.2.5 分析检测

试验开始和结束时,应测定对照组和各处理组试验液的 pH 值,pH 值的差异小于 1.5。如果受试物是金属或混合物,且在试验的 pH 值左右发生部分离子化,那么必须限制 pH 值的偏移,以确保获得可重复的试验结果。偏移小于 0.5 在理论上是可行的,并且可以通过确保有充足的 CO₂ 在空气和试验液间交换来实现,例如增大摇动频率。另一个途径是减少初始生物量或缩短试验周期来减少对 CO₂ 的需求。

建立试验液中受试物浓度的分析测定方法,试验开始和试验期间定期取样测定,以验证各处理组试验液的初始浓度以及试验期间的暴露浓度。如果试验期间受试物的浓度能维持在设定浓度(或初始测定浓度)±20%的范围内,测定试验开始和结束时一个高浓度组、一个浓度组和约 50%生长抑制浓度组试验液中受试物的浓度;如果不能,则测定各浓度组试验液中受试物的浓度。如果受试物具有挥发性、不稳定性或强吸附性,则每隔 24 h 应测定一次。

用于受试物浓度分析的培养基应与试验用培养基经过同样的处理,即它必须接种了绿藻且在与试验相同的条件下培养。如果需要分析溶解的受试物浓度,必须将藻类从培养基中分离出来。最好使用离心法进行分离,较低转速就可使藻类沉淀。

结果计算以测定浓度为准。如果测定浓度为设定浓度(或初始测定浓度)的 80%~120%,可以用设定浓度或初始测定浓度来计算;如果超出该范围,则使用测定浓度的几何平均值或受试物浓度下降的模型进行结果计算^{[3],[7]}。

相对于其他绝大多数的短期水生生物毒性试验而言,藻类生长抑制试验是一个动态的试验系统。试验中实际的暴露浓度难以确定,尤其是对于强吸附性物质在低浓度时。因此,由于吸附于生物量增加的藻类上,试验液中被试物质的消失并不意味着它从该试验系统中消失。结果计算时,须核查在被试物质浓度降低过程中是否伴随着藻类生长抑制效应的减小。如果发生此类情况,建议应用合适的被试物质浓度下降的模型。如果未发生此类情况,最好采用初始浓度(设定或测定)的分析结果进行计算。

7.2.6 试验观察

试验结束时,镜检试验液中藻细胞生长是否健康正常,记录并说明细胞的任何异常情况,如畸形等(暴露于受试物中引起的)。

7.3 限度试验

若预试验的结果表明,受试物在 100 mg/L 的浓度下(或在试验溶液中的最大溶解度下,该溶解度大于 100 mg/L)对受试藻类没有产生任何可观察效应,正式试验可使用限度试验,限度试验的浓度为 100 mg/L,如果受试物在试验溶液中的最大溶解度大于 100 mg/L,则取该最大溶解度作为限度试验的浓度。

限度试验设 6 个重复,对照组与处理组应同时进行。所有上述有关试验条件和质量保证与质量控制的内容均适用于限度试验。对照组和处理组中测得的响应变量需用统计学方法进行比较分析,例如学生氏(Student) t 检验。如果两组所得变量不规则,应调整 t 检验的方法。

8 质量保证与质量控制

试验达到以下指标方为有效:

- a) 试验开始的 72 h 内,对照组藻细胞浓度应至少增加 16 倍,即比生长率不小于 0.92 d⁻¹。对于常用的试验藻种,生长率远高于此(见附录 A)。如果试验使用了其他生长较慢的藻种,该指标可能不能被满足。如果发生此类情况,应延长试验周期,直至对照组藻细胞呈指数增长且浓度增加 16 倍。同时,也可缩短试验周期,但至少应为 48 h 且供给充足,同样应达到对照组藻细胞呈指数增长且浓度增加 16 倍。
- b) 试验各阶段,如 0 d~1 d、1 d~2 d 和 2 d~3 d,对照组比生长率的变异系数的平均值小

于 35%。

- c) 整个试验期间,对照组各平行的平均比生长率的变异系数,羊角月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)和栅藻(*Desmodesmus subspicatus*)不大于 7%,其他推荐藻类不大于 10%。

9 数据与报告

9.1 数据处理

9.1.1 绘制生长曲线

用测定的替代参数(如藻细胞浓度、荧光性)表示试验容器中藻类的生物量。

以表格形式列出 24 h、48 h 和 72 h 对照组和各处理组的试验容器中的藻类生物量。

以时间为横轴,藻类生物量为纵轴,取各平行的平均值,绘制对照组和各处理组的藻类生长曲线。对数坐标轴和直线坐标轴均可使用,但是用对数坐标轴作出的生长曲线是一条直线,其斜率就是藻类的比生长率,它可以更好地表达藻类的生长模式。

观察生长曲线,检查试验期间对照组的指数生长是否达到预期的生长率。仔细检查所有数据点和相关图表,核对原始数据和可能产生误差的环节。仔细检查可能偏离系统误差的所有数据点。如果发现了明显的程序上的错误或该错误发生的可能性非常高,将相关的数据点标为异常值,并在进行下一步的统计分析时剔除这些数据(如果其中一个平行中藻类的浓度为零,那可能是该平行试验液中未接入藻类或器皿的洗涤方法不正确)。试验报告中对于作为异常值被剔除的数据应阐明其原因。可以接受的原因仅仅只限于程序上的错误和精密度差。判定异常值的统计学程序仅仅适用于此类问题,它并不能代替专家评审。最好在之后出现的图表中保留异常值。

9.1.2 参数计算

本标准应计算以下参数以评价受试物对藻类的影响:

- a) 比生长率:试验期间,每天生物量的增长,见式(1):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

μ_{i-j} ——从 i 时间到 j 时间的比生长率,单位为每天(d^{-1});

X_i —— i 时间的生物量;

X_j —— j 时间的生物量。

对于各处理组和对照组,计算各平行的平均值进行毒性评价。

采用初始接种生物量的设定值计算整个试验周期(通常 0 d~3 d)的平均比生长率,比采用测量值计算的更精确。特别是生物量浓度低时,如果测定生物量时使用了非常精密的仪器(如流动血细胞计数仪),可使用初始生物量浓度的测量值进行计算。计算并评估试验过程中每天的(0 d~1 d、1 d~2 d 和 2 d~3 d)比生长率,并检查对照组的生长率是否符合质量保证与质量控制的要求。如果与总平均比生长率相比,第一天的比生长率相当低,说明第一天藻类处于生长停滞期。通过预培养消除对照组中的生长停滞期或使其最小化,暴露组中的生长停滞表明藻类经受试物作用后可能恢复或由于受试物的损失(包括吸附于藻类)暴露量减少了。因此,为了评价暴露期间发生的受试物对藻类生长的影响,应评价试验各阶段的生长率。如果平均比生长率和各阶段生长率间存在显著差异,说明藻类未保持持续指数增长,因此,要仔细检查生长曲线。

- b) 以比生长率为基础的抑制率,见式(2):

$$I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

I_r ——以比生长率为基础的抑制率,%;

μ_c ——对照组各平行比生长率的平均值；

μ_T ——处理组各平行的比生长率。

c) 生长量：试验期间，生物量的增长，见式(3)：

$$I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中：

I_y ——以生长量为基础的抑制率，%；

Y_c ——对照组各平行生长量的平均值；

Y_T ——处理组各平行的生长量。

如果试验设置了溶剂对照组，进行抑制率计算时，应以溶剂对照组为准。

由比生长率和生长量分别得出的毒性数据没有可比性，在应用试验结果时应注意区分。由于计算方法的不同，由平均比生长率得出的 EC_x (即 $E_r C_x$) 一般高于由生长量得出的 EC_x (即 $E_y C_x$)。由于仅仅是所使用的计算方法不同，两个变量灵敏度的差异不用特别说明。平均比生长率的定义基于在营养充足的条件下藻类的指数生长模式，毒性评价是依据受试物对生长率的影响，而不是依据对照组比生长率的绝对水平、剂量-效应曲线的斜率或试验周期。相对而言，基于生长量得出的结果是根据所有这些其他变量得出的。由于种类和品系的不同，基于各试验中藻种的平均比生长率和最大比生长率得出的 $E_y C_x$ 也不同。该响应变量不能用于比较不同种类和品系的藻类对有毒物质的灵敏度。用平均比生长率进行毒性评价更科学。

9.1.3 绘制剂量-效应曲线

以受试物浓度的对数值为横坐标，比生长率的抑制率或生长量的抑制率为纵坐标，作回归曲线，即为剂量-效应曲线。作回归曲线时应忽略上一阶段已定为异常值的数据。

采用直线内插法或其他计算机统计软件得出 EC_{50} 、 EC_{10} 和(或) EC_{20} 这些关键值。但该方法有时可能不适用：

- a) 计算机统计软件不适用于所得数据，专家评审更有利于得到更可靠的结果，这种情况下，一些软件甚至不能给出一个可靠的解决办法(叠代不集中等)。
- b) 一般的计算机统计软件不适于处理刺激效应的数据。

9.1.4 统计分析

通过回归分析得出量化的剂量-效应关系。对数据进行线性转化后——例如概率单位、对数或韦布尔(Weibull)单位^[8]，可能可以用加权线性回归进行统计，但是非线性回归是能够更好地处理不规则和偏离曲线但又不能忽略不计的数据的首选方法。对于像接近 0% 抑制率或 100% 抑制率这样不规则的难以进行分析的数据，通过转化可能被放大。注意使用概率单位、对数或韦布尔(Weibull)单位转化的标准方法是针对量子(如死亡率或存活率)数据的，为了使其与生长和生物量的数据相兼容，必须进行改良。由连续数据确定 EC_x 的特殊程序见参考文献[9]、[10]和[11]。附录 C 详细说明了非线性回归分析的应用。

统计分析各响应变量，通过剂量-效应关系求出 EC_x 及其 95% 置信区间(如果可能)。最好作图或统计分析响应数据是否与回归模型相符。采用各平行所得数据而不是各平行的平均值进行回归分析。如果数据过于分散，难以或不能采用非线性曲线，需用各平行的平均值进行回归，这样可以减少来自可疑异常值的影响。如果选择这样处理，在报告中应将其作为对常规程序的背离进行说明和验证，因为曲线与个别平行相符并不是个好结果。

如果所得数据无法通过可以利用的回归模型/方法求出 EC_{50} 及其 95% 置信区间，可采用直线内插法。

通过单因素方差分析(ANOVA)，比较各处理组受试物对藻类生长影响的平均值，得出 LOEC 和 NOEC。必须采用适当的多重比较方法，比较各处理组的平均值和对照组的平均值是否存在显著性差

异。建议采用邓恩特(Dunnett)法或威廉(Williams)法进行多重比较,见参考文献[12]、[14]、[15]、[16]、[17]。必须评估 ANOVA 中变量具有齐次性的假设是否成立。可通过作图或试验^[17]进行评估。建议采用列文(Levene)法或巴特利特(Bartlett)法检验变量是否具有齐次性,如果结果是否定的,则应通过对数转换进行校正。如果非齐次性异常显著,难以通过数据转换来校正,建议采用递减的 Jonkheere 趋势检验进行分析。其他确定 NOEC 的准则见参考文献[11]。

近来科学的发展力主抛弃 NOEC 的概念而用 EC_x 替代。对于藻类试验而言, x 表示多少最合适尚未定论。10%~20%范围内的值都比较合适(根据响应变量的不同),最好能同时给出 EC_{10} 和 EC_{20} 。

9.1.5 生长刺激

试验有可能观察到低浓度生长刺激效应(负抑制率)。产生此效应的原因可能是毒物兴奋效应(毒物刺激效应)或受试物中刺激生长的因子加入至最少量的培养基中所致。注意,加入无机营养盐并不会产生直接的影响,因为试验期间培养基中的营养成分是保持过剩状态的。计算 EC_{50} 时,如果观察到明显的刺激效应或需要求解的 EC_x 中 x 值较低,建议采用毒物兴奋效应模型。否则可忽略不计。计算时尽可能避免从原始数据中删除刺激效应的部分。如果所使用的统计软件不容许刺激效应(次要地位)的出现,则采用直线内插法。

9.1.6 非受试物毒性引起的藻类生长抑制

由于遮挡会减少有效光照,对于具有光吸收性的受试物来说,生长抑制现象加剧。应通过修改试验条件和试验方法来区分由于理化性质等造成的对藻类生长的影响。相关准则见参考文献[2]和[3]。

9.2 试验报告

试验报告应包括以下内容:

a) 受试物

- 物理属性和相关理化性质,包括水中溶解度;
- 化学特性(如 CAS 编号),包括纯度。

b) 受试生物

- 藻类的种类、来源或提供者,以及培养条件。

c) 试验条件

- 试验开始日期和持续时间;
- 试验设计:试验容器、培养体积和试验开始时的生物量密度;
- 培养基的成分;
- 试验浓度和平行(如平行数、试验浓度数及其公比);
- 试验溶液的配制,包括溶剂的使用;
- 培养设备;
- 光照强度和光质(来源,是否均匀);
- 温度;
- 浓度测定:设定浓度和所有实测浓度,应说明添加回收试验的方法和仪器的最低检测限;
- 对本标准的所有背离;
- 生物量的测定方法,以及所测参数和干重的关系。

d) 结果

- 试验开始和结束时各处理组的 pH 值;
- 生物量的测定方法,以及各测定点时各试验容器中的生物量;
- 生长曲线(生物量-时间);
- 计算出的各平行的各参数值,及其平均值和变异系数;
- 剂量-效应曲线;
- 评估受试物对藻类的毒性,如 EC_{50} 、 EC_{10} 、 EC_{20} 及其置信区间。LOEC 和 NOEC 及其统计

方法(可选);

- 如果采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计,说明最小显著差数;
- 各处理组中任何对藻类生长有刺激效应的结果;
- 观察到的其他效应,如藻类在形态学上的改变;
- 结果讨论,包括对偏离的解释说明。

附 录 A
(资料性附录)
试验藻种

A.1 生物品系

A.1.1 绿藻

羊角月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*);
栅藻(*Desmodesmus subspicatus*)。

A.1.2 硅藻

舟形藻(*Navicula pelliculosa*)。

A.1.3 蓝藻

水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*);
聚球藻(*Synechococcus leopoliensis*)。

A.2 外观和特征(见表 A.1)

表 A.1 试验藻种的外观和特征

项目	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
外观	新月形或链形, 单个细胞	椭圆形, 单个细胞	杆状细胞	椭圆形, 链状细胞	杆状细胞
大小(宽×长)/ ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	(2~3)×(8~14)	(3~12)×(7~15)	3.7×7.1	3×4.5	1×6
细胞体积/(μm^3 / 个)	40~60 ^a	60~80 ^a	40~50 ^a	30~40 ^a	2.5 ^b
细胞干重/(mg/ 个)	(2~3)×10 ⁻⁸	(3~4)×10 ⁻⁸	(3~4)×10 ⁻⁸	(1~2)×10 ⁻⁸	(2~3)×10 ⁻⁹
生长率 ^c /d ⁻¹	1.5~1.7	1.2~1.5	1.4	1.1~1.4	2.0~2.4
^a 用电子颗粒计数器测定的结果。 ^b 用细胞大小计算的结果。 ^c 培养条件为 OECD 藻类培养基,光照强度 70 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度 21℃。					

A.3 试验藻种的培养与测定

A.3.1 羊角月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)和栅藻(*Desmodesmus subspicatus*)

多种培养基适用于这两种绿藻。合适的培养基类型可由提供单位获取。单个细胞,细胞密度的测定比较简单,可用电子颗粒计数器或显微镜。

A.3.2 水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)

多种培养基适用于此藻。注意,必须在藻类进入生长停滞期前转接,否则将难以恢复。

水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)会生长成链状细胞的集合体。根据培养条件的不同,形成的集合体大小形状也不同。进行显微镜下细胞计数或电子颗粒计数器计数时必须破坏该集合体。

为了减小计数差异,取样并进行超声波处理以破坏细胞的链状结构。经超声波处理后,链状细胞链长变短,但是超声时间过长会破坏细胞。各处理组超声的强度和时间应相同。

计数足够的视野数(血球计数板,至少 400 个小格)有利于补偿计数差异。这可以改善显微镜下测定密度的可靠性。

可以使用电子颗粒计数仪测定经超声断链处理的总细胞体积。

将藻种接种至试验容器中时,采用搅拌或其他类似方法使接种物悬浮。

持续振荡(150 r/min)或定时剧烈摇动试验容器,以防鱼腥藻聚团。如果已形成团状物,在取样进行测定时应剧烈摇动,以破坏藻团并使藻细胞均匀分布。

A.3.3 聚球藻(*Synechococcus leopoliensis*)

多种培养基适用于此藻。合适的培养基类型可由提供单位获取。

单个杆状细胞。细胞非常小,用显微镜计数很复杂也很困难。使用电子颗粒计数仪时,粒径范围应调至 1 μm 。也可使用体外荧光计进行测定。

A.3.4 舟形藻(*Navicula pelliculosa*)

多种培养基适用于此藻。合适的培养基类型可由提供单位获取。注意培养基中硅酸盐的量。

在某些生长条件下会形成团状物。该藻类细胞有时能够产生脂类,因此在液面可能积聚成膜。基于以上原因,为了获得具有代表性的样品,在取样测定时需采用某些特殊的方法。例如使用漩涡搅拌器剧烈搅动。

附录 B
(资料性附录)
培养基

B.1 OECD 藻类培养基

OECD 藻类培养基同 ISO 8692 中所述培养基,配制方法见表 B.1。

表 B.1 OECD 藻类培养基

营养盐	储备液中的质量浓度	取用体积	最终定容体积
储备液 1: 常量营养盐 NH_4Cl $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4	1.5 g/L	mL	1 000 mL
储备液 2: Fe-EDTA $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	g/L	mL	
储备液 3: 微量元素 H_3BO_3 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ZnCl_2 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	g/L	mL	
储备液 4: NaHCO_3 NaHCO_3 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 g/L	1 mL	

将配制好的储备液经 0.2 μm 滤膜过滤或高压灭菌(120℃, 15 min), 4℃ 避光冷藏保存。储备液 2 和储备液 4 只能通过滤膜过滤灭菌。

B.2 APP 藻类培养基

APP 藻类培养基同 ASTM 中所述培养基,配制方法见表 B.2。

表 B.2 APP 藻类培养基

营养盐	称药量	定容体积	取用体积	最终定容体积
储备液 1: 常量营养盐 NaNO_3 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12.750 g 6.082 g 2.205 g	500 mL	1 mL	1 000 mL

表 B.2 (续)

营养盐	称药量	定容体积	取用体积	最终定容体积	
储备液 2:微量营养盐					
H ₃ BO ₃	92.760 mg	500 mL	1 mL	1 000 mL	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	207.690 mg				
ZnCl ₂	1.635 mg				
FeCl ₃ · 6H ₂ O	79.880 mg				
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.714 mg				
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3.630 mg				
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.006 mg				
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	150.000 mg				
Na ₂ SeO ₄ · 5H ₂ O	0.005 mg ^b				
储备液 3:MgSO ₄ · 7H ₂ O					
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.350 g	500 mL	1 mL	1 000 mL	
储备液 4:K ₂ HPO ₄					
K ₂ HPO ₄	0.522 g	500 mL	1 mL		
储备液 5:NaHCO ₃					
NaHCO ₃	7.500 g	500 mL	1 mL		
储备液 6:Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O					
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	a	—	—		
^a 只有硅藻试验需要。可直接加入(202.4 mg)或制备储备液,只要保证最终浓度为 20 mg/L(以 Si 计)即可; ^b 只有硅藻的储备培养时需要。					

定容用水为去离子水或蒸馏水。

使用 0.1 mol/L 或 1.0 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节培养基的 pH 值至 7.5±0.1。

将配制好的培养基经 0.22 μm 滤膜(使用电子颗粒计数器进行细胞计数时)或 0.45 μm 滤膜(不使用电子颗粒计数器进行细胞计数时)过滤灭菌,4℃避光冷藏保存直至用于实验。

B.3 OECD 藻类培养基和 AAP 藻类培养基中各成分的比较(见表 B.3)

表 B.3 OECD 藻类培养基和 AAP 藻类培养基中各成分的比较

成分	OECD		AAP	
	mg/L	mM	mg/L	mM
NaHCO ₃	50.0	0.595	15.0	0.179
NaNO ₃			25.5	0.300
NH ₄ Cl	15.0	0.280		
MgCl ₂ · 6H ₂ O	12.0	0.059 0	12.16	0.059 8
CaCl ₂ · 2H ₂ O	18.0	0.122	4.41	0.030 0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15.0	0.060 9	14.6	0.059 2
K ₂ HPO ₄			1.044	0.005 99
KH ₂ PO ₄	1.60	0.009 19		
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.064 0	0.000 237	0.160	0.000 591
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.100	0.000 269	0.300	0.000 806
H ₃ BO ₃	0.185	0.002 99	0.186	0.003 00

表 B.3 (续)

成分	OECD		AAP	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.415	0.002 10	0.415	0.002 01
ZnCl ₂	0.003 00	0.000 022 0	0.003 27	0.000 024
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.001 50	0.000 006 30	0.001 43	0.000 006
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.007 00	0.000 028 9	0.007 26	0.000 030
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.000 01	0.000 000 06	0.000 012	0.000 000 07
pH	8.1		7.5	

EDTA 的摩尔比率略高于单位元素的。这样可以避免离子沉淀,同时使重金属离子的螯合作用最小化。

在使用舟形藻(*Navicula pelliculosa*)作为受试生物时,两种培养基中都需补充 Na₂SiO₃ · 9H₂O,使其浓度达到 1.4 mg/L (按干重计)。

培养基的 pH 值是液体中的碳酸盐与气中 CO₂ 的分压之间平衡的结果。25℃时的 pH 值与重碳酸盐的摩尔浓度之间的近似关系如下:

$$\dots\dots\dots(B.1)$$

式中:

NaHCO₃ 为 15 mg/L 时, pH = 7.5 (AAP 培养基);

NaHCO₃ 为 7.5 mg/L 时, pH = 8.1 (OECD 培养基)。

B.4 OECD 和 AAP 培养基中各元素的比较见表 B.4。

表 B.4 OECD 和 AAP 培养基中各元素的比较

元素	培养基中元素浓度/(mg/L)	
	OECD	AAP
C		2.144
N		4.202
P		0.185
K	0.459	0.469
Na	13.704	11.044
Ca	4.905	1.202
Mg	2.013	2.909
Fe	0.017	0.033
Mn	0.115	0.115

附 录 C
(资料性附录)
非线性回归数据的统计

C.1 概述

在藻类及其他微生物生长试验中,响应变量即生物量的生长是持续呈比例变化的。过程速率(如果采用生长率)及其全积分(如果采用生物量),二者都将引用非暴露条件下重复测定的平均值,非暴露条件相对于暴露条件显示了最大的响应值,在藻类试验中光照和温度是主要的影响因素。如果不考虑单个细胞,可以认为试验系统中生物量是持续的。该系统中由于响应类型不同变量的分布仅与试验因素有关(被描述为错误的对数正态分布或正态分布)。这与典型的生物测定响应值相反,生物测定响应值使用个体公差(典型的二项式分布)量化数据,而个体公差量化数据经常被假定是主要导致变异性的因素。这里的空白值为零或背景值。

在不复杂的情况下,规一化的或相关的响应值(r),只是简单的从1(0%抑制)下降到0(100%抑制)。注意,所用的响应值都有一个误差相伴,且明显的负抑制率仅是随机误差计算的结果。

C.2 回归分析

C.2.1 模型

回归分析的目的在于能够用数学回归函数定量描述浓度响应曲线,这个数学函数是 $Y=f(C)$ 或更经常使用的 $F(Z)$,当 $Z=\lg C$ 时。而反过来可以用 $C=f^{-1}(Y)$ 计算 EC_x ,包括 EC_{50} , EC_{10} 和 EC_{20} 及其他他们的95%置信区间。已经证明一些简单的数学函数可以在藻类生长抑制试验中成功地描述浓度与响应值之间的关系。函数包括对数方程式,非对称韦布尔(Weibul)方程和正态分布的对数函数,所有的方程曲线均为渐进的S形曲线, C 趋近于零或无穷大。

连续阈值的函数模型(例如Kooijman模型,Kooijman等在1996年用于“数量生长抑制”)是最近提出的或作为渐进模型的替换模型。这个模型假设在低于一定阈值 EC_0+ 时,浓度不起作用。这时用外推法估测的浓度响应关系与用简单的连续函数在浓度轴上截取的值在起点上没有区别。

注意可用最小二乘法分析(假设变量恒定)或者权重法,如果变量不一致时需要补偿。

C.2.2 程序

程序要点如下:选择一个合适的函数方程, $Y=f(C)$,用非线性回归试验数据。对每个试验容器选择更合适的测量法比用结果的平均值更好,这样做其目的是从数据中获取尽可能多的信息。而另一方面,如果数据之间很不一致,实际的试验经验告诉我们重复试验之间的平均值可以提供比个体数据更精确的估计,这种估计受系统误差的影响更小。

绘制合适的曲线,整理数据,检查曲线是否合适。分析残量对达到该目的有一定帮助。如果选择的适用于浓度响应的函数关系不能很好描述整个曲线或者不适用于它本质的一些部分,例如在低浓度的响应值,选择另一曲线适合它。例如,用非对称曲线如韦布尔(Weibul)函数曲线代替对称曲线。负抑制可能是对数正态分布函数遇到的同样的问题。它同样需要可替代的回归函数。并不推荐制定用0或一个小的正值来替代这样的负值,因为这样会歪曲误差分布。合适的做法是在这一段内绘制一个单独的曲线例如用低抑制部分去估测 $EC_{low x}$ 图。用合适的方程进行计算(通过“反估测” $C=f^{-1}(Y)$),特征点估测 EC_x 's,报告 EC_{50} 的最小值和1或2个 $EC_{low x}$ 估测值。实际经验表明,如果数据点足够(除非在低浓度出现了刺激效应混淆了结果),藻类试验的精密度通常允许在±10%抑制率。通常被认为 EC_{20}

估测的精密度高于 EC_{10} , 因为 EC_{20} 经常位于浓度响应曲线中心最大的线性部分。由于低浓度生长刺激效应的产生, EC_{10} 很难解释。因此 EC_{10} 值在足够准确的情况下才能获得。在报告中推荐用 EC_{20} 。

C.2.3 加权因子

包括成比例的部分在内, 试验变量通常不是恒定的, 因此, 加权回归更有利于得出精密度高的试验结果。对于这样的分析, 加权因子通常被假设与方差成反比, 见式(C.1):

$$W_i = \frac{1}{\text{Var}(r_i)} \quad \dots\dots\dots(\text{C.1})$$

许多回归程序允许选择加权回归分析, 同时将加权因子列于表中, 加权因子常通过 $n/\sum w_i$ 将它们相乘(n 为数据编号), 所以它们的总数是一个。

C.2.4 归一化响应

归一化通过对照的平均响应值给出一些原理问题并使问题上升到更为复杂的方差结构。通过对照的平均响应区分响应值以得到抑制率, 使得在对照平均值上的误差值又引入了另外一个误差。除非这个误差可以小到忽略不计, 否则, 必须依据对照用的协方差(Draper and Smith, 1981), 校正回归中的加权因子和置信限。注意, 对照的平均响应值的估计的高精密度非常重要, 目的在于使相对响应值的整体方差最小。这个方差如式(C.2):

$$Y_i = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i) \quad \dots\dots\dots(\text{C.2})$$

式中:

Y_i ——相对响应;

i ——受试物处理组;

0——对照组。

有一个方差 $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$, 并且从 $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$ 和 $(\partial Y_i/\partial r_0) = -r_i/r_0^2$, 用正态分布数据 m_i 和 m_0 重复值: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$ 。

这样, 相对响应的总体方差如式(C.3):

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0 \quad \dots\dots\dots(\text{C.3})$$

对照平均值的误差与对照重复平均值的平方根成反比, 它可以用历次数据进行校正, 用这种方法可以大大降低误差。还可以不将数据归一化而是使其完全响应, 包括对照响应数据, 但是为了符合非线性回归的要求, 引入对照响应值作为额外参数。用通常的 2 参数回归方程, 这个方法对适合 3 参数是必要的, 因此要求更多的数据点而不是数据的非线性回归, 这些数据用预先设置的对照响应归一化。

C.2.5 反置信区间

用反估测法计算非线性回归的置信区间是非常复杂的, 并且在常规的计算机统计程序中没有现成的可选用的标准方法。近似的置信限可以通过标准的非线性回归程序特征重构获得(Bruce and Versteeg, 1992)。其中包括用期望点重写数学方程, 例如用 EC_{10} 和 EC_{50} 作为估测参数。(使函数为 $I = f(\alpha, \beta, \text{浓度})$ 并利用定义关系 $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0.1$ 和 $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0.5$ 来代替 $f(\alpha, \beta, \text{浓度})$, 等价函数 $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{浓度})$ 。

通过保留最初方程完成更直接的计算(Andersen et al, 1998), 并用了 Taylor 扩展法扩展到 r_i 和 r_0 。最近的“boot strap”法应用越来越广泛, 该方法使用标准数据和随机编号机可控的频繁的反复取样来估测经验方差分布。

C.3 参考文献

[1] Kooijman, S. A. L. M.; Hanstveit, A. O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

[2] Draper, N. R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley,

New York. Bruce, R. D. and Versteeg, D. J. (1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1492.

[3] Andersen, J. S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

参 考 文 献

- [1] International Organisation for Standardisation. ISO 8692 Water quality-Algal growth inhibition test, 1993.
- [2] International Organisation for Standardisation. ISO/DIS 14442. Water quality-Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water, 1998.
- [3] OECD. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2000.
- [4] International Organisation for Standardisation. ISO 5667-16 Water quality-Sampling-Part 16: Guidance on Biotesting of Samples, 1998.
- [5] Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 1997, 31: 2525-2531.
- [6] Slovacey, R. E. and Hanna, P. J. In vivo fluorescence determinations of phytoplankton-chlorophyll. *Limnology & Oceanography* 1997, 22(5): 919-925.
- [7] Simpson, S. L., Roland, M. G. E., Stauber, J. L. and Batley, G. E. Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, 22: 2073-2079.
- [8] Christensen, E. R., Nyholm, N. Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.*, 1984, 19: 713-718.
- [9] Nyholm, N. Sorensen, P. S., Kusk, K. O. and Christensen, E. R. Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1992, 11: 157-167.
- [10] Bruce, R. D., and Versteeg, D. J. A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1992, 11: 1485-1494.
- [11] OECD. Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2005.
- [12] Dunnett, C. W. A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 1955, 50: 1096-1121.
- [13] Norberg-King T. J. An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN, 1988.
- [14] Dunnett, C. W. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 1964, 20: 482-491.
- [15] Williams, D. A. A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 1971, 27: 103-117.
- [16] Williams, D. A. The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 1972, 28: 519-531.
- [17] Draper, N. R. and Smith, H. Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York, 1981.
- [18] Brain, P. and Cousens, R. An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 1989, 29: 93-96.
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品 藻 类 生 长 抑 制 试 验
GB/T 21805—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 36 千字
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

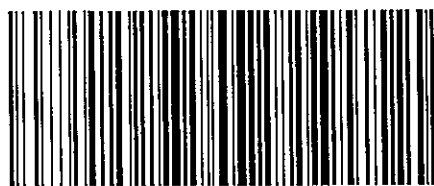
*

书号: 155066·1-32203 定价 20.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21805-2008