

稀有鮡鲫作为鱼类幼体生长试验受试鱼种的适用性研究

梁艺怀, 张京侏, 张琨, 王绿平, 殷浩文*

(上海市检测中心 生物与安全检测实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 通过验证稀有鮡鲫作是否适用于幼体生长试验, 为相关化学品测试国家标准的制定提供依据。**方法** 以重铬酸钾和3,4-二氯苯胺为参比物质, 按照《OECD 化学品测试准则 No. 215 鱼类幼体生长试验》, 分别开展三次实验室内稀有鮡鲫幼体生长试验以评价试验结果的重复性, 进行实验室间比对试验以评价试验结果的再现性。**结果** 实验室内重复试验中, 重铬酸钾和3,4-二氯苯胺对稀有鮡鲫生长抑制效应(EC_{20})平均值分别为30.9 mg/L和163 μ g/L, 变异系数均小于15%; 实验室间比对试验中, 虽然变异系数增大, 但是各实验室的28 d EC_{20} 均在 $\bar{x} \pm 2s$ 范围之内。**结论** 稀有鮡鲫幼体生长试验结果具有良好的重复性和再现性, 且稀有鮡鲫对3,4-二氯苯胺的敏感性与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)相当, 因此稀有鮡鲫可作为鱼类幼体生长试验的本土受试鱼种。

【关键词】 稀有鮡鲫; 鱼类幼体生长试验; 重复性; 再现性

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2018) 05-0618-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.013

Applicability of Chinese rare minnows for the juvenile fish growth test

LIANG Yihuai, ZHANG Jingji, ZHANG Kun, WANG Lyping, YIN Haowen*

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

Corresponding author: YIN Haowen. E-mail: yinhw@apm.sh.cn

【Abstract】 Objective This study is aimed to validate whether Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) are applicable for the juvenile fish growth test as a test fish, and to lay a foundation for the national standards of chemical testing. **Methods** According to “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 215: Fish, Juvenile Growth Test”, juvenile fish growth tests were performed using *G. rarus* that were exposed to two reference substances (potassium bichromate and 3,4-dichloroaniline). To evaluate the repeatability of the testing method using *G. rarus*, the toxic effects of each substance were determined three times in our testing facility, while other domestic laboratories were involved in the ring test program to evaluate the reproducibility of the method. **Results** Regarding the repeated tests, the mean estimates of the concentration that would cause a 20% reduction in growth relative to controls (EC_{20}) were 30.9 mg/L and 163 μ g/L for potassium bichromate and 3,4-dichloroaniline, respectively. For both, the coefficients of variance were <15%. Although higher coefficients of variance for the datasets of the two substances were reported in the ring test, EC_{20} values from all laboratories varied within a range of ($\bar{x} \pm 2s$). **Conclusions** Evaluating the repeatability and reproducibility of this test using *G. rarus* has presented promising result, and the level of sensitivity of this native fish species is comparable to that of *Oncorhynchus mykiss* in relation to the exposure of 3,4-dichloroaniline. Therefore, *G. rarus* can serve as standard test fish for toxicity studies.

【基金项目】上海市科学技术委员会技术标准专项(15DZ0504100);上海市自然科学基金项目(17ZR1424400)。

Funded by Technology Standard Project of the Shanghai Science and Technology Committee (15DZ0504100), and Shanghai Natural Science foundation (17ZR1424400).

【作者简介】梁艺怀(1981—),男,高级工程师,博士,研究方向为生态毒理学。Email: liangyh@apm.sh.cn

【通信作者】殷浩文(1959—),男,教授级高级工程师,主要从事化学品风险评价和生态毒理学研究。Email: yinhw@apm.sh.cn

【Keywords】 *Gobiocypris rarus*; juvenile fish growth test; repeatability; reproducibility

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

在化学品生态毒性试验体系中,鱼类作为水生生态毒性试验体系中的顶级脊椎动物,具有不可替代的地位。因此,早在化学品安全管理体系建立之初,发达国家就通过大量标准化研究推出了具有科学基础、符合管理要求的代表性试验鱼种。国际标准化组织(ISO)在 20 世纪 80 年代即推荐斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、黑头软口鲮(*Pimephales promelas*)、蓝鳃鱼(*Lepomis macrochirus*)和青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼种作为为毒性试验材料鱼。在经济全球化的时代,化学品安全管理早已突破地域的限制,发达国家将管理体系和标准化技术的优势扩大到化学品的整个生命周期,延伸到贸易活动的各个层面。

试验生物的选择需要考虑区域生态相关性。中国是一个幅员辽阔、生态系统类型完整的国家,在物种标准化过程中不应该忽视生态特殊性和脆弱性。在中国的化学品环境管理中,通过标准化研究推出中国特有的受试生物,既能精准保护我国的生态环境安全,又可对欧美发达国家主导的化学品测试体系进行补充。稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科鱼类,已实现常年实验室人工繁殖^[1]。因其生物学特征研究已较为系统,国内许多科研单位、测试机构使用稀有鮡鲫开展生命科学研究或生态毒性检测^[2-4]。

稀有鮡鲫是我国化学品鱼类测试方法标准化的首选鱼种。在完成稀有鮡鲫急性毒性试验适用性验证工作^[5]后,首个以稀有鮡鲫为标准实验生物的国家标准《GB/T 29763-2013 化学品 稀有鮡鲫急性毒性试验》^[6]已经颁布实施。然而,急性毒性试验只是诸多鱼类试验中的一项,远远不能满足化学品的危害评估和风险评估的数据要求。实验生物在承受长时间、低剂量的受试物质暴露时,所处生命周期的阶段不同,毒性效应的发生机制和出现时间都可能存在很大差异,比单纯的急性毒性试验能够提供更多有价值的数据信息。在开展化学品风险评估时,慢性毒性数据种间外推的不确定性和评估因子较小,能够优化风险评估的结论。因此,对于我国特有实验鱼种用于化学品生态毒性测试的标准化战略,将稀有鮡鲫的毒性测试标准从急性毒性延长到慢性毒性、从单一的死亡终点扩展到发育、生殖等更多的效应终点,具有重要的现实意义^[7]。

本研究旨在验证稀有鮡鲫对鱼类幼体生长试验的适用性,为国家标准编制项目《化学品稀有鮡鲫幼体生长试验》(20140324-T-469)提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究中各实验室所使用的动物源自中国科学院水生生物研究所构建的稀有鮡鲫 IHB 系(野生型封闭群)或引种后自行繁育, SPF 级。单次试验所用幼鱼均为同一批次,初始鱼龄 2~3 个月,初始体重 0.05~0.10 g。在试验开始前,幼鱼在试验条件下至少驯养两周。

1.1.2 参比物质

重铬酸钾(potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$, GR, 上海国药集团化学试剂有限公司,批号 20140708),是水生毒性试验中常用的无机参比物质。其性质稳定,试验结果可靠,可比性强。

3,4-二氯苯胺(3,4-dichloroaniline, $C_6H_5Cl_2N$, 98%, 上海麦克林生化科技有限公司,批号 C10012181),其水溶性较低、毒性大,是常用的有机参比物质。

1.2 方法

按照《OECD 化学品测试准则 No. 215 鱼类幼体生长试验》^[8]和 ISO 关于测试方法和结果的准确度评价方法^[9]进行试验设计并制定试验方案,选用重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺两种参比物质,分别进行三次实验室内稀有鮡鲫幼体生长试验,评价试验结果的重复性(repeatability);同时邀请国内同类实验室开展针对上述两种参比物质的比对试验,评价试验结果的再现性(reproducibility)。

1.2.1 试验原理

将处于指数生长阶段的幼鱼称重后放入试验容器中,并在受试物的亚致死浓度范围内进行更新式暴露,试验周期为 28 d。每天投饵,投饵量根据鱼的初始重量计算。试验结束时,再次对试验鱼称重。通过回归模型来估计引起 20% 生长率变化的浓度(EC_{20}),从而分析对其生长率的影响;通过与空白对照组的比较可以确定最低可观察效应浓度(LOEC)以及无可观察效应浓度(NOEC)。

1.2.2 试验条件

试验用水为经活性炭过滤,紫外灭菌的自来

水, pH 6.0 ~ 8.5, 总硬度不低于 140 mg/L (以 CaCO_3 计); 温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$; 每天 12 h 光照; 溶解氧不小于空气饱和值的 60%。饲喂: 每日投食 2 次且间隔至少 5 h, 投食总量约为每个容器中所有鱼初始体重的 4%, 称重前 24 h 内不饲喂。清污: 每次更换试验溶液时, 将原有试验容器替换为充分洗净的试验容器。

1.2.3 试验操作

暴露浓度: 重铬酸钾暴露组为 10、15、22、33、50 mg/L, 3,4-二氯苯胺暴露组为 20、36、64、112、200 $\mu\text{g/L}$, 同时设 1 个空白对照组 (试验用水); 各组设 3 个平行, 每个平行容器放入 5 尾鱼。每次试验需使用 90 尾鱼。

试验开始前, 选择试验鱼中有代表性的个体, 用 80 mg/L 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (MS-222) 麻醉后, 测量平均体重。在试验开始时, 对所有试验用鱼逐尾称重, 所有个体重量应保持在平均体重的 $\pm 10\%$ 范围内, 最大不能超过 25%。将试验鱼在试验容器之间随机分配, 并记录每个试验容器中鱼的总重量。

试验结束时, 对所有存活的鱼按试验容器逐尾称重。试验期间, 不进行测量。

观察和记录: 每日一次观察并记录鱼死亡数量和其他异常现象, 如体表出血、变色等。死鱼应及时清除, 且需重新调整投饵量。

试验期间, 测定一次空白对照组和最高浓度组中的总硬度; 至少在一个试验容器中连续监测温度。

至少在每次更新试验溶液前后测定各试验容器中溶液 pH、溶解氧和温度。

1.2.4 试验有效性判断

试验期间, 试验溶液的溶解氧含量应 $> 60\%$ ASV; 各试验容器之间的水温波动不超过 $\pm 1^\circ\text{C}$, 并且应保持在试验生物适宜温度的 $\pm 2^\circ\text{C}$ 范围内。

试验结束时, 对照组试验鱼的死亡率不得超过 10%, 且对照组试验鱼平均体重的增长至少为初始体重的 50%。

1.2.5 实验室内重复试验

重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺稀有鮟鮟幼体生长试验在实验室内各实施三次, 通过固定试验条件和方法, 在不同时间、不同操作人员、不同受试生物个体, 比较分析试验结果的重复性。

1.2.6 实验室间比对试验

为评价两种参比物质试验结果的再现性, 邀请五家外部实验室参加稀有鮟鮟幼体生长比对试验。这些实验室位于我国不同区域, 其中华东 2 家, 东北

1 家, 华中 1 家, 西南 1 家。为了保证数据结果的可靠性和可比性, 比对试验由本实验室制定试验方案, 统一分发受试物质。

1.3 数据处理

1.3.1 平均特定生长率

平均特定生长率是指某个试验浓度中整个容器中鱼的平均生长率, 计算公式 (1) 如下:

$$r = \frac{\overline{\ln W_2} - \overline{\ln W_1}}{t_2 - t_1} \times 100 \quad (1)$$

(1) 式中: r , 平均特定生长率; W_1 , 试验开始时每个容器中单尾鱼的体重; W_2 , 试验结束时每个容器中单尾鱼的体重; $\overline{\ln W_1}$, 试验开始时, 容器中各尾鱼体重对数的平均值; $\overline{\ln W_2}$, 试验结束时, 容器中各尾鱼体重对数的平均值; t_1, t_2 , 试验开始与试验结束的时间间隔, d。

1.3.2 结果的回归分析

将各暴露组的平均特定生长率 (r) 与空白对照组平均特定生长率 (r_0) 进行对比, 计算得出以特定生长率为基础的抑制率 (I_r), 再运用概率单位法分析抑制率 (I_r) 与浓度之间的数学关系, 可估算 EC_{50} , 即任何所需 EC 值。计算生长抑制率 (I_r) 的公式 (2) 如下:

$$I_r = \frac{r_0 - r}{r_0} \times 100 \quad (2)$$

(2) 式中, I_r : 以特定生长率为基础的抑制率, %; r_0, r 分别为空白对照组平均特定生长率和暴露组平均特定生长率。

1.3.3 LOEC 和 NOEC 的估计结果分析

采用 Dunnett's t 检验将各暴露组平均特定生长率 (r) 与空白对照组平均特定生长率 (r_0) 进行对比, 确定 LOEC 和 NOEC 值。

以上 EC、LOEC 和 NOEC 值均基于参比物质在试验溶液中的配制浓度。

2 结果

2.1 实验室内重复试验

两种参比物质的实验室内稀有鮟鮟幼体生长重复试验结果显示 (表 1), 重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺三次试验结果的变异系数分别为 11.3% 和 14.2%, 均小于 15%。两种参考物质在三次试验中得到的 LOEC 和 NOEC 值均一致。这表明在实验室内开展的稀有鮟鮟幼体生长试验结果的重复性好。

表 1 重复试验中两种参比物质对稀有鮕鲫 28 d 生长抑制效应浓度 (28 d EC₂₀)

Table 1 Effects of the two reference chemicals on the specific growth rate of *Gobiocypris rarus*

after 28 d of exposure (28 d EC ₂₀) in the repeated tests						
参考物质 (mg/L) Reference substance	试验 1 No. 1	试验 2 No. 2	试验 3 No. 3	平均值 $\bar{x}$	标准差 s	变异系数 CV (%)
重铬酸钾 Potassium dichromate	27.2	34.1	31.5	30.9	3.5	11.3%
3,4-二氯苯胺 3,4-dichloroaniline	143	182	165	163	20	12.0%

2.2 实验室间比对试验

所有参加比对试验的实验室均按照统一的试验方案开展稀有鮕鲫幼体生长试验,试验用水水质参数(温度、pH、溶解氧浓度、硬度等)的波动和试验用鱼的选择均符合质量控制要求。试验结束时,各次试验对照组试验鱼的死亡率均为 0,且平均体重的增长超过初始体重的 50%,均符合试验有效性要求。

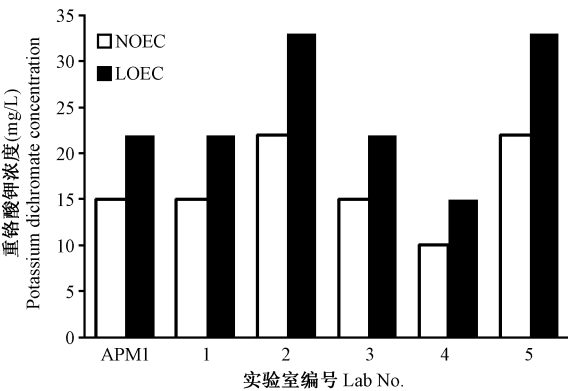
通过 Dunnett's *t* 检验,将各暴露组的平均特定生长率均值与空白对照组进行比较,获取 28 d 生长抑制效应的 LOEC 和 NOEC。各实验室重铬酸钾比对的 LOEC 在 15 ~ 33 mg/L 之间,NOEC 在 10 ~ 22 mg/L 之间(图 1)。通过回归分析,建立暴露浓度与抑制效应的关系曲线,获取 EC₂₀,各实验室重铬酸钾比对结果范围在 17.9 ~ 30.4 mg/L 之间(图 2)。同样,在 3,4-二氯苯胺比对试验中,LOEC 和 NOEC 分别在 36 ~ 112 μg/L 和 20 ~ 64 μg/L 范围内(图 3),EC₂₀在 58.4 ~ 198 μg/L 之间(图 4)。

将本实验室第一次试验的数据与其他五个外部实验室的数据纳入比对试验评价,得到重铬酸钾 EC₂₀ 的总体平均值 ($\bar{x}$) 和标准差 (s) 分别为 25.7 mg/L,4.4 mg/L,变异系数为 17.3%;3,4-二氯苯胺 EC₂₀ 的 $\bar{x}$ 和 s 分别为 123.52 μg/L,变异系数为 42.1%。

采用 *z* 分数法评价各实验室试验结果的差异大小。*z* 分数为单个实验室的 EC₂₀ 值与 $\bar{x}$ 的差再除以 s 所得。当 $|z| \leq 2$,即该 EC₂₀ 值在范围 ($\bar{x} \pm 2s$) 范围之内时,可认为该实验室的比对结果与总体情况无明显差异^[10]。结果显示,各实验室重铬酸钾比对结果的 *z* 分数在 -1.8 ~ 1.1 之间,3,4-二氯苯胺比对结果的 *z* 分数在 -1.3 ~ 1.4 之间,表明比对试验结果的再现性良好。

3 讨论

鱼类幼体生长试验 (OECD TG 215) 选取处于指数生长阶段的幼鱼进行为期 28 d 的毒性试验,观察受试物的亚致死效应以及分析其对生长率的影



注:APM1 代表上海市检测中心实验室第一次试验的结果,余同。

图 1 各实验室重铬酸钾对稀有鮕鲫特定生长率的 28 d LOEC 和 NOEC

Note. APM1 stands for the result obtained from the first test by the Shanghai Academy of Public Measurement, and the same can be seen in other figures.

Figure 1 The LOEC and NOEC of potassium dichromate on the specific growth rate of *G. rarus* after 28-d exposure for each participating laboratory

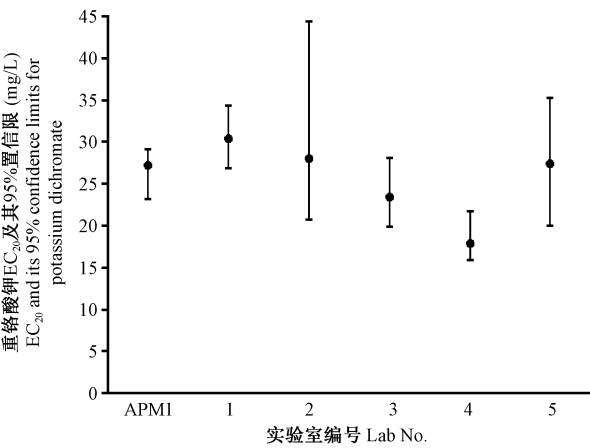


图 2 各实验室重铬酸钾对稀有鮕鲫特定生长率的 28 d EC₂₀ 及其 95% 置信限

Figure 2 EC₂₀ values with 95% confidence limits of potassium dichromate on the specific growth rate of *G. rarus* after 28-d exposure for each participating laboratory

响^[7]。根据实验生物的生命周期排列,该测试方法

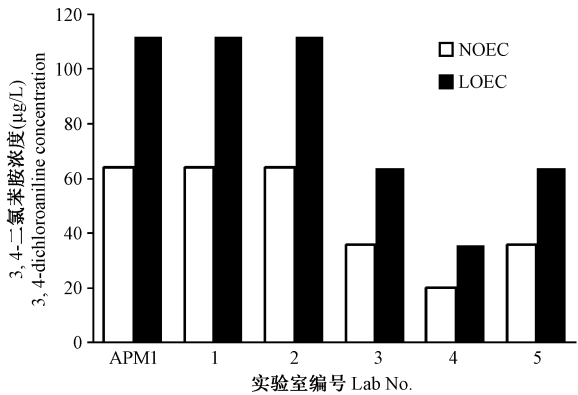


图3 各实验室3,4-二氯苯胺对稀有鮕鲫特定生长率的28 d LOEC 和 NOEC

Figure 3 LOEC and NOEC of 3,4-dichloroaniline on the specific growth rate of *G. rarus* after 28-d exposure for each participating laboratory

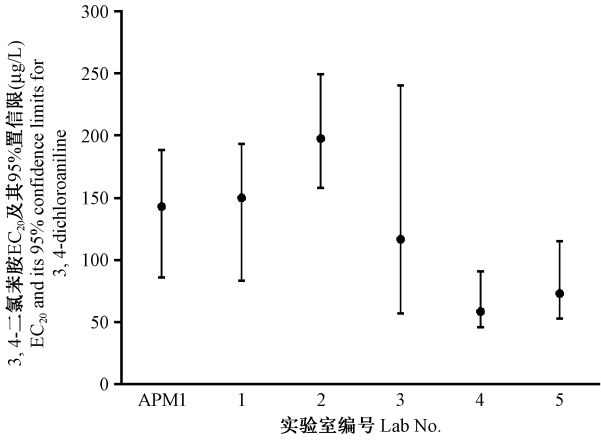


图4 各实验室3,4-二氯苯胺对稀有鮕鲫特定生长率的28 d EC_{20} 及其95%置信限

Figure 4 EC_{20} estimates with 95% confidence limits of 3,4-dichloroaniline on the specific growth rate of *G. rarus* after 28-d exposure for each participating laboratory

之前有鱼类胚胎-卵黄囊吸收阶段的短期毒性试验 (OECD TG 212)^[11]、鱼类早期生活阶段毒性试验 (OECD TG 210)^[12]、之后有鱼类短期繁殖试验 (OECD TG 229)^[13]或鱼类性发育试验 (OECD TG 234)^[14],处于一个承前启后的位置,且技术难度较小,实验室间比对工作相对容易开展。

鱼类幼体生长试验从方法开发之初,其间开展比对验证,到最终形成 OECD 导则,虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 都是受试鱼种或推荐鱼种。英国实验室间比对项目中,3,4-二氯苯胺对虹鳟的 28 d LOEC 在 30 ~ 220 $\mu\text{g/L}$ 范围内^[15],而之后的欧洲多家实验室的比对研究得到了一个略大的 28 d LOEC 范围 (100 ~ 600 $\mu\text{g/L}$)^[16]。而在本研究中,

国内各实验室的 3,4-二氯苯胺对稀有鮕鲫的 28 d LOEC 在 36 ~ 112 $\mu\text{g/L}$ 之间,表明稀有鮕鲫对 3,4-二氯苯胺的敏感性与虹鳟大致接近,这使得将稀有鮕鲫列为鱼类幼体生长试验的受试生物具备可行性。

任何一项试验研究在实施过程中都会出现各种来源的变异 (variations)。就鱼类幼体生长试验而言,除了幼鱼个体内在的生长率差异,试验体系中试验鱼的承载量、水温及其波动幅度、溶解氧含量、投饵量及饲喂频率等因素都可能对最终的试验结果造成不同程度的变异,操作人员和实验室环境设施的差异会进一步加剧这种情况,故同一项试验结果的实验室间变异通常比实验室内变异大。然而,只要关键性的试验条件受到严格控制,这些潜在的变异将不会对试验方法的灵敏度产生显著的影响。

本研究的发现进一步验证了鱼类幼体生长试验方法的稳健性^[16]。实验室内部研究显示,两种参比物质重复性试验得到的 LOEC 和 NOEC 值均是一致的,28 d EC_{20} 值的变异系数小,表明试验结果的重复性良好。这说明只要选择来源固定、鱼龄适宜、初始体重差异小的稀有鮕鲫幼鱼,在暴露条件相同的前提下,即使是不同人员在不同时间进行试验操作,都能够获得一致性较高的试验结果。

在比对研究中,各家实验室均按照统一的试验方案完成了两种参比物质的稀有鮕鲫幼体生长试验。各实验室间数据的离散程度 (变异系数) 相较于同一实验室内数据的离散程度大,尤其是 3,4-二氯苯胺的试验数据,变异系数高达 42.1%,可能是由于该物质难溶于水、毒性效应浓度低、试验技术难度较大所致。与此相反,对于水溶性高、性质稳定的重铬酸钾,比对试验的变异系数 (17.3%) 与重复试验的变异系数 (11.3%) 差异不大。同其他实验室的数值相比,4 号实验室提供的两种参比物质 EC_{20} 值均是最小的,即便如此,最大值与最小值之比未超出一个数量级,而 z 分数法的评价结果也进一步印证了比对试验结果的再现性。另外,根据新化学物质危害评估导则^[17]判定受试物质危害等级判定时,数据上的差异并未对毒性分级造成影响。

与鱼类急性毒性试验相比,鱼类幼体生长试验对受试生物、试验条件、观察终点、数据分析等各方面的技术要求更为复杂。为了准确描述受试化学物的毒性特征,试验数据需要满足统计功效,才能将不同暴露浓度组间幼体生长差异与各浓度组中容器内个体差异或容器间差异有效区分开来。实现上述目标的一个关键因素就是挑选出一批初始

体重差异较小(所有个体重量须保持在平均体重的 $\pm 10\%$ 范围内)的试验用幼鱼。稀有鮕鲫幼鱼个体(0.05 ~ 0.10 g)远小于 OECD TG 215^[8] 首选的虹鳟幼鱼(3 ~ 5 g),这给动物的移动、称量和筛选带来一定技术难度。然而,使用小型鱼种也有一些优势,比如可以缩小试验体系的规模,减少配制试验溶液的工作量。另外还需注意的是,试验期间务必消除或尽量减小环境因素(尤其是温度差异)对幼体生长速率造成的影响,除了将水温波动严格控制在 1℃ 以内,还应该定期变换容器位置。

幼鱼对环境压力的耐受程度远不及成鱼,不适合远距离运输,建议有条件的实验室在内部维持适量的稀有鮕鲫种群,以便试验的顺利开展。目前实验稀有鮕鲫的养殖和病原体控制有些研究,但未形成规范性体系,这需要各相关机构不断积累实践经验、深入研究,尽快形成技术规范,为稀有鮕鲫国家标准体系的构建奠定基础。

总之,无论是试验物种的敏感性,还是试验结果的重复性和再现性,均证实了稀有鮕鲫在鱼类幼体试验方法中的适用性。只要相关研究机构继续遵从与国际一致的标准化原则,在化学品测试实践中不断累积物种稳定性和敏感性数据,稀有鮕鲫在化学品毒性测试中的使用范围将有望进一步扩大。

参 考 文 献(References)

- [1] 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(z1): 96-99.
Cao WX, Wang JW. Rare minnow: A new laboratory animal in China [J]. Lab Anim Sci Manag, 2003, 20(z1): 96-99.
- [2] 杨亚洲,蔡磊明,孟智启,等. 毒死蜱对稀有鮕鲫不同生命阶段的毒性效应[J]. 农药学学报, 2014, 16(1): 78-83.
Yang YZ, Cai LM, Meng ZQ, et al. Toxicity effects of chlorpyrifos to different life stages of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Chin J Pest Science, 2014, 16(1): 78-83.
- [3] 吴本丽,曹岩,罗思,等. 封闭群稀有鮕鲫对几种常见化学品的敏感性[J]. 中国环境科学, 2014, 34(4): 1059-1066.
Wu BL, Cao Y, Luo S, et al. Sensitivity of rare minnow (*Gobiocypris rarus*, IHB) to several common chemicals [J]. Chin Environ Sci, 2014, 34(4): 1059-1066.
- [4] 陈曦,洪响生,吴慧敏,等. 稀有鮕鲫神经发育相关基因的克隆、同源性分析及组织分布[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(1): 173-181.
Chen X, Hong XS, Wu HM, et al. Cloning, homology analysis, and distribution of neural development related genes of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Asian J Ecotoxicol, 2016, 11(1): 173-181.
- [5] 张京佑,殷浩文,赵华清. 稀有鮕鲫对重铬酸钾和 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 JJ, Yin HW, Zhao HQ. Acute toxicity of potassium bichromate and 3,4-dichloroaniline in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(2): 57-61.
- [6] 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. GB/T 29763-2013 化学品稀有鮕鲫急性毒性试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the PRC, and Standardization Administration of the PRC. GB/T 29763-2013 Chemicals-Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*) acute toxicity test [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [7] 梁艺杯,张京佑,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 YH, Zhang JJ, Shi LL, et al. Standardization of *Gobiocypris rarus* as fish model used in chemical ecotoxicity testing [J]. Asian J Ecotoxicol, 2017, 12(2): 2-10.
- [8] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 215: Fish, Juvenile Growth Test [S]. Paris: OECD, 2000.
- [9] International Organization for Standardization. ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method [S]. Geneva: ISO, 1994.
- [10] USEPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms-Fifth Edition (EPA-821-R-02-012) [R]. Washington, DC: Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 2002.
- [11] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages [S]. Paris: OECD, 1998.
- [12] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test [S]. Paris: OECD, 1992.
- [13] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 229: Fish Short Term Reproduction Assay [S]. Paris: OECD, 2012.
- [14] OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 234: Fish Sexual Development Test [S]. Paris: OECD, 2011.
- [15] Solbe JF, de LG. A UK ring test of a method for studying the effects of chemicals on the growth rate of fish [R]. Environmental effects of chemicals. CFM 9350 PRD. Contract Report 1388-M/2. WRc plc, Medmenham, Buckinghamshire, UK. 1987.
- [16] Mallett MJ, Grandy NJ, Lacey RF. Interlaboratory comparison of a method to evaluate the effects of chemicals on fish growth [J]. Environ Toxicol Chem, 1997, 16(3): 528-533.
- [17] 国家环境保护总局. HJ/T 154-2004 新化学物质危害评估导则[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004.
State Environmental Protection Administration of the PRC. HJ/T 2004 The guidelines for the hazard evaluation of new chemical substances [S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2004.