

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

农药登记环境影响试验生物试材培养

第3部分：斑马鱼

Guidance on the housing and care of organisms used for environmental
impact test of pesticide registration, Part 3: Zebrafish

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx发布

xxxx-xx-xx实施

中华人民共和国农业农村部发布

前 言

NY/T ×××× 《农药登记环境影响试验生物试材培养》，分为 4 部分：

- 第 1 部分：蜜蜂；
- 第 2 部分：日本鹌鹑；
- 第 3 部分：斑马鱼；
- 第 4 部分：家蚕。

本部分是 NY/T ×××× 的第 3 部分。

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位：

本标准主要起草人：

农药登记环境影响试验生物试材培养

第3部分：斑马鱼

1 范围

本标准规定了农药环境安全评价试验用鱼的引入与验收、驯养、饲养管理、繁育管理和记录资料等技术方法与管理要求。

本标准适用于斑马鱼的实验室培养，其他品种的鱼类可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是标注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本标准。

GB/T 31270.12 化学农药环境安全评价试验准则 第12部分：鱼类急性毒性试验

NY/T 3152.4 微生物农药 环境风险评价试验准则 第4部分：鱼类

NY/T xxxx 化学农药 鱼类早期生活阶段试验准则

GB/T 5750 生活饮用水标准检验方法

GB/T 18654.3 养殖鱼类种质检验：性状测定

GB/T 14924.1 实验动物配合饲料通用质量标准

GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY 5073 无公害食品 水产品中有毒有害物质限量

SN/T 2503 淡水鱼中寄生虫检疫技术规范

SN/T 1869 食品中多种致病菌快速检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

试验用鱼 test fish

经人工繁育，对其携带的病原微生物及寄生虫进行控制，遗传背景明确或来源清楚，用于农药环境影响试验的鱼类，本标准中仅指斑马鱼 (*Danio rerio*)。

3.2

封闭群（远交群） closed colony (outbred stock)

以非近亲交配方式进行繁殖生产的实验鱼种群，在不从外部引入新的基因的条件下，经过4代以上

的繁殖，该群体称为封闭群，亦称远交群。

3.3

亲鱼 brood fish

供繁殖用的雌/雄成鱼。

3.4

胚胎期 embryo stage

从受精卵开始至胚胎破膜孵化出的整个发育阶段，通常指受精后0 d~4 d。

3.5

仔鱼期 larvae stage

从胚胎破膜孵出到卵黄囊吸收完毕的时期，通常为受精后5 d~15 d。

3.6

稚鱼期 juvenile stage

体形迅速趋近成鱼的时期，通常为日龄16 d~30 d左右。

3.7

幼鱼期 sub-adult stage

体形与成鱼完全相同但未性成熟的时期，通常为1月龄~3月龄。

3.8

成鱼期 adult fish

出现第二性征，达到性成熟的阶段，一般为3月龄以上。

3.9

生物饲料 living feeds

经过人工筛选的、可进行人工培养且适合斑马鱼采食的饲料生物。

3.10

配合饲料 formula feeds

根据实验鱼的营养需求，将多种饲料原料按饲料配方经工业化生产获得的均匀混合物。

4 引入与验收

4.1 引入

4.1.1 至少在试验开始前9 d引入试验所需斑马鱼，使其适应实验室的环境条件。

4.1.2 引入的斑马鱼应具有明确的来源、鱼龄等信息。选择能够出具品系证明的供应商，或引入后自行进行种质检测。

4.1.3 斑马鱼到达实验室之前,应将鱼缸、鱼具等相关器具清洗干净,必要时进行浸泡消毒处理,如采用 0.2‰~0.5‰高锰酸钾溶液浸泡 1 h~2 h。

4.2 验收

4.2.1 种质检测

随机抽取 30 尾以上斑马鱼进行形态性状检测(检测方法参见附录 A.1)。所有抽样检测的鱼形态性状均符合规定时,判定为合格。形态性状与标准规定有显著性差异时,需增加 DNA 条形码检测。当 DNA 条形码检测结果显示序列歧义度小于 1.0% 时,判定为合格(检测方法参见附录 A.2)。

4.2.2 体长和体重抽检

随机选取该批次斑马鱼的 1.0%~1.5% (引入数量≤1000 尾时,至少 10 尾),分别进行体长和体重的测定,判断是否满足试验需求。

4.2.3 暂养观察

4.2.3.1 经种质检测、体长和体重抽检合格的斑马鱼,应在暂养区暂养并观察至少 2 d。暂养条件与饲养条件相同。

4.2.3.2 暂养区应与饲养区保持隔离。对进出暂养区域的人员、物品应采取隔离措施,如人员应穿戴工作服、手套,物品应进行消毒处理。

4.2.3.3 暂养期间,观察整批鱼的健康状态,如有无畸形、行动异常及死亡状况出现。常见疾病参见附录 B。

4.2.3.4 暂养期结束时,未见疾病发生的条件下,判断斑马鱼是否合格:

- 当累计死亡率≤5%时,合格,转移至饲养室常规饲养;
- 当累计死亡率在5%~10%之间时,延长观察7天,如后续未观察到死亡情况,转移至饲养室常规饲养,否则,弃用该批鱼;
- 当累计死亡率>10%时,弃用该批鱼。

5 驯养

5.1 驯养期

饲养室内的斑马鱼在用于试验之前,应至少驯养和观察 7 d。

5.2 驯养条件

驯养期内,饲养条件应与试验时的环境条件相同。不同类别试验的试验条件见 GB/T 31270.12、NY/T 3152.4、NY/T xxxx 鱼类早期生活阶段试验准则。

5.3 驯养期合格标准

驯养期内,判断斑马鱼可用于试验的标准为:

- 当累计死亡率≤5%时，可用于试验；
- 当累计死亡率在5%~10%之间，则继续驯养7d，若死亡率仍超过5%，弃用该批鱼；
- 死亡率超过10%时，弃用该批鱼。

6 饲养管理

6.1 养殖系统

6.1.1 配备足够的斑马鱼养殖设施、设备及容器，将不同来源、不同批次的斑马鱼安置在不同的养殖容器中饲养。

6.1.2 采用斑马鱼养殖系统进行饲养时，应遵守其使用说明中的相关规定。

6.1.3 养殖容器应采用化学惰性材料制成，无毒、无害、无放射性、耐腐蚀、耐冲击。容器内壁应光滑，侧壁或顶部应至少局部透明，便于观察。

6.1.4 配备水处理相关设备、配件，并定期清洗与维护，包括：

- 供排水设备；
- 筛网过滤设备，例如由尼龙、锦纶、不锈钢等材质制成的筛网（以150目为宜），以滤除残饵、粪便、细菌、生物团等；
- 蛋白分离和微滤设备，以分离悬浮物、胶质蛋白等细小杂质；
- 生物处理设备（需定期活化），例如由碎石、细沙、塑料粒、磁环或活性炭等滤料构成的生物过滤器，以分解水中的氨氮及有机物等。
- 消毒杀菌设备，例如紫外或臭氧杀菌装置；
- 增氧设备等，以满足养殖水中的溶解氧含量等要求。

6.2 饲养密度

不同生长发育阶段的斑马鱼饲养密度要求如下：

- ≤4日龄，≤50个胚胎/培养皿（90mm）；
- 5日龄~12日龄，≤50尾/L；
- 12日龄~30日龄，≤25尾/L；
- 30日龄~90日龄，≤8尾/L；
- ≥90日龄，≤5尾/L。

6.3 养殖用水

6.3.1 养殖用水应为配方明确的稀释水或饮用水（如自来水）。配制稀释水的试剂至少应为分析纯等级，配制用水应为蒸馏水或去离子水（电导率≤10 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ）。

6.3.2 定期检测水质，养殖用水应符合GB/T 5750和附录C的要求，水温、pH、总硬度和溶解氧含量要

求及其检测频率参见附录 D.1。必要时，还需检测微生物和寄生虫，检测方法参见附录 E。

6.4 环境条件

不同生长发育阶段的斑马鱼所需的环境条件参见附录 D.1。

6.5 饲喂

6.5.1 饲料

6.5.1.1 饲料分为配合饲料和生物饲料两大类。应根据斑马鱼的生长发育阶段适时调整饲料的种类或规格（参见附录D.2）。

6.5.1.2 饲料的质量要求与检测方法见附录F。

6.5.1.3 生物饲料（如草履虫和卤虫）的培育方法参见附录G。

6.5.2 饲喂

宜每日饲喂，投喂生物饲料2次~3次，或者配合饲料3次~5次，或者两种饲料搭配使用。饲料投喂量应保证鱼可吃饱，但每日投喂总重量不宜超过鱼体重的3%。饲喂后，及时除去鱼粪便和食物残渣。

6.6 疾病处理

6.6.1 养殖过程中，每天观察并记录斑马鱼的健康状况。斑马鱼常见疾病参见附录 B。成鱼宜每 3 个月进行一次微生物学和寄生虫学检测，检测方法参见附录 E。

6.6.2 对于出现受伤、游动失衡、反应迟钝、痉挛、体色异常、消瘦等异常/疾病症状的鱼：

——异常/疾病症状明显、无治疗价值时，安乐死处理；

——异常/疾病症状不明显时，可继续正常饲养或隔离饲养，并根据需要与该养殖容器/单元中其余的鱼一起进行疾病防治，防治方法参见附录 B。

6.6.3 当斑马鱼大批量染病时（如染病率超过 40%或死亡率超过 10%）：

——该容器/单元中的鱼不可用于试验或繁殖，应进行安乐死处理；

——对该容器/单元以及使用过的滤布、鱼网、虹吸管等器具进行消毒和清洗。例如，用 0.2‰~0.5‰高锰酸钾溶液浸泡 1 h~2 h 后，用自来水冲洗干净。

6.6.4 对于治疗过的鱼，恢复健康后至少 14 d 后方能用于试验，至少 2 个月后方能用于繁殖。

6.7 安乐死

6.7.1 对以下情形的斑马鱼及时施以安乐死处理：

——无治疗价值的病鱼或其他被淘汰的鱼；

——不符合试验要求的鱼；

——试验后处理组中仍然存活的鱼等。

6.7.2 安乐死方法

6.7.2.1 高剂量麻醉法

将成鱼浸入 300 mg/L ~ 400 mg/L 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐溶液中（商品名 MS222）。鱼鳃动停止后，继续浸泡 10 min ~ 15 min，以确保其死亡。

6.7.2.2 冰浴法

——处理幼鱼时，将大量冰块加入幼鱼养殖水中，充分混合 30 min；
——处理成鱼时，直接将鱼浸入冰水混合液中浸泡 20 min 以上。

6.8 鱼被安乐死后，应按照生物医学实验垃圾处理。

7 繁育管理

7.1 亲鱼选择

7.1.1 亲鱼应为封闭群原种，且遗传背景明确，来源、品系、鱼龄、批次等信息清晰。宜选用 6 月~18 月龄处于生产高峰期的亲鱼。

7.1.2 采用实验室培育的斑马鱼作为亲鱼时，应避免使用封闭群原种繁育而来的 3 代及 3 代以上雌鱼或雄鱼（微卫星分子标记等检测表明遗传质量合格的除外）。

7.2 亲鱼交配

7.2.1 繁殖前，将雌鱼和雄鱼分开饲养，并确保食物充足。

7.2.2 于计划产卵的前一天下午或傍晚，选择健康的亲鱼，以雌雄比 1:1 或 1:2 放入交配盒或其它适宜的容器内。用隔板将雌鱼和雄鱼分开，并关闭光照。交配盒内加水约 2/3 缸，密度宜为 1.5 L 水/对亲鱼。

7.2.3 第二天早晨，抽开隔板，用微弱的光线促进产卵。一对健康的斑马鱼一般可产卵 200 枚以上。

7.2.4 宜采取措施使雌鱼体内的卵定期排出。同一尾雌鱼 2 次交配之间需间隔 1 周左右。

7.3 胚胎培育（日龄 1 d~4 d）

7.3.1 产卵后，移走亲鱼，清除未受精卵、死卵及亲鱼粪便等污物。然后，将受精卵转入到新容器中。

7.3.2 胚胎期（孵化前），可使用亚甲基蓝溶液（≤ 2 mg/L）对胚胎进行浸泡消毒处理。

7.3.2 此阶段斑马鱼的培育条件参见附录 D.1。期间，应及时将呈蓝色或发白的受精卵移除。

7.4 仔鱼培育（日龄 5 d~15 d）

7.4.1 仔鱼的培育条件参见附录 E.1。

7.4.2 于孵化后 3 d 左右开始，及时饲喂开口饲料。饲喂方法参见附录 D.2。期间，及时清除死亡的仔鱼及食物残渣等。

7.5 稚鱼培育（日龄 16 d~30 d）

稚鱼的培育条件参见附录 D.1，饲喂方法参见附录 D.2。期间，及时清除稚鱼粪便、死亡稚鱼及食物残渣等。

7.6 幼鱼培育

幼鱼的培育条件参见附录 D.1, 饲喂方法参见附录 D.2。3 月龄的斑马鱼一般可达性成熟。

8 记录资料

8.1 养殖设施设备、水处理设备、水质监控与培养箱等设备应配备标准操作规程, 规范操作, 并保存购入验收、维修保养和使用等相关记录。

8.2 对于每批次斑马鱼, 实验室应保存完整的培养记录, 相关原始记录可参见附录 H。主要记录资料包括:

- 引入与验收记录;
- 驯养与暂养记录;
- 健康检查与疾病治疗记录;
- 饲养记录;
- 繁殖记录;
- 受精卵消毒、孵化与培养记录;
- 饲料购置或培养记录;
- 器具清洗消毒记录;
- 斑马鱼领用与处理记录;
- 水质、饲料检测记录;
- 环境条件与水质监测记录;
- 遗传性状检测（如需）等。

附录 A

(资料性附录)

试验用鱼种质检测

A.1 形态性状检测

A.1.1 形态特征

斑马鱼体呈纺锤形，尾鳍长而呈叉形。背部呈橄榄色，体侧有数条银蓝色纵纹从鳃盖后直伸至尾末，臀鳍部也有与体色相似的纵纹。雄鱼柠檬色纵纹，雌鱼蓝色纵纹间银灰色纵纹，携卵时腹部凸出。胸鳍 10~12，腹鳍 6-8，背鳍 7-10，臀鳍 12-17。



A.1.2 检测方法

按照 GB/T 18654.3 要求进行。

A.2 DNA 条形码检测

A.2.1 基因组 DNA 的提取

按照常规方法提取样本基因组 DNA，双蒸水溶解后-20℃保存备用。

A.2.2 PCR 扩增

斑马鱼引物序列如下：

TCAACTAATCATAAAGACATTGGCAC

TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA

PCR 总反应体积为 50 μL，其中，含 10×PCR Buffer 5 μL (Mg²⁺ Plus), dNTP (2.5 mmol/L each) 4 μL，上下游引物 (20 μmol/L) 各 1 μL，基因组 DNA 4 μL (100 ng~1000 ng)，Taq 酶 (5 μL) 0.4 μL，双蒸水补齐至 50 μL。PCR 反应程序为 94℃，预变性 4 min；94℃ 变性 30s，52℃ 退火 40s，72℃ 延伸 40s，30 个循环，最后于 72℃ 下延伸 10 min。

A.2.3 序列测定

PCR 产物经回收纯化后，在 DNA 测序仪上测序；为保证测序的可靠性和准确性，采用双向测序，并进行人工核对、校正。

斑马鱼的 DNA 条形码序列如下：

CCTGTATCTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGAATAGTAGGGACCGCATTAAAGCCTCTTAATCCGAGCTGAA
CTTAGCCAACCAGGAGCACTTCTGGTGTGATCAAATCTATAATGTTATTGTTACTGCCCATGCTTTGT
AATAATTCTTATAGTAATACCCATTCTTATTGGGGGATTGGAAACTGACTGACTGCCACTAATGATTG
GGGCCCCCGATATGGCATTCCCCGAATAATAATAGCTCTGACTTCTCCACCCCTATTCTTCTT
CTATTAGCTTCTGGAGTTGAAGCAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTATCCACCTCTGCAGGC
AACCTTGCCCATGCAGGAGCATCTGTTGATCTAACAAATTTTCACTACACTAGCAGGTGTTCATCTAT
TCTTGGAGCAATTAAATTTATTACTACTACAATTAAACATGAAGCCACCAACTATCTCTCAGTATCATATAT
CATTATTGTATGAGCTGTCTTAGTTACAGCTGTACTACTTCTTTATCTTACCGTAGCTGCCGGAA
TTACAATACTTCTTACAGACCGAAATCTAACACACAGTTCTTGACCCGGCAGGAGGGGGAGATCCAA
TTCTTATCAACACTTATT

A.2.4 结果计算

序列歧义度 (D) 按公式 (A.1) 计算。

$$D = \text{序列内变异碱基数} / \text{序列碱基总数} \times 100\% \quad (\text{A.1})$$

附录 B

(资料性附录)

斑马鱼常见疾病

常见疾病、病原或病因、主要症状和防治方法见表B.1。发现疾病后如采取相关防治处理措施，应详细记录，并在试验报告中描述防治时间与方法。

表 B.1 主要疾病、病原、主要症状和防治方法

主要疾病	病原/病因	主要症状	防治方法
分支杆菌病	海分支杆菌 (<i>M. marinum</i>)、脓肿分支杆菌 (<i>M. abscessus</i>)、龟分支杆菌 (<i>M. Chelonae</i>)、偶发分支杆菌 (<i>M. Fortuitum</i>)、草分支杆菌 (<i>M. Peregrinum</i>) 和嗜血分支杆菌等 (<i>M. Haemophilum</i>)	——溃疡、出血、头部周围充血、鱼鳞凸起、鱼鳍磨损、皮肤或者鳃苍白； ——内脏器官有白色结节出现，对内脏小结节进行抗酸染色后可见长杆形抗酸菌。	——主要通过优化饲养条件进行预防，例如，加大换水频率、降低饲养密度，保持好的水质； ——尚无好的治疗方法。及时隔离病鱼。
细菌性败血症	嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)、温和气单胞菌 (<i>Aeromonas sobria</i>)、河弧菌生物变种 (<i>Vibrio fluvialis</i>)，产碱假单胞菌 (<i>Pseudomonas alcaligenes</i>)，豚鼠气单胞菌 (<i>A. caviae</i>) 等气单胞菌属	——病鱼体表及内脏充血、出血，突眼，腹部膨大，有淡黄色或红色腹水，肝、脾、肾肿大，花肝，脾呈紫黑色； ——显微镜下可见红细胞肿胀，脾、肝、胰、肾中可见血源性色素沉着。	——主要通过优化饲养条件进行预防，例如，加大换水频率、降低饲养密度，保持好的水质； ——及时隔离病鱼。
细菌性鳃病、环境性鳃病	黄杆菌属 (<i>Flavobacterium spp.</i>)、屈桡杆菌属 (<i>Flexibacter spp.</i>)、菌尾柱状黄杆菌 (<i>Flavobacterium columnare</i>) 和嗜鳃黄杆菌 (<i>F. branchiophilum</i>)	——病鱼行动缓慢，反应迟钝，呼吸困难，鱼鳍和鱼尾被腐蚀，颜色发白。鱼体发黑，鳃上肿胀，粘液增多，上皮增生，次级鳃瓣融合，部分鳃瓣坏死； ——显微镜下，病变部位可见大量细菌，可PCR确诊。	——避免饲养密度过高，保持好的水质； ——运输前两天内尽量少喂食或不喂食； ——可用氯胺或者过氧化氢处理。
细菌性肠炎	尚不清晰	——病鱼离群独游，游动缓慢，体色发黑，腹部膨大，两侧有红斑，肠壁充血发炎，淡黄色粘液较多，肛门红肿；	——主要通过优化饲养条件进行预防，例如，加大换水频率、降低饲养密度，保持好的水质；

		<p>——显微镜下，肝、肾中可检出产气单胞菌。可PCR确诊。</p>	<p>——及时隔离病鱼。</p>
竖鳞病	初步认为是水型点状假单胞菌(<i>Pseudomonas punctata f. ascitae</i>)，尚待确认	<p>——病鱼离群独游，游动缓慢，无力，体表粗糙，鳞囊内积水，鳞片竖起，轻压鳞片渗出液可从鳞片下喷射出来、鳞片随之脱落。</p> <p>——鳃、肝、脾、肾颜色均变淡。可PCR确诊。</p>	<p>——减少鱼体受伤，预防该病发生；</p> <p>——病鱼可用2%食盐与3%小苏打混合液浸洗10 min，或3%食盐水浸洗10 min~15 min</p>
赤皮病	荧光假单胞菌(<i>P. Fluorescens</i>)	<p>——病鱼体表皮肤局部或大部分出血发炎，鳞片脱落（尤其鱼体两侧和腹部）。鳍充血、末端腐烂，鳍条呈扫帚状，形成蛀鳍。</p> <p>——可PCR确诊。</p>	<p>——减少鱼体受伤，预防该病发生；</p> <p>——及时隔离病鱼。</p>
鱼鳔炎	尚未确定具体细菌类型	<p>——病鱼聚集于鱼池底部，鱼鳍基部出现红斑；</p> <p>——镜检可见鱼鳔大范围损伤和严重慢性炎症。组织切片可见明显坏死，革兰氏染色可见大量细菌群落。</p>	<p>——主要通过优化饲养条件进行预防，例如，加大换水频率、降低饲养密度，保持好的水质。</p> <p>——及时隔离病鱼。</p>
水霉病 (白毛病)	水霉(<i>Saprolegnia</i>)和绵霉(<i>Achlya</i>)	<p>——感染初期，肉眼难见任何症状；当肉眼可见时，菌丝已向外生长，呈灰白色棉絮状。病鱼焦躁不安，患处肌肉腐烂，逐渐食欲减退、瘦弱而死。病变部位显微镜下可见水霉病菌丝及孢子囊等</p>	<p>——及时隔离病鱼。</p>
鳃霉病	鳃霉菌(<i>Branchiomyces sp.</i>)	<p>——病鱼失去食欲，呼吸困难，鳃上粘液增多、出血、呈现花鳃，严重时整个鳃呈青灰色；</p> <p>——病变部位显微镜下可见大量鳃霉。</p>	<p>——及时隔离病鱼。</p>
心脏病	发病原因尚待确定	<p>——心脏区域肿胀严重，切开可见严重出血和大块血栓。心包腔中充满血液或者蛋白样渗出物；组织切片可见心室扩张、充满液体。</p>	<p>——及时隔离病鱼。</p>
卵巢炎症	雌鱼未及时将卵排出	<p>——腹部扩张，卵巢成实心，有瘤状物。甚至从内到外体表现出白色溃疡；</p>	<p>——定期将雌鱼体内的卵排出。</p>

		——镜检可见严重慢性炎症，纤维素增生，纤维素瘤等。	
气泡病	水中某种气体过饱和，越幼小的个体越易感，可引起幼鱼大量死亡	——病鱼在水面混乱、无力游动，体表及体内出现不断增大的气泡，逐渐失去游动能力而浮在水面，直至死亡； ——解剖后镜检可见鳃、鳍及血管内有大量气泡。	——控制水中溶解氧。
天鹅绒病	淡水天鹅绒 (<i>Piscinoodinium pillulare</i>)	——精神萎靡，浮于水体表面，呼吸困难； ——显微镜下，皮肤或者鱼鳃湿片可见滋养体；鳃上皮增生，皮肤上皮增生和坏死；切片中见滋养体（卵形的、不透明、无运动能力）。	——盐水浸泡，及时隔离，彻底清洗鱼缸。
微孢子虫病	微孢子虫 (<i>Microsporidium</i>)	——衰弱和脊柱弯曲； ——显微镜下，中枢神经系统（脊索和后脑）可见孢子（湿片或切片）。	——紫外线照射水体。
白点病	多子小瓜虫 (<i>Ichthypothirus multifiliis</i>)	——粘液过多、呼吸困难、精神萎靡，皮肤可见凸起的白色结节； ——显微镜下，湿片见纤毛虫，确诊见到滋养体，寄生部位发现虫体。	——可采用1:4000~1:5000倍稀释的福尔马林浸泡病鱼。
毛细线虫病	毛细线虫(<i>Capillaria sp.</i>)	——病鱼发黑、衰弱，毛细线虫钻入寄主肠壁黏膜层，破坏组织，引起肠壁发炎，剖检肝肿大和贫血； ——显微镜下，肠道湿片可见充满虫卵（椭圆形、具有双极囊），组织切片可见蠕虫位于肠壁，感染组织发生严重蜂窝织炎；PCR确诊。	——采用伊佛霉素和左旋咪唑可治疗该类疾病，但用于斑马鱼尚未推广。
肾粘孢子虫病	两极虫属 (<i>Myxidium</i>) 或楚克拉虫属 (<i>Zschokkella</i>)	——无明显临床症状，可在多个器官中形成见到白色包囊； ——显微镜下，病变组织切片可见虫体。采用亚甲基蓝或者吉姆萨等特殊方法染色，组织切片可观察到虫体。	——福尔马林浸泡。

附录 C

(规范性附录)

养殖用水的水质指标

养殖用水的水质指标见表 C.1, 表格中所列指标至少每 6 个月检测 1 次。

表 C.1 试验用水的水质指标

指标	限量浓度
颗粒物	5.0 mg/ L
总有机碳	2.0 mg/ L
非离子氨	1.0 μ g/ L
硝酸根 (NO ₃)	9 mg/ L
残余氯	10.0 μ g/ L
总有机磷农药	50.0 ng/ L
总有机氯农药与多氯联苯	50.0 ng/ L
总有机氯	25.0 ng/ L
铝	1.0 μ g/ L
砷	1.0 μ g/ L
铬	1.0 μ g/ L
钴	1.0 μ g/ L
铜	1.0 μ g/ L
铁	1.0 μ g/ L
铅	1.0 μ g/ L
镍	1.0 μ g/ L
锌	1.0 μ g/ L
镉	100.0 ng/ L
汞	100.0 ng/ L
银	100.0 ng/ L
化学需氧量 (COD)	5 mg/L

附录 D (资料性附录)

饲养条件和饲料种类及规格

D.1 饲养条件

斑马鱼不同生长发育阶段的饲养条件参见表 D.1。

表 D.1 斑马鱼不同生长发育阶段的饲养条件

生长发育阶段	成鱼 (≥90 d)	幼鱼期 (30 d ~ 90 d)	胚胎期和稚鱼期 (0 d ~ 30 d)
培养方式	静水 ¹ /流水	静水 ¹ /流水	静水培养 ²
每日光照	12 h~16 h	12 h~16 h	12 h~16 h
水温 ³	21℃~25℃, 繁殖期: 23℃~27℃	21℃~29℃ (日温差≤4℃)	23℃~29℃ (日温差≤4℃)
溶解氧含量 ³	≥空气饱和值的 80%	≥空气饱和值的 80%	≥空气饱和值的 60%
pH ³	6.0~8.5 之间, 以 7.0~8.0 为宜		
总硬度 ⁴	40 mg/L~250 mg/L 之间 (以 CaCO ₃ 计, 以<180 mg/L 为宜)		
盐度	如在养殖用水中添加盐分, 盐度宜≤0.25‰		
环境噪声	≤ 60 dB		

¹: 静水饲养时, 每天换水一半以上, 或两天换水一次;

²: 日龄 0 d ~ 4 d 时, 采用小型容器, 如培养皿; 日龄 5 d 及以上时, 转移至较大的培养器皿中继续静水培养。开始饲喂前, 每天换水约 1/3; 之后每天换水一半以上或两天换水一次; 30 d 以上时, 可由静水培养改为流水式斑马鱼养殖系统培养。

³: 每日测定;

⁴: 每周测定。

D.2 饲料种类与规格

适用于斑马鱼不同生长发育阶段的饲喂方法参见表D.2，包括饲料种类与规格，以及饲喂频率。

表D.2 适用于斑马鱼不同生长发育阶段的饲喂方法

适用日龄 (d)	配合饲料规格 (粒径, mm)	生物饲料种类	饲喂频率
5~12	0.05~0.25	草履虫、熟蛋黄（磨碎）	——孵化后 3 d 左右，及时饲喂开口饲料 ——每日饲喂生物饲料 2 次~3 次或配合饲料 3 次~5 次，也可两种饲料搭配饲喂
12~30	0.25~0.5	卤虫无节幼体	——12 d ~ 15 d 时，可采用草履虫/熟蛋黄和卤虫无节幼体混合喂养方式 ——每日饲喂生物饲料 2 次~3 次或配合饲料 3 次~5 次，也可两种饲料搭配饲喂
30~90	0.5~1.5	卤虫无节幼体	——每日饲喂生物饲料 2 次~3 次或配合饲料 3 次~5 次，也可两种饲料搭配饲喂
≥90	1.0~1.5	卤虫无节幼体	——每日饲喂生物饲料 2 次~3 次或配合饲料 3 次~5 次，也可两种饲料搭配饲喂

附录 E

(资料性附录)

微生物学和寄生虫学检测

E.1 检测指标与频率

微生物学和寄生虫检测项目见表 E.1。

表 E.1 实验用普通级斑马鱼的微生物学和寄生虫检测项目

检测项目		检测要求
微生物	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	●
	海分枝杆菌 <i>Mycobacterium marinum</i>	●
	分枝杆菌 <i>Mycobacterium spp.</i> *	○
寄生虫	多子小瓜虫 <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	●

注：
●必检项目，要求阴性；○为必要时检测项目，要求阴性；*指除海分枝杆菌之外的其他分支杆菌。

E.2 检测要求

E.2.1 检测频率

成鱼宜每 3 个月检测 1 次。

E.2.2 取样

在一个水环境（同一水体或同一水循环系统）内随机取样，一个水环境内有多个鱼缸时，从 4 个角和中间点位置的鱼缸内取样。按一个水环境内试验用鱼群体数量的 6% 进行抽样（ ≥ 6 尾， ≤ 30 尾）。

E.2.3 送检

如需送检，采集的样品应为活体，避免冰冻和污染，原水运输和暂养，温度为（22~28）℃，24h 内完成检测。

E.3 检测方法

E.3.1 寄生虫的取样和检测按照 SN/T 2503 进行。

E.3.2 微生物的取样和检测按照 SN/T 1869 进行。

E.4 生物安全

按 GB/T 19489 的规定执行。

附录 F

(规范性附录)

饲料的质量要求与检测方法

F.1 配合饲料

F.1.1 总体要求

配合饲料应符合 GB/T 14924.1 的要求。不得掺入抗生素、驱虫剂、防腐剂、色素、促生长剂以及激素等药物及添加剂。

F.1.2 感官要求

取试样 100g 放置在洁净的白瓷托盘内，在非直射日光、光线充足、无异味的环境下，通过正常的感官检验进行评定。要求色泽均匀，无发霉与变质现象，无霉变、焦灼、酸败等异味，无杂物，无虫害。

F.1.3 营养成分

配合饲料的主要营养成分参见表 F.1 的推荐标准。

表 F.1 配合饲料主要营养成分指标

	水分/% ≤	粗蛋白/% ≥	粗脂肪/% ≥	粗纤维/% ≤	粗灰分/% ≤	钙 %	总磷 %
5~30 日龄	12	48	8.0	2.0	15	0.9~1.6	0.8~1.7
30~90 日龄	12	44	5.0	3.0	15	0.9~1.6	0.8~1.7
≥90 日龄	12	42	4.0	4.0	15	0.9~1.6	0.8~1.7

F.2 生物饲料

F.2.1 培育用水要求

水质应符合 GB/T 5750 和附录 C 的要求，至少每 6 个月检测 1 次。

F.2.2 生物饲料病原检测

宜每 6 个月进行 1 次寄生虫和微生物检测。随机取 30~50 个饲料生物，按照 SN/T 2503 进行寄生虫检查。随机取 0.05 g ~ 0.10 g 饲料生物，按照 SN/T 1869 进行微生物分离和检测。

F.2.3 有毒有害物质检测

非实验室内培育、从外部购买/引入的生物饲料，有毒有害物质含量应符合 NY 5073 的规定。

附录 G

(资料性附录)

生物饲料的培育

G.1 草履虫的培育

G.1.1 纯化

将含有大草履虫 (*Paramecium caudatum*) 的水样吸入表面皿或凹玻片中, 置于显微镜或解剖镜下, 用直径 0.2 mm 的微吸管将草履虫逐个吸出, 置于超纯水或去离子水中。开始培养前, 用超纯水或去离子水反复稀释、冲洗。

G.1.2 培养

——培养方法 1: 向含有纯化的草履虫的超纯水或去离子水中加入 1 倍~3 倍量去氯自来水, 滴加 1 滴~2 滴现配的 0.09%~0.30% 的酵母原液, 在水温 22℃~28℃、pH 值 6.5~7.5 的条件下培养。

——培养方法 2: 将小麦粒干热灭菌后, 加水煮 15 min, 分装于无菌容器内, 4℃ 保存备用。每升水中加入酵母粉 1 g, 全脂牛奶 1 ml, NaCl 1 g, 再加入约 15 粒煮熟的麦粒, 接入 2 ml 草履虫种源, 静置培养 5d~7d 左右。

G.1.3 收集与投喂

当密度较大时, 将培养液表面的草履虫收集起来 (必要时用 300 目~500 目筛网过滤)。用仔鱼养殖水冲洗、稀释至 100 个草履虫/mL~150 个草履虫/mL 后, 投喂仔鱼。

G.2 卤虫无节幼体的培育

G.2.1 来源与质量要求

G.2.1.1 购买商品化的卤虫卵进行孵化, 运输过程中应防止包装破损、日晒、雨淋。按 SN/T 0476 进行检验, 要求卤虫卵孵化率≥90%, 每克卵的卵粒数≥27 万粒, 含水率≤7%, 杂质≤0.03%。

G.2.1.2 卤虫卵应在低温 (-15℃~4℃)、干燥、避光、密封环境下储存。严禁与有毒、有害物质混合存放。开罐后卤虫卵应尽快使用。

G.2.2 孵化

G.2.2.1 孵化密度宜≤3 g 干重/L。

G.2.2.2 孵化条件: 水温 25℃~30℃、pH 值 7.5~8.2、盐度 10 g/L~30 g/L, 光照 1000 lx~3000 lx。连续曝气, 使容器底部的虫卵能被充分吹起, 并在水中分布均匀。

G.2.3 投喂

幼体孵出后 24h 内用于投喂。投喂前, 去除空壳和未孵化的卤虫卵, 用 150 目的筛网收集卤虫无节幼体, 并进行冲洗。

附录 H
(资料性附录)

记录表格示例

斑马鱼引入与验收记录见表 H.1。

斑马鱼驯养/暂养期间观察记录见表 H.2。

斑马鱼健康检查记录见表 H.3。

斑马鱼疾病防治记录见表 H.4。

斑马鱼饲养记录见表 H.5。

斑马鱼繁殖记录见表 H.6。

受精卵消毒记录见表 H.7。

斑马鱼孵化培养记录见表 H.8。

生物饲料孵化记录（以卤虫无节幼体为例）见表 H.9。

饲育器具清洗消毒记录见表 H.10。

斑马鱼领用记录见表 H.11。

安乐死记录见表 H.12。

表 H.1 斑马鱼引入与验收记录

品系	批次	月龄/日龄	数量	来源		引入后驯养位置			
品系鉴定：									
操作者/日期：									
抽样体重 (g) (仪器编号:)									
抽样体长 (cm) (仪器编号:)									
操作者/日期：									

表 H.2 斑马鱼驯养/暂养期间观察记录

品系	批次	房间号	放置位置	数量 (尾)
驯养/暂养 日期	异常数量 (尾) / 异常表现/ 养殖单元或容器编号	死亡数量 (尾) / 养殖单元或容器编号	处理方式	观察人/日期
驯养/暂养结束后评价:				
<input type="checkbox"/> 死亡率<5%，可用于试验 <input type="checkbox"/> 死亡率>10%，不可用于试验 <input type="checkbox"/> 其他 (详细描述处理措施)				

表 H.3 斑马鱼健康检查记录

品系	批次	月龄/日龄	数量
动物状态 (良好/异常)	异常动物数量 (尾)	异常动物症状描述	异常动物处理方法
结论:			
			检疫者: 日期

表 H.4 疾病防治记录

批次	
防治原因	
防治日期	
防治药剂名称	
防治药剂浓度	
防治药剂加入量	
防治开始时间	
防治结束时间	
操作者/日期	

表 H.5 斑马鱼饲养记录

品系	批次	房间号	放置位置	养殖单元/容器编号
日期/时间	鱼群是否正常	饲料种类	是否换水及换水量	死亡数量

表 H.6 斑马鱼繁殖记录

日期	亲鱼批号	雌雄比例	对数	配对开始时间	地点/设备	温度	繁殖用水/水量/pH	光照时间	产卵数量(估值)	批号	操作者/日期

表 H.7 受精卵消毒记录

受精卵批次	消毒日期	消毒剂名称	消毒剂浓度	消毒剂加入量	消毒开始时间	消毒结束时间	操作者/日期

表 H.8 斑马鱼孵化培养记录

品系	批次		数量(尾)			
日期/时间	放置位置/仪器	温度	光照周期	饲料种类	是否换水及换水量	操作者/日期

表 H.9 生物饲料孵化记录 (以卤虫无节幼体为例)

孵化日期	用水量(L)	氯化钠量(g)	丰年虾卵量(g)	孵化温度(℃)

表 H.10 饲育器具清洗消毒记录

日期	物品名称	消毒剂名称	消毒剂浓度	消毒剂加入量	消毒开始时间	消毒结束时间	操作者/日期

表 H.11 领用与处理记录（以成鱼为例）

斑马鱼批次			引入数量	
领用日期	试验研究号	领用数量	养殖单元/容器编号	操作者/日期
剩余数量（尾）：				
处理方式：				

表 H.12 安乐死处理记录

日期	试验研究号/批次	处理数量(尾)	处理方法	处理后存放位置	操作者/日期

参 考 文 献

- [1] OECD. Testing Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Testing, OECD Guidelines for the testing of chemicals, 2019.
 - [2] OECD. Testing Guideline 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET), OECD Guidelines for the testing of chemicals, 2013.
 - [3] OECD. Series on testing and assessment No. 171, Fish toxicity testing framework. OECD ENV/JM/MONO(2012)16.
 - [4] OECD. Testing Guideline 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD Guidelines for the testing of chemicals, 2013.
 - [5] 国家斑马鱼资源中心. 斑马鱼常见鱼病. <http://www.zfish.cn/inforscan/252.html>.
-