

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20201105002

王绿平, 张京佺, 赵华清. 稀有鮕鲫作为鱼类胚胎急性毒性试验受试鱼种的敏感性研究[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(5): 102-112

Wang L P, Zhang J J, Zhao H Q. Sensitivity of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) for fish embryo acute toxicity test [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(5): 102-112 (in Chinese)

稀有鮕鲫作为鱼类胚胎急性毒性试验受试鱼种的敏感性研究

王绿平*, 张京佺, 赵华清

上海市检测中心生物与安全检测实验室, 上海 201203

收稿日期: 2020-11-05 录用日期: 2021-01-04

摘要: 通过验证稀有鮕鲫在鱼类胚胎急性毒性试验中的敏感性, 评价其在鱼类替代试验中的应用潜力, 为相关化学品测试国家标准的制定提供依据。选取 3,4-二氯苯胺(3,4-DCA)、五水硫酸铜(CSP)、2,3,6-三甲基苯酚(2,3,6-TMP)、二甲基亚砜(DMSO)、七水硫酸锌(ZSH)、三甘醇(TEG)、氯化钠(SC)、十二烷基硫酸钠(SDS)、重铬酸钾(PD)、甲基异噻唑啉酮(MIT)、二苯甲酮(BP)、二氯苯氧氯酚(TCS)、1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT)、三唑酮(T)、多菌灵(C)和 N-(4-氯苯基)-N'-(3,4-二氯苯基)脒(三氯卡班, TCC)16 种化学品, 按照《OECD 化学品测试准则 No. 236 鱼类胚胎急性毒性试验》, 分别进行稀有鮕鲫胚胎急性毒性试验, 将结果与稀有鮕鲫成鱼急性毒性试验结果比较, 评价稀有鮕鲫在不同生命周期对同一化学品的敏感性差异; 同时与已有的或试验所得的斑马鱼胚胎急性毒性试验结果比较, 评估稀有鮕鲫胚胎与国际标准试验鱼种胚胎间的敏感性差异。稀有鮕鲫胚胎急性毒性试验 96 h 半数致死浓度(96 h-LC₅₀)值与其成鱼及斑马鱼相比, 敏感性类似, 毒性值差异均未超过一个数量级。稀有鮕鲫作为一种中国本土的标准试验鱼种, 其胚胎生物学特征与斑马鱼类似, 其胚胎敏感性不亚于成鱼和其他国际标准鱼种, 适宜进行鱼类胚胎急性毒性试验的应用。

关键词: 稀有鮕鲫; 胚胎; 急性毒性; 敏感性

文章编号: 1673-5897(2021)5-102-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Sensitivity of Chinese Rare Minnows (*Gobiocypris rarus*) for Fish Embryo Acute Toxicity Test

Wang Lvping*, Zhang Jingji, Zhao Huaqing

Bioassay and Safety Assessment Laboratory, Shanghai Academy of Public Measurement, Shanghai 201203, China

Received 5 November 2020 accepted 4 January 2021

Abstract: This study aims to evaluate the sensitivity of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as test organisms used in fish embryo acute toxicity test, and to lay a foundation for the proposed national standards of chemical testing which uses fish embryo as an alternative to fish itself in acute toxicity test. According to the procedures of “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity Test”, newly fertilized eggs of rare minnow were exposed to sixteen chemicals, i.e., 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), copper sulfate pentahydrate (CSP), 2,3,6-trimethylphenol (2,3,6-TMP), dimethyl sulfoxide (DMSO), zinc sulfate (ZSH), triethylene glycol (TEG), sodium chloride (SC), sodium dodecyl sulfate (SDS), potassium bichromate (PD), 2-methyl-4-isothiazolin-

基金项目: 上海市自然科学基金资助项目(17ZR1424400); 上海市技术性贸易措施应对专项(16TBT009)

第一作者: 王绿平(1986—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向为生态毒理学, E-mail: wanglp@apm.sh.cn; lvping_wang@139.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wanglp@apm.sh.cn; lvping_wang@139.com

3-one (MIT), benzophenone (BP), triclosan (TCS), 1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT), triadimefon (T), carbendazim (C) and triclocarban (TCC), and then, the respective median lethal concentration of the 96 h exposure (96 h-LC₅₀) were obtained for each chemical. By comparing the rare minnow embryo test data with the corresponding data from adult fish tests as well as those resulted from the zebra fish embryo tests, it can be found that the differences in toxicity values of different test organisms are not more than an order of magnitude, implying that the sensitivity of rare minnow embryos to studied chemicals in acute toxicity test is similar to adult rare minnow and zebra fish embryos. In conclusion, the endemic fish species *Gobiocypris rarus* is one of the promising candidates of standard fish species, and its embryos can produce reliable data in fish embryo acute toxicity tests.

Keywords: *Gobiocypris rarus*; embryo; acute toxicity; sensitivity

水生生物毒性测试广泛应用于评估化学品的水生态环境安全,而鱼类作为水生生态环境体系中的顶级脊椎动物,具有不可替代的地位,其生态毒性数据为水生生态风险评估与风险管理提供基础,具有重要的作用和意义^[1-4]。随着替代(replacement)、减少(reduction)、优化(refinement)(3Rs)原则^[5]在哺乳动物毒性测试中的广泛认可,近年来,该理念在环境毒理学领域的延伸也逐渐被关注^[6]。欧盟分别于2009年和2013年,禁止用化妆品原料进行脊椎动物试验以及禁止销售用动物试验检测的化妆品原料及成品。此外,欧洲《化学品的注册、评估、授权和限制》(REACH)法规也高度关注化学品毒性测试中实验动物福利问题,提倡减少测试中脊椎动物的数量,推动非动物测试(如胚胎、细胞和组织等)和替代策略的开发和验证^[7]。目前,国际上首选鱼类急性毒性试验的替代方法,在2012年完成验证^[8-9],于2013年由国际经济合作与发展组织(OECD)颁布,鱼类胚胎急性毒性试验(Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test,简称 OECD 236)^[10]方法中指定的实验生物为斑马鱼(*Danio rerio*)受精卵。

采用胚胎进行毒性试验除了可满足现行动物福利法规的要求,还存在以下几个优势。(1)亲鱼体型小,易于饲养、管理方便。(2)产卵量大。通常情况下亲鱼每次可产卵几百枚至上千枚不等,对于单个试验而言,同一起来源的大批量受精卵可满足统计学意义上的各类分析。(3)试验体系小。整个试验可在24孔细胞板中完成,节约了空间和成本的同时,还减少了样品的用量和废液的排放。(4)测试周期短,试验周期为96 h。从受精卵开始,通过卵黄囊吸收营养,胚胎可在24孔细胞板中存活多天,完全可以满足试验需求。且与传统鱼类急性毒性试验一致,结果具有一定可比性。(5)斑马鱼胚胎具有光学透明性^[11],可通过显微镜观察各发育阶段的形态特征,定期观

察各种效应指标(致死或致畸),为毒理学研究提供依据。(6)运用一定的标记技术,可透过细胞膜,准确地观察某个基因在组织器官或个体中的表达。

鱼类胚胎急性毒性试验在技术上操作方便,试验结果稳定性及重复性较高^[12]。与传统的成鱼或幼鱼的急慢性试验相比,更为灵敏且能提供更多的观察效应指标。不仅可用于研究化学品的环境毒性,还可用于对污水、废水的监测和控制。在德国,斑马鱼胚胎已经作为水质监测的标准实验材料,取代了用成鱼进行的毒理学研究^[13-14]。由于胚胎期对外源化学物质相对敏感,研究也表明,鱼类胚胎急性毒性数据与鱼类急性毒性数据之间有着高度相关性^[15]。因此,很多欧美国家已逐渐避免使用成鱼或幼鱼作为毒性研究材料,越来越多改用胚胎试验获取毒性数据。

目前全球大部分生态毒性测试,从方法到试验物种,都是在欧美国家的应用研究基础上提出来的,对保护我国生态环境安全没有针对性。就鱼类胚胎急性毒性试验而言,OECD 236中指定的试验物种为斑马鱼(*Danio rerio*)受精卵,并没有涉及其他鱼种。然而生态环境保护是具有区域特异性的,研究化学品对特定区域环境的毒性效应需要有符合我国环境保护特点的试验物种进行测试。稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科鱼类^[16],我国《化学品测试方法》已将稀有鮡鲫列为推荐受试鱼种之一^[17-19]。其亲鱼性成熟时间短,繁殖季节长,产卵量大,可常年人工繁殖,因此具有成为中国特有模式鱼种的潜能。由于其胚胎也具有光学透明性,可透过卵膜清晰观察胚胎发育,同时其胚胎的形态特征、发育过程及孵化时间也与多数淡水硬骨鱼类类似^[20]。因此,以稀有鮡鲫为实验材料,开展相关的胚胎毒理学研究有一定的基础依据。此外,稀有鮡鲫生物学特征研究已较为系统,研究工作涉及鱼病学、

遗传学、环境科学、胚胎学和生理学等领域^[21-24]。在此基础上,开展稀有鮡鲫在胚胎领域的毒理学研究将推动我国特有标准试验鱼种用于生态毒性测试的可持续战略,拓展稀有鮡鲫在毒性测试中的使用范围,为其最终成为国际公认的标准试验物种创造条件。

无论是科学研究、环境监测还是毒性检测,实验动物的质量是实验数据可重复性(repeatability)、再现性(reproducibility)和敏感性(sensibility)的基石。研究表明,稀有鮡鲫在鱼类胚胎急性毒性试验中的结果重复性良好^[25],需评估稀有鮡鲫在鱼类胚胎急性毒性试验中的敏感性。本研究选取16种不同种类的化学品开展稀有鮡鲫胚胎急性毒性试验,通过试验和已有文献资料相结合的方式,分别将稀有鮡鲫胚胎与斑马鱼胚胎,稀有鮡鲫胚胎与其成鱼进行比较,研究稀有鮡鲫胚胎的敏感性和可比性。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究中所使用的稀有鮡鲫亲鱼源自中国科学院水生生物研究所,为野生型封闭群(Ihb: IHB),或引种后自行繁育。为保证良好的受精率,选择实验室驯养条件下无肉眼可观察到感染或疾病、未经任何药物处理且已繁殖至少2次以上的稀有鮡鲫。鱼类驯养室内昼夜由定时器控制,提供12 h(光):12 h(暗)的循环光照;水温维持在 $(23\pm 2)^\circ\text{C}$,每日投喂冷冻水蚯蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)2次(早晚各1次)。试验用鱼卵以分组产卵方式获得,即将6尾性成熟的稀有鮡鲫(雌雄比为1:2),于试验当天早晨置于交配盒中,为防止亲鱼捕食鱼卵,在交配盒中放入网架(孔径大小约为 $(2\pm 0.5)\text{ mm}$)。为能够获得足够数量的鱼卵,平行准备6组。待灯光转暗后1~2 h,取出亲鱼,收集鱼卵。

斑马鱼亲鱼来源于国家斑马鱼资源中心,为野生型AB系。实验室驯养条件下的斑马鱼无肉眼可观察的感染或疾病,且未经任何药物处理。试验所使用的亲鱼已繁殖至少2次以上,以保证有良好的受精率。鱼类驯养室内昼夜由定时器控制,提供12 h(光):12 h(暗)的循环光照;水温维持在 $(23\pm 2)^\circ\text{C}$,每日投喂冷冻水蚯蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)2次(早晚各1次)。试验用鱼卵以分组产卵方式获得,即将6尾性成熟的斑马鱼(雌雄比为1:2),于试验前一天晚上置于交配盒中,为防止亲鱼捕食鱼卵,在交配盒中放入网架(孔径大小约为 $(2\pm 0.5)\text{ mm}$)。为能

够获得足够数量的鱼卵,平行准备6组。第2天待灯光转亮后1~2 h,取出亲鱼,收集鱼卵。

采用体视显微镜观察,选择受精且无明显不规则分裂(如不对称、囊泡形成)或破损的鱼卵进行试验。如果试验用鱼卵为 n ,则取总数为 $2n$ 的鱼卵进行镜检,挑选出合格受精卵(x)备用,并计算其受精百分率($x/2n\times 100\%$)。

1.1.2 受试化学品

参考OECD斑马鱼胚胎急性毒性试验验证报告^[9]和实验室已有数据,选取16种不同类别的化学品(表1)进行鱼类胚胎急性毒性试验。同时,进行其中14种化学品的鱼类急性毒性试验。

1.1.3 试验用水

试验用水为标准稀释水(表2),并在恒温储水箱中连续曝气至氧饱和,恒温 $(23\pm 2)^\circ\text{C}$ 。水硬度为 $100\sim 300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 CaCO_3 计),pH为6.5~8.5。

1.1.4 仪器设备和试验容器

体式显微镜(Lumar V12, Carl Zeiss, 德国);药品稳定性试验箱(MT-750B, 施都凯仪器设备有限公司, 中国);多参数水质分析仪(WTW 3430, Thermo Fisher, 美国);电子分析天平(AL204, Mettler Toledo, 瑞士);精密型照度仪(KIMO HQ210, 法国);总有机碳分析仪(Multi N/C 3100, 耶拿公司, 德国);微电脑总硬度浓度测定仪(HI96735, HANNA 仪器公司, 德国)。灭菌24孔标准带盖板;5 L玻璃圆缸。

1.2 鱼类胚胎急性毒性试验方法

按照《OECD 化学品测试准则 No. 236 鱼类胚胎急性毒性试验》^[10]进行试验设计并制定试验方案,选用3,4-二氯苯胺(3,4-DCA)、五水硫酸铜(CSP)、2,3,6-三甲基苯酚(2,3,6-TMP)、二甲基亚砜(DMSO)、七水硫酸锌(ZSH)、三甘醇(TEG)、氯化钠(SC)、十二烷基硫酸钠(SDS)、重铬酸钾(PD)、甲基异噻唑啉酮(MIT)、二苯甲酮(BP)、二氯苯氧氯酚(TCS)、1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT)、三唑酮(T)、多菌灵(C)和N-(4-氯苯基)-N'-(3,4-二氯苯基)脒(三氯卡班, TCC)16种化学品分别进行稀有鮡鲫和斑马鱼胚胎急性毒性试验,评价稀有鮡鲫胚胎对化学品的敏感性。

1.2.1 试验原理

将新受精的鱼类胚胎暴露于不同浓度的样品水溶液中96 h。期间每24 h,观察并记录以下1~4个死亡表征:(1)卵凝结;(2)体节缺失;(3)尾部未分离;(4)无心跳。当暴露结束时,通过上述4个表征的阳性结果确定急性毒性,并计算半数致死浓度(LC_{50})值。

表 1 受试化学品基本信息

Table 1 The basic information of the test chemicals

化学品名 Chemical name	分子式 Molecular formula	CAS 号 CAS number	纯度 Purity	批号 Batch No	生产商 Manufacturer
3,4-二氯苯胺(3,4-DCA) 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA)	C ₆ H ₅ Cl ₂	95-76-1	>98%	FHJ01-AMNI	TCI
五水硫酸铜(CSP) Copper sulfate pentahydrate (CSP)	CuSO ₄ ·5H ₂ O	7758-99-8	99%	C10000665	Macklin
2,3,6-三甲基苯酚(2,3,6-TMP) 2,3,6-trimethylphenol (2,3,6-TMP)	C ₉ H ₁₂ O	2416-94-6	>98.0%	N6BDM-IL	TCI
二甲基亚砜(DMSO) Dimethyl sulfoxide (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	67-68-5	≥99.5%	BCBV2983	Sigma-Aldrich
七水硫酸锌(ZSH) Zinc sulfate (ZSH)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7446-20-0	≥99.5%	BCBS9911	Sigma-Aldrich
三甘醇(TEG) Triethylene glycol (TEG)	C ₆ H ₁₄ O ₄	112-27-6	99%	STBG9386	Sigma-Aldrich
氯化钠(SC) Sodium chloride (SC)	NaCl	7647-14-5	99.5%	C10042430	Macklin
十二烷基硫酸钠(SDS) Sodium dodecyl sulfate (SDS)	C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na	151-21-3	≥98.5%	SLBR9016V	Sigma-Aldrich
重铬酸钾(PD) Potassium dichromate (PD)	K ₂ Cr ₂ O ₇	7778-50-9	≥99.8%	20140708	国药集团化学试剂有限公司 Sinopharm Chemical Reagent Co. LTD
2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(MIT) 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MIT)	C ₄ H ₅ NOS	2682-20-4	95%	L6C0S119	百灵威 J&K Chemical
二苯甲酮(BP) Benzophenone (BP)	C ₆ H ₅ COC ₆ H ₅	119-61-9	>99.0%	5VW2J-RO	TCI
二氯苯氧氯酚(TCS) Triclosan (TCS)	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	3380-34-5	>98.0%	5SP7D-EQ	TCI
1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT) 1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT)	C ₇ H ₅ NOS	2634-33-5	>98.0%	EJQ4C-CC	TCI
三唑酮(T) Triadimefon (T)	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	43121-43-3	98.0%	5-HBN-152-1	TRC(加拿大 Canada)
多菌灵(C) Carbendazim (C)	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	10605-21-7	98.0%	LHA0R15	百灵威 J&K Chemical
N-(4-氯苯基)-N'-(3,4-二氯苯基)脲 (三氯卡班,TCC) Triclocarban (TCC)	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O	101-20-2	>98.0%	GF01-CCOJ	TCI

表 2 标准稀释水的配制方法

Table 2 The preparation method of standard diluted water

化学品名 Chemical name	分子式 Molecular formula	浓度/(g·L ⁻¹) Concentration/(g·L ⁻¹)
贮备液 a Stock solution a	CaCl ₂ ·2H ₂ O	11.76
贮备液 b Stock solution b	MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.93
贮备液 c Stock solution c	KCl	0.23
贮备液 d Stock solution d	NaHCO ₃	2.59
标准稀释水 Standard diluted water	去离子水的电导率≤10 μS·cm ⁻¹ ,将上述 4 种贮备液各 25 mL 加以混合并用去离子水稀释至 1 L,使用前连续曝气 24 h 以上待用 The conductivity of deionized water is ≤10 μS·cm ⁻¹ . 25 mL of each stock solution were mixed and diluted to 1 L with deionized water, and continuously aerated for more than 24 h before use	

注:贮备液及标准稀释水均使用分析纯试剂和去离子水配制而成。

Note: Both the stock solutions and standard diluted water were prepared with pure analytical reagent and deionized water.

1.2.2 试验条件

试验用水为标准稀释水,并在储水箱中 24 h 连续曝气;试验温度(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$;每天 12 h 光照。暴露时间:96 h。试验开始:最晚在 16 细胞期前暴露于试验溶液中。试验方式:更新式,更新频率为 24 h。试验溶液:在已预处理 24 h 的 24 孔板中,每孔注入新鲜制备的试验溶液。

1.2.3 试验操作

母液制备:可溶化学品(CSP、DMSO、ZSH、TEG、SC、SDS、PD 和 MIT)均于试验当天,称取适量样品直接溶于一定体积的试验用水中配制成高浓度的样品母液,其中 CSP 和 ZSH 用去离子水配制。低水溶性化学品(3,4-DCA、2,3,6-TMP、BP、TCS、BIT、T 和 C)于试验前 3 d,称取适量样品添加到一定体积的试验用水中,避光连续磁力搅拌 72 h,经 0.45 μm 硝酸纤维素膜过滤后配制成试验体系下的样品饱和溶液作为样品母液。难溶性化学品(TCC)用助溶剂 DMSO 配制系列浓度的样品母液。

试验溶液制备:根据母液实测浓度,将适量的样品母液添加到试验用水中,配制成一定浓度的试验溶液。

暴露浓度:根据文献数据和预试验结果,各化学品设置 5 或 6 个试验浓度组(表 3),均以几何级数分

布,浓度的间隔系数不超过 2.2,同时,每组设 1 个空白对照组(试验用水),对于斑马鱼,另设置 1 个 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3,4-DCA 阳性对照组,所有试验组均不设平行。

胚胎分配:所有试验均在标准 24 孔板中完成,每孔 1 个受精卵。样品组各浓度 20 个/板;以试验用水为介质,在上述各板中另放入 4 个鱼卵作为板内质控;空白对照组 24 个/板;阳性对照组(3,4-DCA, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,斑马鱼适用)(图 1)。

观察与记录:按 1.2.4 描述的原则进行观察和记录。试验结束时,如板内质控死亡超过 1 个,则整板无效,该浓度组剔除。

水质参数测定:在试验开始和结束时测定对照组和最高浓度样品组的硬度和电导率,试验期间每次更新前后测定空白对照组和最高浓度样品组的 pH。在试验结束时,测定空白对照组和最高浓度样品存活胚胎组的溶解氧浓度。试验期间,每日测定 1 次温度,测定温度时,随机选取 3 个试验容器进行测定。

1.2.4 死亡表征的观察和判定

每个受试胚胎每 24 h 观察以下几个终点:卵凝结、体节未形成、尾部未与卵黄囊分离、失去心跳,观察到上述表征之一即可判定死亡。此外,从 48 h 开始,每日观察 1 次样品组和空白对照组的孵化数。

表 3 各化学品在鱼类胚胎急性毒性试验中的浓度设置

Table 3 Concentrations of each chemical in Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test

化学品 Chemical	稀有鮰鲫胚胎 <i>Gobiocypris rarus</i> embryo	斑马鱼胚胎 <i>Danio rerio</i> embryo
3,4-DCA($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	5, 7, 10, 13, 20	0.5, 1, 2, 4, 8*
CSP($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.7, 1, 1.5, 2.3, 3.5	0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4*
2,3,6-TMP($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	10, 15, 22, 33, 50	8, 12, 18, 27, 40.5*
DMSO($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	20, 30, 45, 67, 100	10, 17, 28.9, 49.13, 83.521*
ZSH($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	4, 6, 9, 13.5, 20	93.6, 148, 222, 333, 500
TEG($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	15, 24, 39, 63, 100	20, 30, 45, 67.5, 101.25*
SC($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	2, 3.2, 5.1, 8.2, 13	1, 2, 4, 8, 16*
SDS($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	4, 6.8, 11.6, 19.7, 33.5	1.2, 1.8, 2.7, 4, 6
PD($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	198, 297, 445, 667, 1 000	482, 578, 694, 833, 1 000
MIT($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	9.48, 14.2, 21.4, 32, 48	14.2, 21.4, 32, 48, 72
BP($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.0, 8.0, 12, 19, 30	5.0, 8.0, 12, 19, 30
TCS($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.0886, 0.124, 0.174, 0.243, 0.340, 0.476	0.0886, 0.124, 0.174, 0.243, 0.340
BIT($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.0, 4.15, 6.75, 10.1, 15.2	2.62, 3.28, 4.10, 5.12, 6.4, 8.0
T($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	14, 18, 24, 31, 40	14, 18, 24, 31, 40
C($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.370, 0.555, 0.833, 1.25, 1.87, 2.80	0.370, 0.555, 0.833, 1.25, 1.87, 2.80
TCC($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.0709, 0.130, 0.230, 0.414, 0.745	0.0443, 0.0709, 0.113, 0.181, 0.290, 0.464

注:* 文献数据^[12]。

Note: * literature data^[12].

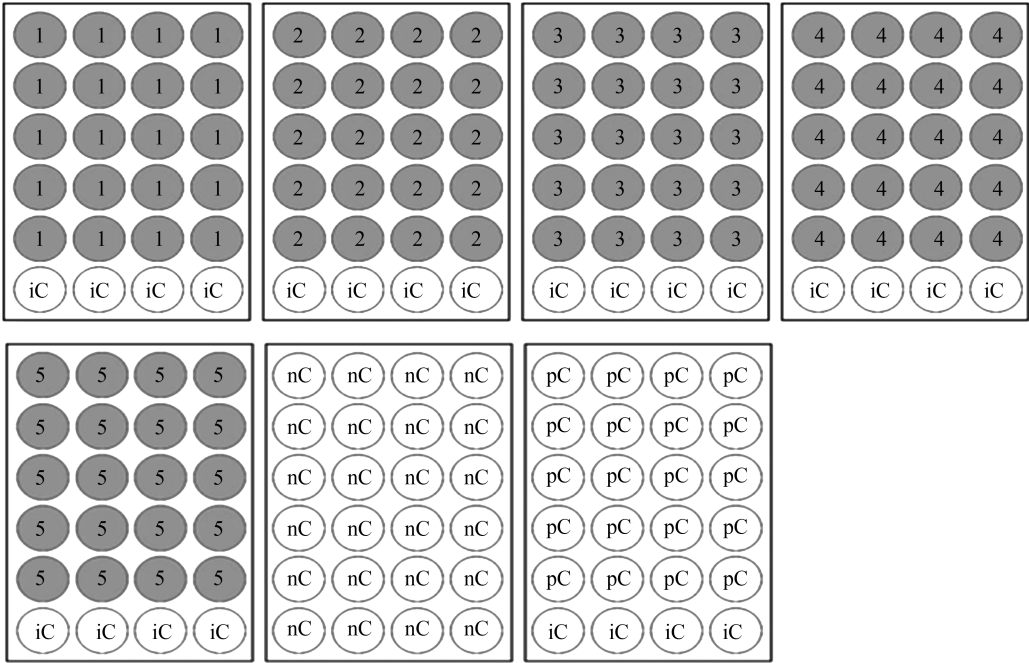


图 1 鱼类胚胎急性毒性 (FET) 试验 24 孔板布局图

注:1~5 为 5 个试验浓度样品组;nC 为空白对照组(试验用水);iC 为板内质控(试验用水);
pC 为阳性对照组(3,4-DCA,4 mg·L⁻¹,斑马鱼适用)。

Fig. 1 Layout of 24-well plate for Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test

Note: 1~5 represent five test concentration groups; nC represents blank control group (test water); iC represents quality control
in test plate (test water); pC represents positive control group (3,4-DCA, 4 mg·L⁻¹, for *Danio rerio*).

1.2.5 试验有效性判断

参照 OECD TG 236, 本试验有效性判断原则为:试验用胚胎总受精率 $\geq 70\%$; 试验期间, 试验容器中温度维持在 $(26\pm 1)^\circ\text{C}$ 之间; 试验结束时, 空白对照组胚胎存活率 $\geq 90\%$, 空白对照组胚胎孵化率 $\geq 80\%$, 阳性对照组(3,4-DCA, 4 mg·L⁻¹, 斑马鱼适用)死亡率至少为 30%, 空白对照组和最高浓度样品组试验溶液的溶解氧含量 $\geq 80\%$ 空气饱和值。

1.2.6 数据处理

计算试验开始后 24、48、72 和 96 h 各试验组(各板)胚胎的累计死亡率, 绘制浓度-死亡率曲线图。采用点估计法估算 96 h-LC₅₀ 值及 95% 置信限。分析用软件 ToxCalc(v5.0.32)完成。

1.3 鱼类急性毒性试验方法

按照《OECD 化学品测试准则 No. 203 鱼类急性毒性试验》^[12]进行试验设计并制定试验方案, 选用 CSP、2,3,6-TMP、DMSO、ZSH、TEG、SC、SDS、MIT、BP、TCS、BIT、T、C 和 TCC 14 种化学品进行鱼类急性毒性试验, 评价稀有鮡鲫对化学品的敏感性。

1.3.1 试验原理

在规定条件下, 将试验鱼暴露于不同浓度的样

品水溶液中 96 h。在 24、48、72 和 96 h 时分别记录试验鱼的死亡数, 确定 96 h-LC₅₀。

1.3.2 试验条件

试验用水为标准稀释水, 并在储水箱中 24 h 连续曝气; 试验温度 $(23\pm 2)^\circ\text{C}$; 每天 12 h 光照。暴露时间 96 h, 试验方式为更新式, 更新频率为 24 h。

1.3.3 试验操作

母液制备: 可溶化学品 (CSP、DMSO、ZSH、TEG、SC、SDS 和 MIT) 均于试验当天, 称取适量样品直接溶于一定体积的试验用水中配制成高浓度的样品母液。低水溶性化学品 (2,3,6-TMP、BP、TCS、BIT、T 和 C) 于试验前 3 d, 称取适量样品添加到一定体积的试验用水中, 避光连续磁力搅拌 72 h, 经 0.45 μm 硝酸纤维素膜过滤后配制成试验体系下的样品饱和溶液作为样品母液。难溶性化学品 (TCC) 用助溶剂 DMSO 配制系列浓度的样品母液。

试验溶液制备: 根据母液实测浓度, 将适量的样品母液添加到试验用水中, 配制成一定浓度的试验溶液。

暴露浓度: 根据预试验结果, 13 种化学品设置 5

或 6 个试验浓度组(表 4),均以几何级数分布,浓度的间隔系数不超过 2.2;化学品 C 设置 1 个试验浓度组进行限度试验,同时,每组设 1 个空白对照组(试验用水),对于使用助溶剂的样品,另设置 1 个助溶剂对照组,所有试验组均不设平行。

试验鱼分配:所有试验均在盛有 4 L 试验溶液的 5 L 玻璃圆缸中完成,所有试验对照组和各浓度组均放入 7 尾鱼。试验开始前在驯化群随机选择 10 尾鱼进行体质量和总长的测定,并计算试验鱼的承载量。

观察与记录:在试验开始后 0、24、48、72 和 96 h 观察并记录各试验容器内试验鱼的死亡数和异常表征。

水质参数测定:在试验开始前测定一次试验用水的硬度和总有机碳(TOC)。在试验开始、每一次更新前后及试验结束时,测定并记录所有试验溶液的 pH 值、溶解氧和温度。

1.3.4 试验有效性判断

参照 OECD TG 203,本试验有效性判断原则为:试验结束时,空白对照组试验鱼的死亡率≤10%,试验期间,试验容器中温度维持在(23±2)℃之间,溶解氧含量≥60%空气饱和值。

1.3.5 数据处理

计算试验开始后 24、48、72 和 96 h 各试验组试验鱼的累计死亡率,绘制浓度-死亡率曲线图。采用点估计法估算 96 h-LC₅₀ 值及 95% 置信限。分析用软件 ToxCalc(v5.0.32)完成。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 化学品对 2 种鱼类胚胎急性毒性结果比较

各次试验开始时胚胎受精率均超过 70%,空白对照组存活率为 100%,孵化率为 91.7%~100%;斑马鱼试验中,阳性对照组(3,4-DCA,4 mg·L⁻¹)死亡率为 95.0%~100%;样品组板内质控均无死亡发生。试验溶液温度维持在(26±1)℃之间,空白对照组和最高浓度样品组试验溶液的溶解氧含量均超过 80%空气饱和值,根据 1.2.5 描述的原则,本试验有效。

如表 5 所示,16 种化学品对稀有鮕鲫胚胎和斑马鱼胚胎的 96 h-LC₅₀ 值比较可知,稀有鮕鲫胚胎和斑马鱼胚胎对其中 15 种化学品的敏感性相近,其中 TEG、PD、MIT 和 BIT 等 4 种化学品,稀有鮕鲫胚胎的敏感性优于斑马鱼。ZSH 对稀有鮕鲫胚胎的 96 h-LC₅₀ 值为 10.4 mg·L⁻¹,斑马鱼的为 238 mg·L⁻¹,两者差异约 22.9 倍,可见稀有鮕鲫胚胎对 ZSH 异常

表 4 各化学品在鱼类急性毒性 (FAT) 试验中的浓度设置

Table 4 Concentrations of each chemical in Fish Acute Toxicity (FAT) test

化学品 Chemical	稀有鮕鲫成鱼 Adult <i>Gobiocypris rarus</i>
3,4-DCA/(mg·L ⁻¹)	2.0、3.6、6.5、12、21*
CSP/(mg·L ⁻¹)	0.50、0.84、1.4、2.4、4.0
2,3,6-TMP/(mg·L ⁻¹)	9.80、14.7、22、33、50
DMSO/(g·L ⁻¹)	20、30、45、67、100
ZSH/(mg·L ⁻¹)	10、20、39、76、150
TEG/(g·L ⁻¹)	30、45、67、100、150
SC/(g·L ⁻¹)	8.0、8.85、9.80、10.8、12
SDS/(mg·L ⁻¹)	5、6.2、7.7、9.5、12
PD/(mg·L ⁻¹)	50、85、145、250、425*
MIT/(mg·L ⁻¹)	8.19、10.2、12.8、16.0、20.0
BP/(mg·L ⁻¹)	2.81、4.19、6.31、9.43、14.2、21.2
TCS/(mg·L ⁻¹)	0.184、0.239、0.311、0.404、0.525
BIT/(mg·L ⁻¹)	2.62、3.28、4.10、5.12、6.40
T/(mg·L ⁻¹)	7.13、8.20、9.43、10.8、12.5、14.3
C/(mg·L ⁻¹)	100% 饱和溶液 100% saturated concentration
TCC/(mg·L ⁻¹)	0.046、0.065、0.091、0.128、0.179

注:* 文献数据^[27]。
Note: * literature data^[27].

表 5 化学品对 2 种鱼类胚胎的 96 h 半数致死浓度 (96 h-LC₅₀)

Table 5 The median lethal concentration of chemicals at 96 h (96 h-LC₅₀) to two kinds of fish embryos

化学品 Chemical	稀有鮕鲫胚胎 <i>Gobiocypris rarus</i> embryo	斑马鱼胚胎 <i>Danio rerio</i> embryo
3,4-DCA/(mg·L ⁻¹)	12.8	2.7*
CSP/(mg·L ⁻¹)	1.76	0.291*
2,3,6-TMP/(mg·L ⁻¹)	14.1	10.8*
DMSO/(g·L ⁻¹)	51.7	34.1*
ZSH/(mg·L ⁻¹)	10.4	238
TEG/(g·L ⁻¹)	52.0	54.8*
SC/(g·L ⁻¹)	10.4	5.14*
SDS/(mg·L ⁻¹)	18.2	5.13
PD/(mg·L ⁻¹)	534	815
MIT/(mg·L ⁻¹)	31.4	38.9
BP/(mg·L ⁻¹)	25.4	17.9
TCS/(mg·L ⁻¹)	0.260	0.154
BIT/(mg·L ⁻¹)	3.69	7.08
T/(mg·L ⁻¹)	23.2	22.7
C/(mg·L ⁻¹)	1.28	0.904
TCC/(mg·L ⁻¹)	0.295	0.0704

注:* 文献数据^[12]。
Note: * literature data^[12].

敏感。此外,3,4-DCA、CSP、2,3,6-TMP、DMSO、SC、SDS、BP、TCS、T、C 和 TCC 等 11 种化学品,斑马鱼胚胎的敏感性略优于稀有鮡鲫胚胎,但毒性值差异在 1.02 倍~6.05 倍之间,有很好的可比性。鉴于化学品理化性质的不同和生物物种间的差异,稀有鮡鲫胚胎的敏感性不亚于斑马鱼胚胎,适宜鱼类胚胎急性毒性试验的应用。

2.2 化学品对稀有鮡鲫胚胎和成鱼急性毒性结果比较

鱼类胚胎阶段作为鱼类全生命周期的最初期,通常其敏感性会优于或不亚于其他时期。如表 6 所示,16 种化学品对稀有鮡鲫胚胎及其成鱼的 96 h-LC₅₀ 值比较可知,稀有鮡鲫胚胎及其成鱼对其中 15 种化学品的敏感性相近,其中 2,3,6-TMP、ZSH、TEG、TCS、BIT 和 C 等 6 种化学品,稀有鮡鲫胚胎的敏感性优于稀有鮡鲫成鱼。对于 3,4-DCA、CSP、DMSO、SC、SDS、PD、MIT、BP、T 和 TCC 等 10 种化学品,稀有鮡鲫成鱼的敏感性略优于稀有鮡鲫胚胎,这可能是化学品试验溶液暴露条件的不同导致的^[28],但毒性值差异在 1.13 倍~5.57 倍之间,有很好的可比性。此外,通过分析软件 SPSS Statistics 17.0 对稀有鮡鲫胚胎及其成鱼 96 h-LC₅₀ 值进行相关性分析,得出两者具有较好的相关性($P=0.879$)。由此可见,稀有鮡鲫胚胎与其成鱼相比,敏感性类似,具有成为成鱼急性毒性试验替代方法的应用潜力。Dang 等^[29]和 Lammer 等^[30]的研究表明,部分化学品理化性质的差异会导致化学品对成鱼的敏感性优于胚胎,但胚胎和成鱼之间均具有较好的相关性,试验数据为鱼类胚胎急性毒性试验替代鱼类急性毒性试验提供了有力的科学支持,与本文结论一致。

此外,关于胚胎急性毒性试验(FET)作为成鱼急性毒性试验(AFT)的替代测试,有研究通过 985 个斑马鱼胚胎试验和 1 531 个成鱼试验,建立数学模型^[15],借助 FET 数据预测 AFT 值,实现试验和非试验相结合,在尽可能减少动物试验的前提下,为化学品环境管理提供更多基础数据。研究将 16 种化学品的 FET 试验数据代入公式($\log \text{FET LC}_{50}=(0.989 \times \log \text{AFT LC}_{50})-0.195$ ^[15]),预测 AFT 值(表 7)。结果可见,所有 AFT 预测值和试验值相比,差异均未超过一个数量级,表明 2 种数据间相互预测和使用具有一定的可操作性。如后续有更多数据累积,可通过相互关系,建立稀有鮡鲫特有的 FET 与 AFT 的推

表 6 化学品对稀有鮡鲫胚胎和成鱼的 96 h-LC₅₀
Table 6 The 96 h-LC₅₀ of chemicals to *Gobiocypris rarus* embryos and adult *Gobiocypris rarus*

化学品 Chemical	胚胎 Embryo	成鱼 Adult fish
3,4-DCA/(mg·L ⁻¹)	12.8	6.52*
CSP/(mg·L ⁻¹)	1.76	1.29
2,3,6-TMP/(mg·L ⁻¹)	14.1	17.0
DMSO/(g·L ⁻¹)	51.7	24.5
ZSH/(mg·L ⁻¹)	10.4	37.5
TEG/(g·L ⁻¹)	52.0	65.2
SC/(g·L ⁻¹)	10.4	9.19
SDS/(mg·L ⁻¹)	18.2	8.81
PD/(mg·L ⁻¹)	534	116*
MIT/(mg·L ⁻¹)	31.4	15.6
BP/(mg·L ⁻¹)	25.4	10.3
TCS/(mg·L ⁻¹)	0.260	0.293
BIT/(mg·L ⁻¹)	3.69	4.41
T/(mg·L ⁻¹)	23.2	9.48
C/(mg·L ⁻¹)	1.28	>6.51
TCC/(mg·L ⁻¹)	0.295	0.053

注:* 文献数据^[27]。

Note: * literature data^[27].

表 7 化学品对稀有鮡鲫的 FET 和成鱼急性毒性试验(AFT)与非试验结果
Table 7 The results of chemicals to *Gobiocypris rarus* in FET, adult fish acute toxicity test (AFT) and non-test results

化学品 Chemical	FET LC ₅₀	AFT LC ₅₀	AFT LC ₅₀
	试验值 Tested	预测值 Predicted	试验值 Tested
	FET LC ₅₀	AFT LC ₅₀	AFT LC ₅₀
3,4-DCA/(mg·L ⁻¹)	12.8	20.4	6.59
CSP/(mg·L ⁻¹)	1.76	2.79	1.29
2,3,6-TMP/(mg·L ⁻¹)	14.1	22.9	17.0
DMSO/(g·L ⁻¹)	51.7	85.1	24.5
ZSH/(mg·L ⁻¹)	10.4	16.8	37.5
TEG/(g·L ⁻¹)	52.0	85.6	65.2
SC/(g·L ⁻¹)	10.4	16.8	9.19
SDS/(mg·L ⁻¹)	18.2	29.6	8.81
PD/(mg·L ⁻¹)	534	902	116
MIT/(mg·L ⁻¹)	31.4	51.4	15.6
BP/(mg·L ⁻¹)	25.4	41.5	10.3
TCS/(mg·L ⁻¹)	0.260	0.403	0.293
BIT/(mg·L ⁻¹)	3.69	5.90	4.41
T/(mg·L ⁻¹)	23.2	37.8	9.48
C/(mg·L ⁻¹)	1.28	2.02	>100
TCC/(mg·L ⁻¹)	0.295	0.458	0.053

断公式,届时,数据将更为可靠。

2.3 化学品对鱼类胚胎和/或成鱼的 96 h-LC₅₀ 毒性分级

由于国内现用稀有鮕鲫作为试验材料,对不同种类化学品进行胚胎急性毒性试验的数据有限,且就敏感性与斑马鱼和/或稀有鮕鲫成鱼进行比较的数据有限,同时各试验条件、暴露周期都不尽相同,因此现阶段无法就稀有鮕鲫胚胎的敏感性优劣作直接判断。但由表 5 和表 6 仍可知,稀有鮕鲫胚胎急性毒性结果无论与同一种属不同生命周期比较,还是与不同鱼种(斑马鱼)相比,敏感性均类似^[30]。

此外,依据《新化学物质危害评估导则》(HJ/T 154—2004)^[31]和《化学品分类和标签规范 第 28 部分:对水生环境的危害》(GB 30000.28—2013)^[32]的危害分级标准:96 h-LC₅₀ 值≤1 mg·L⁻¹,毒性极高;96 h-LC₅₀ 值为 1~10 mg·L⁻¹,毒性高;96 h-LC₅₀ 值为 10~100 mg·L⁻¹,毒性中等;96 h-LC₅₀ 值>100 mg·L⁻¹,毒性低。16 种化学品胚胎急性毒性试验结果中(表 8),稀有鮕鲫和斑马鱼有 11 个毒性分级一致,另有 5 个仅相差 1 个等级;稀有鮕鲫胚胎和成鱼有 12 个毒性分级一致,另有 3 个仅相差 1 个等级,仅 1 个相差 2 个等级。由此可见,虽然稀有鮕鲫胚胎毒性数据与斑马鱼或稀有鮕鲫成鱼比较有数值上的不同,但其敏感性就毒性等级划分而言,均没有实质的差异。

综上所述:本次研究选取 16 种不同种类的化学品开展稀有鮕鲫胚胎急性毒性试验,通过实验和已有文献资料相结合的方式,分别将稀有鮕鲫胚胎与斑马鱼胚胎,稀有鮕鲫胚胎与其成鱼进行比较。结果表明,可能由于不同试验暴露体系的不同、化学品理化性质的不同、生物物种间的差异等原因,导致毒性值存在差异,但稀有鮕鲫胚胎的敏感性与两者均类似,具有成为成鱼急性毒性替代试验的应用潜力。

由此可见,稀有鮕鲫胚胎生物学特征与斑马鱼类似,急性毒性试验结果也体现了良好的稳定性和可重复性,其胚胎敏感性也处于可接受水平。作为一种中国本土的标准试验鱼种,适宜进行鱼类胚胎急性毒性试验的应用。另外,本研究的实施,既可顺应国际上的替代技术研究趋势,同时也可以拓展本土鱼种稀有鮕鲫在替代试验中的应用范围,为建立稀有鮕鲫全生命周期的国家标准提供数据基础。

表 8 化学品对鱼类胚胎和成鱼的 96 h-LC₅₀ 毒性分类

Table 8 The toxicity classification of 96 h-LC₅₀ of chemicals to fish embryos and adult fish

化学品 Chemical	稀有鮕鲫 胚胎 <i>Gobiocypris</i> <i>rarus</i> embryo	稀有鮕鲫 成鱼 Adult <i>Gobiocypris</i> <i>rarus</i>	斑马鱼 胚胎 <i>Danio rerio</i> embryo
3,4-DCA	++	+++	+++
CSP	+++	+++	++++
2,3,6-TMP	++	++	++
DMSO	++	++	++
ZSH	++	++	+
TEG	++	++	++
SC	+	+	+
SDS	++	+++	+++
PD	+	+	+
MIT	++	++	++
BP	++	++	++
TCS	++++	++++	++++
BIT	+++	+++	+++
T	++	+++	++
C	+++	+	++++
TCC	++++	++++	++++

注: +表示低毒; ++表示中毒; +++表示高毒; ++++表示极毒。
Note: +, low toxic; ++, middle toxic; +++, high toxic; ++++, very toxic.

参考文献 (References):

[1] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test No. 203: Fish, acute toxicity test [S]. Paris: OECD, 1992

[2] International Standardization Organization (ISO). ISO 7346, water quality-determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)): Part 1. Static method. Part 2. Semi-static method. Part 3. Flow-through method [S]. Geneva: ISO, 1996

[3] United States Environmental Protection Agency (US EPA). EPA ecological effects test guidelines, OPPTS 850. 1075: Fish acute toxicity test, freshwater and marine [S]. Washington DC: US EPA, 1996

[4] 沈敏, Katherine Coady, 董晶, 等. 化学品生态毒性测试鱼类模式生物的应用与展望[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 34-43

Shen M, Coady K, Dong J, et al. Application and outlook

- of various fish models used in chemical ecotoxicity test [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 34-43 (in Chinese)
- [5] Russell W M S, Burch R L. The Principles of Humane Experimental Technique [M]. London, Methuen: Universities Federation for Animal Welfare, 1959: 238
- [6] Embry M R, Belanger S E, Braunbeck T A, et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 97(2): 79-87
- [7] Schirmer K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish [J]. Toxicology, 2006, 224(3): 163-183
- [8] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD validation report (Phase 1) for the zebrafish embryo toxicity test. Series on Testing and Assessment, No. 157 [R]. Paris: OECD, 2011
- [9] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD validation report (Phase 2) for the zebrafish embryo toxicity test. Series on Testing and Assessment, No. 179 [R]. Paris: OECD, 2012
- [10] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test [S]. Paris: OECD, 2013
- [11] 王佳佳, 徐超, 屠云杰, 等. 斑马鱼及其胚胎在毒理学中的实验研究与应用进展[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(2): 123-135
- Wang J J, Xu C, Tu Y J, et al. Experimental research and application of zebrafish and embryos in toxicology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(2): 123-135 (in Chinese)
- [12] Busquet F, Strecker R, Rawlings J M, et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2014, 69(3): 496-511
- [13] Germany-Deutsches Institut für Normung (DIN). Din 38415-6-2003, German standard methods for the examination of water, waste water and sludge—Subanimal testing (group T)—Part 6: Toxicity to fish; determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T6) [S]. Berlin: DIN, 2003
- [14] International Standardization Organization (ISO). ISO 15088, water quality—Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish (*Danio rerio*) eggs [S]. Geneva: ISO, 2007
- [15] Belanger S E, Rawlings J M, Carr G J. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32(8): 1768-1783
- [16] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮕鲫——一种新的鱼类实验动物[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(S1): 96-99
- Cao W X, Wang J W. Rare minnow: A new laboratory animal in China [J]. Laboratory Animal Science and Administration, 2003, 20(S1): 96-99 (in Chinese)
- [17] 梁艺怀, 张京伟, 石利利, 等. 稀有鮕鲫作为化学品生态毒性测试鱼类模式生物的标准化实践[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 2-10
- Liang Y H, Zhang J J, Shi L L, et al. Standardization of *Gobiocypris rarus* as fish model used in chemical ecotoxicity testing [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 2-10 (in Chinese)
- [18] 王剑伟, 曹文宣. 中国本土鱼类模式生物稀有鮕鲫研究应用的历史与现状[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 20-33
- Wang J W, Cao W X. *Gobiocypris rarus* as a Chinese native model organism: History and current situation [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 20-33 (in Chinese)
- [19] 周红, 郭琳琳, 卢玲, 等. 中国化学品环境管理对本土模式生物的需求和应用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 11-19
- Zhou H, Guo L L, Lu L, et al. Needs and application of native model organisms for Chinese chemical management [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 11-19 (in Chinese)
- [20] 王蕊, 殷浩文. 斑马鱼胚胎发育中适宜的毒理学指标分析[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(2): 88-89, 93
- Wang R, Yin H W. Analysis on feasible toxicologic endpoints in embryonic development of *Brachydanio rerio* [J]. Journal of Labour Medicine, 2004, 21(2): 88-89, 93 (in Chinese)
- [21] 朱晓鸣, 解绶启, 崔奕波, 等. 摄食水平和性别对稀有鮕鲫生长和能量收支的影响[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 240-247
- Zhu X M, Xie S Q, Cui Y B, et al. Effect of ration level on growth and energy budget of male and female rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2001, 32(3): 240-247 (in Chinese)
- [22] 范博, 樊明, 刘征涛, 等. 稀有鮕鲫物种敏感性及其在生态毒理学与水质基准中的应用[J]. 环境科学研究, 2019, 32(7): 1153-1161
- Fan B, Fan M, Liu Z T, et al. Species sensitivity and ap-

- plication in ecotoxicology and water quality criterion for *Gobiocypris rarus* [J]. Research of Environmental Sciences, 2019, 32(7): 1153-1161 (in Chinese)
- [23] 顾党恩, 于学颖, 王剑伟. 稀有鮡鲫封闭群 Ihb: IHB 生长和繁殖性能的监测[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1): 71-75
- Gu D E, Yu X Y, Wang J W. Monitoring of the growth and reproductive performance of a rare closed colony of *Gobiocypris rarus* Ihb: IHB [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2014, 22(1): 71-75 (in Chinese)
- [24] 常剑波, 王剑伟, 曹文宣. 稀有鮡鲫胚胎发育研究[J]. 水生生物学报, 1995, 19(2): 97-103
- Chang J B, Wang J W, Cao W X. The embryonic development of *Gobiocypris rarus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1995, 19(2): 97-103 (in Chinese)
- [25] 张京佶, 王绿平, 张琨. 稀有鮡鲫在鱼类胚胎急性毒性试验中的适用性研究[J]. 环境科学研究, 2019, 32(7): 1162-1169
- Zhang J J, Wang L P, Zhang K. Applicability of *Gobiocypris rarus* in fish embryo acute toxicity test [J]. Research of Environmental Sciences, 2019, 32(7): 1162-1169 (in Chinese)
- [26] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 203: Fish, acute toxicity test [S]. Paris: OECD, 2019
- [27] 张京佶, 殷浩文, 赵华清. 稀有鮡鲫对重铬酸钾和 3, 4-二氯苯胺急性毒性研究[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 57-61
- Zhang J J, Yin H W, Zhao H Q. Acute toxicity of potassium bichromate and 3,4-dichloroaniline in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2014, 22(2): 57-61 (in Chinese)
- [28] Vergauwen L, Schmidt S N, Stinckens E, et al. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test [J]. Chemosphere, 2015, 139: 9-17
- [29] Dang Z C, van der Ven L T M, Kienhuis A S. Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribund as approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test [J]. Chemosphere, 2017, 186: 677-685
- [30] Lammer E, Carr G J, Wendler K, et al. Is the Fish Embryo Toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 149(2): 196-209
- [31] 中华人民共和国国家环境保护总局. 新化学物质危害评估准则: HJ/T 154—2004[S]. 北京: 中华人民共和国国家环境保护局, 2004
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. The guidelines for the hazard evaluation of new chemical substances: HJ/T 154—2004 [S]. Beijing: State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China, 2004 (in Chinese)
- [32] 中华人民共和国国家环境保护总局. 化学品分类和标签规范 第 28 部分: 对水生环境的危害: GB 30000.28—2013[S]. 北京: 中华人民共和国国家环境保护总局, 2013
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Rules for classification and labelling of chemicals. Part 28: Hazardous to the aquatic environment: GB 30000.28—2013 [S]. Beijing: State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China, 2013 (in Chinese) ◆