



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 39304—2020

---

## 再生水生物毒性检测的样品前处理 通用技术规范

General technical specification for sample pre-treatment of biological  
toxicity detection in reclaimed water

2020-11-19 发布

2021-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国石油和化学工业联合会提出。

本标准由全国化学标准化技术委员会(SAC/TC 63)归口。

本标准起草单位:南京大学、南京大学宜兴环保研究院、江苏中宜金大环保产业技术研究院有限公司、中海油天津化工研究设计院有限公司、蓝保(厦门)水处理科技有限公司、东莞理工学院、石家庄给源环保科技有限公司、珠海京工检测技术有限公司、江苏科标医学检测有限公司。

本标准主要起草人:任洪强、吴兵、张徐祥、耿金菊、吕奋勇、牛军峰、李永广、王磊、王庆、薛银刚、尹金宝、李琳。



# 再生水生物毒性检测的样品前处理 通用技术规范

## 1 范围

本标准规定了再生水中污染物生物毒性检测时样品前处理的通用技术要求。  
本标准适用于再生水生物毒性检测前样品采集、制备和质量控制。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

HJ/T 372 水质自动采样器技术要求及检测方法

HJ 493 水质采样 样品的保存和管理技术规定

HJ 494 水质 采样技术指导

## 3 术语和定义



下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**再生水** reclaimed water, recycle water

再生水系指生活污水或工业废水经适当再生工艺处理后,达到一定的水质标准,满足某种使用功能要求,可以进行有益使用的水。

注:改写 GB/T 19923—2005,定义 3.2。

### 3.2

**生物毒性检测** biological toxicity detection

利用生物的反应测定一种或多种污染物或环境因素单独或联合存在时,所导致的影响或危害。

注:所利用的生物反应包括分子、细胞、组织、器官、个体、种群、群落-生态系统各级水平上的反应。

### 3.3

**样品前处理** sample pre-treatment

根据检测方法的要求,将样品处理到符合后续测试要求的所有样品制备过程。

注:包括但不限于样品解冻、混匀、可溶性和颗粒状组分的分离、pH 调节、预浓缩等步骤。

### 3.4

**子样本** sub-sample

从样品中取出具有代表性的部分样品。

## 4 样品

### 4.1 样品采集

4.1.1 样品采集应符合 HJ 494 的规定。

4.1.2 采样点应设在再生水处理设施的出水口,或根据试验需求设在再生水管网末端或者再生水使用点。

4.1.3 采样设备和样品容器应保持洁净,使用前用待采样品冲洗 3 次。

4.1.4 瞬时水样和综合水样宜采用有机玻璃采水器进行采样,混合水样和平均水样宜采用自动采样器进行采样。自动采样器规格应符合 HJ/T 372 的规定。

4.1.5 样品应完全装满样品容器。样品容器材质和规格应依据样品的性质、生物毒性检测所需的体积以及保存和储存样品的方式确定。样品容器宜选用瓶盖带聚四氟乙烯衬垫的棕色、螺口、大口玻璃瓶,也可根据检测需求采用聚丙烯、聚乙烯容器。

4.1.6 样品容器上应牢固粘贴标识或标签,采集时记录样品信息,注明编号、采样日期、采样地点和采样者姓名等信息。根据水样的生物毒性测定具体要求,可提供其他必要的样品信息并注明。

4.1.7 子样本的采集:在现场取样后、实验室进一步处理前或样品解冻后从样品中取出部分样品从而获得子样本;采集时间和采样量取决于具体毒性检测要求;采样前应彻底混合样品,同时在采样过程中持续摇动或搅拌保证样品均匀;留存的子样本应单独冷冻存储,直到完成最终毒性检测;子样本应有相应的标识或标签,记录与原样本标签一样的完整信息,同时增加记录子样本采集时间及采样方式。

## 4.2 样品保存、运输及贮藏

4.2.1 样品保存、运输及贮藏应符合 HJ 493 的规定。

4.2.2 采样后,样品应立即冷藏避光保存,冷藏温度宜为  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 。

4.2.3 运输过程中应防止样品容器霜冻、破裂、温度升高或外部污染。

4.2.4 样品毒性测试应在 72 h 内完成。样品不能在 72 h 内完成测试时,应尽快分装样品并于一  $20^{\circ}\text{C}$  冷冻保存,保存时间应小于或等于 60 d;样品分装宜采用 1 L 容器,每个容器分装不超过 0.5 L;对于样品需求量更大的测试,样品应分装于多个容器,每个容器不超过 10 L。

4.2.5 如有特定要求,应针对不同样品类型和生物毒性检测要求分别确定贮藏保存方法和周期。

## 5 样品前处理

### 5.1 一般要求

5.1.1 样品前处理过程中所用试剂和水,除非另有规定,应使用分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的三级水。

5.1.2 样品前处理过程中所用仪器设备,与样品接触部分的材质应不易浸出化学物质且在化学和生物方面应具有惰性,宜采用玻璃、聚四氟乙烯等材质。

5.1.3 根据生物毒性检测的具体要求,可选择但不限于样品前处理的下列过程,包括样品的解冻与混匀、可溶性和颗粒组分的分离、pH 调节、预浓缩等步骤。

### 5.2 解冻与混匀

5.2.1 冷冻保存的样品应在温度不大于  $25^{\circ}\text{C}$  的水浴中完全解冻,也可在  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$  下避光放置过夜直到完全解冻。解冻的样品不应再次冷冻。

5.2.2 解冻同时缓缓搅拌或摇动使样品混匀,保证可溶性组分和颗粒组分的均匀分布,避免挥发性成分的损失。

5.2.3 试验报告中应详细记录样品的解冻与混匀过程。

### 5.3 可溶性和颗粒状组分的分离

5.3.1 对于含有大量颗粒物的样品,放置 30 min~120 min 后,用移液管直接移取上清液。也可采用孔径大于  $50\text{ }\mu\text{m}$  的滤膜进行粗过滤,或使用离心机于  $6\,000\text{ r/min}$  下离心 10 min。

5.3.2 对于富含细菌的样品,可采用膜过滤( $0.22\text{ }\mu\text{m}$ )等方法进行灭菌处理。

5.3.3 样品过滤时应满足以下要求:

- a) 滤膜材料应由惰性材料制成,如玻璃纤维膜;
- b) 使用前用水冲洗过滤器;
- c) 采用待测样品预处理过滤器;
- d) 在一定压力或真空下进行过滤;
- e) 样品过滤处理时,应进行质量控制,测定过滤器的回收率;
- f) 样品预浓缩前,必须进行过滤。

5.3.4 试验报告中应详细记录样品的可溶性组分和颗粒状组分的分离方法及过程。

## 5.4 pH 调节

5.4.1 样品 pH 值应为 6.0~9.0。

5.4.2 pH 值超过测试生物的耐受极限(发光菌 pH 值为 6~9,大型蚤 pH 值为 6.5~8.5,鱼类 pH 值为 6~9)时,样品应调整至 pH 值为  $7.0 \pm 0.2$ 。

5.4.3 调节 pH 值所需的酸或碱的浓度应使得体积变化尽可能小,酸或碱不应与样品中的成分发生沉淀或络合反应,也不应对生物测试造成影响。通常推荐使用盐酸或氢氧化钠溶液。

## 5.5 预浓缩

5.5.1 分析样品中低浓度污染物毒性,或检测特定的体外生物毒性时,应对样品进行预浓缩,即对样品中的污染物进行选择性的富集。

5.5.2 应根据生物毒性检测的要求选择预浓缩的具体方法,尽量去除样品的基质组分(如盐以及可能掩盖样品毒性的营养物质)。

5.5.3 预浓缩应考虑以下因素:

- a) 选择预浓缩方法前,应对预浓缩方法对水样毒性检测结果的影响进行评估;
- b) 充分考虑预浓缩的选择性程度和浓缩系数,不可将预浓缩样品的急性毒性测试的效应推断为原始样品的慢性影响;
- c) 有机污染物组分宜采用液液萃取、固相萃取等方法;
- d) 蒸发、冷冻干燥和萃取应考虑挥发性物质的损失的影响;
- e) 蒸发和冷冻干燥应考虑离子强度和渗透压提高的影响;
- f) 超滤应考虑穿透膜的小分子的损失带来的影响;
- g) 应考虑预浓缩过程中某些化合物浓度超过其溶解度时产生的物质沉淀或絮凝的影响。

5.5.4 试验报告中应详细记录样品的预浓缩方法及过程。

## 6 样品前处理示例

几种常见的生物毒性检测方法的样品前处理示例参见附录 A,分别为发光菌急性毒性检测试验、水生生物毒性检测试验、哺乳动物毒性检测试验和细胞毒性检测试验的样品采集后的实验室前处理过程。

## 7 质量控制

7.1 设置现场空白样本,作为样本对采样过程进行分析,以识别与取样容器污染和取样过程有关的误差。

7.2 设置阳性对照,将生物毒性检测中会产生阳性结果的对照物加入空白样本中,作为样本对前处理过程进行分析。

7.3 设置平行样。

7.4 当需要在现场或实验室过滤样品时,应使用与实验室样品相同的过滤程序处理现场空白和阳性对照样品。

附 录 A  
(资料性附录)  
样品前处理示例

A.1 发光菌急性毒性检测试验前处理

A.1.1 概述

本步骤处理后的样品适用于发光菌急性毒性检测试验,为减少样品中悬浮颗粒对发光菌急性毒性检测结果的干扰,样品需过滤处理后再进行稀释。

A.1.2 试剂或材料

A.1.2.1 氯化钠。

A.1.2.2 玻璃纤维膜:5  $\mu\text{m}$ 。

A.1.3 仪器设备

过滤装置:带有真空泵的砂芯过滤装置。

A.1.4 试验步骤

A.1.4.1 样品过滤:采用玻璃纤维膜对待测样品进行过滤。

A.1.4.2 样品稀释:根据试验需求,用水稀释样品配成不同浓度的试验溶液,在定容前按每 100 mL 样品加入 3 g 氯化钠的浓度添加氯化钠。

A.2 水生生物毒性检测试验前处理

A.2.1 概述

本步骤处理后的样品适用于多种水生生物毒性检测试验,包括:大型蚤、鱼类、大型甲壳类等水生生物的急性毒性、慢性毒性等毒性检测试验,为减少样品中悬浮颗粒对水生生物毒性检测结果的干扰,样品需过滤处理后再进行稀释、温度及溶解氧的调节。

A.2.2 试剂或材料

A.2.2.1 盐酸溶液:0.1 mol/L。

A.2.2.2 氢氧化钠溶液:0.1 mol/L。

A.2.2.3 氯化钙溶液:称取 11.76 g 氯化钙( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )溶于水,用水稀释至 1 L。

A.2.2.4 硫酸镁溶液:称取 4.93 g 硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )溶于水,用水稀释至 1 L。

A.2.2.5 碳酸氢钠溶液:称取 2.59 g 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )溶于水,用水稀释至 1 L。

A.2.2.6 氯化钾溶液:称取 0.23 g 氯化钾( $\text{KCl}$ )溶于水,用水稀释至 1 L。

A.2.2.7 玻璃纤维膜:5  $\mu\text{m}$ 。

A.2.3 仪器设备

A.2.3.1 曝气泵。

A.2.3.2 过滤装置:带有真空泵的砂芯过滤装置。

A.2.3.3 溶氧仪。

#### A.2.4 试验步骤

A.2.4.1 样品过滤:采用玻璃纤维膜对待测样品进行过滤。

A.2.4.2 标准稀释水的制备:氯化钙溶液、硫酸镁溶液、碳酸氢钠溶液及氯化钾溶液分别移取 25 mL 加以混合,并用水稀释至 1 L,混匀后曝气,同时用溶氧仪测定,直至溶解氧浓度达到空气饱和值后,再用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节溶液 pH 值为  $7.0 \pm 0.2$ 。

A.2.4.3 样品稀释:根据试验需求,用标准稀释水(A.2.4.2)稀释样品配成不同浓度的试验溶液进行毒性检测试验。

A.2.4.4 稀释后样品温度调节:根据受试生物的不同,维持待测样品温度在合适范围。

A.2.4.5 稀释后样品溶解氧调节:使用曝气泵曝气,维持待测样品溶解氧不低于空气饱和值的 60%。

### A.3 哺乳动物毒性检测试验前处理

#### A.3.1 概述

本步骤处理后的样品适用于多种哺乳动物毒性检测试验,包括:小鼠、大鼠、兔子等哺乳动物的急性毒性、慢性毒性等毒性检测试验,为减少样品中悬浮颗粒对哺乳动物毒性检测结果的干扰,样品需过滤处理后再进行 pH 调节及稀释。

#### A.3.2 试剂或材料

A.3.2.1 盐酸溶液:0.1 mol/L。

A.3.2.2 氢氧化钠溶液:0.1 mol/L。

A.3.2.3 玻璃纤维膜:5  $\mu\text{m}$ 。

#### A.3.3 仪器设备

过滤装置:带有真空泵的砂芯过滤装置。

#### A.3.4 试验步骤

A.3.4.1 样品过滤:采用玻璃纤维膜对待测样品进行过滤。

A.3.4.2 样品 pH 调节:用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节样品 pH 值为  $7.0 \pm 0.2$ 。

A.3.4.3 样品稀释:根据试验需求,用水稀释样品配成不同浓度的试验溶液进行毒性检测试验。

### A.4 细胞毒性检测试验前处理

#### A.4.1 概述

本步骤包括固相萃取和液液萃取两种方法,可根据毒性检测试验的需求进行选择,处理后的样品适用于多种细胞及多种毒性指标检测试验,细胞包括:各种人体细胞系、小鼠细胞系、大鼠细胞系等;毒性指标包括:细胞增殖抑制率、遗传毒性、氧化应激效应、细胞酶活、内分泌干扰效应、致突变性等。为防止样品中悬浮颗粒堵塞固相萃取柱,影响萃取效率,在固相萃取前需对样品进行过滤。

#### A.4.2 试剂或材料

A.4.2.1 硫酸钠。

A.4.2.2 甲醇。

A.4.2.3 二甲基亚砜(DMSO)。

A.4.2.4 甲基叔丁基醚。

A.4.2.5 盐酸溶液:5 mmol/L。

A.4.2.6 硫酸溶液(70%)。

A.4.2.7 丙酮-正己烷溶液:1+1。

A.4.2.8 HLB 固相萃取柱(500 mg)。

A.4.2.9 椰子壳活性炭固相萃取柱(coconut charcoal cartridge,2 g)。

A.4.2.10 玻璃纤维膜:0.45  $\mu\text{m}$ 。

#### A.4.3 仪器设备

A.4.3.1 过滤装置:带有真空泵的砂芯过滤装置。

A.4.3.2 固相萃取仪。

A.4.3.3 分液漏斗:2 L。

A.4.3.4 氮吹仪。

A.4.3.5 旋转蒸发仪:配有带刻度的尖底浓缩瓶。

#### A.4.4 固相萃取

A.4.4.1 样品过滤:采用 0.45  $\mu\text{m}$  玻璃纤维膜对待测样品进行过滤。

A.4.4.2 固相萃取柱的活化:依次用 10 mL 丙酮-正己烷溶液、10 mL 甲醇以及 10 mL 盐酸溶液对固相萃取柱进行活化。

A.4.4.3 样品富集:取 1 L 样品,采用固相萃取仪依次经 HLB 固相萃取柱和椰子壳活性炭固相萃取柱进行富集,流速约为 3 mL/min~5 mL/min。

A.4.4.4 洗脱与浓缩:待萃取柱干燥后,分别依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 丙酮-正己烷溶液淋洗两种固相萃取柱,将四份淋洗液收集混合,采用氮吹仪氮吹至近干,再用 1 mL 二甲基亚砜溶解定容,得到浓缩 1 000 倍的样品。浓缩后的样品在 4  $^{\circ}\text{C}$  下避光保存。

A.4.4.5 样品稀释:根据试验需求,用二甲基亚砜稀释浓缩后的样品配成不同浓缩倍数的试验溶液进行细胞毒性检测试验。

#### A.4.5 液液萃取

A.4.5.1 pH 调节:采用硫酸溶液调节样品至 pH 值小于 0.5。

A.4.5.2 浓缩:取 1 L 样品,置于分液漏斗中,加入 100 g 硫酸钠混匀,再加入 100 mL 甲基叔丁基醚,上下摇晃 15 min 后,静置待溶液分层。取有机相置于带刻度的尖底浓缩瓶,放入旋转蒸发仪中,于 40  $^{\circ}\text{C}$  旋转蒸发浓缩至 2 mL 左右,取出将浓缩液转移至 15 mL 试管,用 10 mL 甲基叔丁基醚冲洗尖底浓缩瓶,冲洗液一并倒入 15 mL 试管,采用氮吹仪氮吹至近干,最后用 1 mL 二甲基亚砜溶解定容,得到浓缩 1 000 倍的样品。浓缩后的样品在 4  $^{\circ}\text{C}$  下避光保存。

A.4.5.3 样品稀释:根据试验需求,用二甲基亚砜稀释浓缩后的样品配成不同浓缩倍数的试验溶液进行细胞毒性检测试验。



参 考 文 献

- [1] GB/T 19923—2005 城市污水再生利用 工业用水水质
-