



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××-××××

代替 GB/T 13267-1991

水质 物质对淡水鱼（斑马鱼） 急性毒性测定方法

Water quality—Determination of the acute toxicity of substance to a
freshwater fish (Brachydanio rerio namilton-Buchanan)
(征求意见稿)

200×-××-××发布

200×-××-××实施

国家质量监督检验检疫总局
环 境 保 护 部 发布

目 次

| | |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 前言 | 1 |
| 1 适用范围..... | 2 |
| 2 规范性引用文件 | 2 |
| 3 术语和定义 | 2 |
| 4 方法原理..... | 3 |
| 5 试剂和材料 | 3 |
| 6 仪器和设备..... | 4 |
| 7 干扰及消除..... | 5 |
| 8 样品 | 5 |
| 9 试验步骤 | 5 |
| 10 结果计算..... | 10 |
| 11 试验报告..... | 12 |
| 附录 A（规范性附录）斑马鱼（ <i>Brachydanio rerio</i> ）的驯养繁殖条件及方法 | 13 |
| 附录 B（规范性附录）青鳉鱼（ <i>Oryzias latipes</i> ）的驯养繁殖条件及方法 | 15 |
| 附录 C（规范性附录）孔雀鱼（ <i>Poecilia reticulata</i> ）的驯养繁殖条件及方法 | 17 |

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，规范水生生物急性毒性测定方法，制定本标准。

本标准规定了水中物质对淡水鱼（斑马鱼）的急性毒性测定方法。

本标准的技术内容采用 ISO 7346-1、ISO 7346-2、ISO 7346-3 中相关内容。

自本标准实施之日起，GB/T 13267-91《水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法》废止。

本标准为指导性标准。

本标准由环境保护部科技标准司组织制定。

本标准主要起草单位：环境保护部南京环境科学研究所。

本标准自 20□□年□□月□□日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 物质对淡水鱼（斑马鱼）急性毒性测定方法

1 适用范围

本标准规定了水中物质对斑马鱼急性致死毒性的测定方法——静水式法、换水式法和流水式法。

本标准适用于以下范围：

- a. 在试验条件下可溶的化学物质（包括工业原料和产品、食品添加剂、农药、医药等）；
- b. 工业废水；
- c. 生活污水；
- d. 地表水、地下水。

本标准宜采用斑马鱼作为试验鱼种，在不改变本标准试验条件的情况下，青鳉鱼（*Oryzias latipes*）（真骨鱼总目 青鳉科）；孔雀鱼（*Poecilia reticulata*）（真骨鱼总目 花鳉科）亦可作为试验用鱼。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB 12997-91 水质 采样方案设计技术规定

GB 12998-91 水质 采样技术指导

GB 12999-91 水质采样 样品的保存和管理技术规定

GB/T 6682-92 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 静水式法

试验期间不需更换试验液，限于测定那些化学性质比较稳定的物质。

3.2 换水式法

每隔一定时间更换一次试验药液。适用于试验浓度在更换试验药液的时间内

保持相对稳定的物质（试验浓度在理论浓度值的 20% 范围之内波动）。

3.3 流水式法

试验药液连续更新，可用于大多数物质，包括水中不稳定的物质。

4 方法原理

在规定的试验条件下，将斑马鱼置于一系列浓度的受试物溶液中，求出受试物在 24h、48h、72h 及 96h 后引起受试斑马鱼群体中 50% 致死的浓度，即半致死浓度 LC_{50} ，以 24h- LC_{50} 、48h- LC_{50} 、72h- LC_{50} 和 96h- LC_{50} 表示。

试验分为两个阶段：

- a) 预试验：求出最高全存活浓度及最低全致死浓度，为正式试验确定浓度范围。
- b) 正式试验：在最高全存活浓度和最低全致死浓度之间按一定比例级差设置 5~7 个浓度组，求出半致死浓度 LC_{50} 。

当证据表明，试验期间受试物浓度相对稳定时（在理论浓度值的 20% 之内波动），理论配制浓度或测定浓度均可用于 LC_{50} 的估算。当测定浓度相对稳定但低于理论配制值的 80% 或高于理论配制值的 120%，则必须用测定浓度进行 LC_{50} 的估算。

5 试剂和材料

本标准所用试剂除非另有说明，配制溶液时均适用符合国家标准的分析纯化学试剂，试验用水参照 GB/T 6682-92 分析实验室用水规格和试验方法。

5.1 试验生物

试验鱼种为斑马鱼（真骨鱼总目，鲤科）（*Brachydanio rerio* Hamilton -Buchanan (Teleostei Cyprinidae)），体长 30 ± 5 mm，体重 0.3 ± 0.1g，试验用鱼须来自同一种群。试验前至少在连续曝气的稀释水中驯养 7 天，驯养时的水质条件和照明条件与试验时的条件一致。试验前 24h 停止喂饲，每天清除粪便及食物残渣。驯养期间死亡率不得超过 10%，否则该批鱼不得用作试验。

试验用鱼应无明显的疾病和肉眼可见的畸形。试验前两周内不应对其做疾病处理。斑马鱼驯养、繁殖的环境参数见附录 A。其它推荐鱼种青鳉鱼和孔雀鱼的驯养、繁殖方法分别见附录 B、C。

5.2 标准稀释水

新配制的标准稀释水，pH为7.8±0.2；硬度为250±25mg/L（以CaCO₃计），Ca/Mg比例接近4：1。制备所需试剂包括CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O、NaHCO₃、KCl，用电导率小于10μS/cm（1 mS/m）的蒸馏水或去离子水进行制备。配制好的标准稀释水中各组分的浓度分别为：

294.0mg/L CaCl₂·2H₂O

123.3 mg/L MgSO₄·7H₂O

63.0 mg/L NaHCO₃

5.5 mg/L KCl

新配制好的稀释水曝气至溶解氧至少达到空气饱和值（ASV）90%以上，必要时，用氢氧化钠溶液或盐酸调节 pH，使其稳定在 7.8 ± 0.2。

5.3 受试物储备液

将定量的受试物溶于一定体积标准稀释水、去离子水或蒸馏水中。储备液应当天配制。对于化学性质较稳定的物质，可配制供两天以上使用的溶液，配好后低温保存。对于水溶解度低的物质，可使用超声波分散混匀，也可加入对鱼低毒的有机溶剂助溶。

6 仪器和设备

所有可能与试验溶液接触的材料、设备都应由化学惰性物质制成，且不会吸附试验物质。常用设备、尼龙或其他软惰性材料制成的抄网，应专网专用。

6.1 试验容器

根据试验方法及受试物，选择适当的试验容器进行试验，水量一般以鱼的负荷 1.5 克鱼/升水计算。当试验物质具有挥发性时，试验容器顶部应加盖密闭装置，当试验物质为非挥发性物质时，试验装置顶部应敞开。试验前，容器应彻底清洗，干燥后备用。

6.2 量筒、容量瓶、移液管、滴管、尼龙网等器皿。

6.3 控温设备

用适宜的方法调节与控制试验溶液的水温，推荐采用大型恒温水浴等装置进行温度调节，确保试液温度控制在 23℃±1℃。

6.4 溶液更新设备

流水式法中，选择适当的设备进行试验溶液更新。更新过程中应确保试验溶液浓度稳定在理论浓度的 80% 以上，溶解氧浓度稳定在空气饱和值（ASV）60% 以上。

7 干扰及消除

7.1 采用标准稀释水为试验用水。试验溶液的配备与储存、试验鱼的管理及全部操作和试验都应在空气污染物未达到有害浓度的大气中进行。

7.2 试液中溶解氧不应低于空气饱和值的（ASV）60%。每天光照 12~16h。试验期间水温恒定在 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。试验前 24h 停止给试验鱼喂食，整个试验期间不喂食。

8 样品

8.1 试验溶液的制备

8.1.1 受试物可以是可溶于水的固体、液体或气体，但要求组分一定，具有代表性、重复性。

8.1.2 向标准稀释水中加入适当的受试物储备液（5.3），配制成所需浓度的试验溶液。当受试物储备液由蒸馏水或去离子水配制时，每 10L 标准稀释水中受试物储备液的加入量不宜超过 100ml。

8.2 水质样品的采集与保存

8.2.1 参照 GB 12997-91、GB 12998-91、GB 12999-91。采集废水样品时，应将采样瓶充满水样，不留空气。生产流程用水不稳定的工业废水，应在 24h 之内，每隔 6h 瞬时采样一次，分别测定每个样品，求得其最大毒性。

8.2.2 废水样品用标准稀释水稀释配成不同浓度的试验液。

8.2.3 样品采集后应立即进行试验。如果样品采集后 6h 之内不能进行试验，则必须将水样冷藏保存（ $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ）；如果样品采集后 2 个月之内不能进行试验，则必须将水样冷冻保存，并应尽可能缩短水样在试验前保存的时间。

9 试验步骤

9.1 静水式法

9.1.1 限度试验

在本标准规定的试验条件下，以受试物的最大水溶解度为限度试验浓度（当该物质的最大水溶解度大于 100mg/L 时，以 100mg/L 为试验浓度进行试验），取 10 尾鱼进行试验，试验历时 96h，试验结束时如果受试鱼没有死亡，就不再进行下一步试验。试验结果以 96h-LC₅₀ 大于该物质的最大水溶解度或大于 100mg/L 表示。

9.1.2 预试验

9.1.2.1 准备 6 个容器，在 6 个容器中加入适量的标准稀释水，向其中 5 个容器中加入适量的受试物储备液，配制一组适宜的浓度系列，该系列浓度一般以 10 为公比做间距，例如：0.1，1，10，100，1000 mg/L，也可根据需要以其他公比进行配制。第六个容器用做空白对照。试液总体积不宜超过 5L。

9.1.2.2 每个容器中放 5 尾鱼，调节并保持试验液温度在 23℃±1℃。试验时间为 96h。每天至少记录一次每个容器中的死鱼数目及溶解氧浓度，并及时将死鱼取出。试验期间试液无需强制曝气。

9.1.2.3 根据试验结果确定该物质 96h 对试验鱼的最高全存活浓度和最低全致死浓度。如果该浓度范围无法确定，则另选一个浓度范围进行试验，以确定正式试验所需的最高全存活浓度和最低全致死浓度。

9.1.2.4 在本标准规定的试验条件下进行废水样品测定时，应当首先测定废水样品的溶解氧含量并了解废水的大致性质。当废水含有适量的溶解氧时，可不经稀释直接进行毒性试验。

9.1.3 正式试验

9.1.3.1 在预试验中确定的最高全存活浓度和最低全致死浓度之间，以几何级数做间距，至少设置 5 个浓度为正式实验的浓度。其浓度范围在 3 个依次的几何系列浓度中最好能够测得 20% 到 80% 的死亡率，以估算 LC₅₀ 值。

9.1.3.2 至少取 6 个容器，分别加入一定量的标准稀释水。其中 1 个作为空白对照，其余容器中加入不同量的受试物储备液，配制成所要求的浓度范围。如果试验过程中使用了助溶剂，则需设置溶剂对照，溶剂对照中助溶剂的浓度为试验液中助溶剂的最高浓度。试验液总体积为 10L。

9.1.3.3 调节并保持试验液温度在 23℃±1℃。用尼龙或其他软惰性材料编织的小

孔抄网从驯养鱼群中随机选取 10 尾鱼放入每个试验容器中，所有鱼需在 30min 内转移完毕。

9.1.3.4 在试验过程中，试液无需强制曝气。试验开始和结束时测定试液及储备液中被测物质的浓度。每天测定一次各试液的溶解氧、pH 和温度，试验开始和结束时亦要测定。试验期间，试液温度波动范围不得超过 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，pH 波动范围不得超过 ± 0.2 。

9.1.3.5 试验周期为 96h，试验开始后 3~6h 内随时观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率，其后于 24h、48h、72h、96h 观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率，及时清除死鱼。死鱼的判断标准为用玻璃棒轻触鱼的尾部，没有反应即认为死亡。

9.1.3.6 采取适当的数理统计方法（10 结果计算）或数据处理软件对试验数据进行处理，求出 96h-LC₅₀ 值及 95% 置信限。

9.2 换水式法

9.2.1 限度试验

在本标准规定的试验条件下，以受试物的最大水溶解度为限度试验浓度（当该物质的最大水溶解度大于 100mg/L 时，以 100mg/L 为试验浓度进行试验），取 10 尾鱼进行试验，试验历时 96h，每隔 24h 更换一次药液，试验结束时如果受试鱼没有死亡，就不再继续进行下一步试验。试验结果以 96h-LC₅₀ 大于该物质的最大水溶解度或大于 100mg/L 表示。

9.2.2 预试验

9.2.2.1 准备 6 个容器，在 6 个容器中加入适量的标准稀释水，向其中 5 个容器中加入适量的受试物储备液，配制一组适宜的浓度系列，该系列浓度一般以 10 为公比做间距，例如：0.1，1，10，100，1000 mg/L，也可根据需要以其他公比进行配制。第六个容器用做空白对照。试液总体积不宜超过 5L。

9.2.2.2 每个容器中放 5 尾鱼，调节并保持试验液温度在 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。试验历时 96h。每天至少记录一次每个容器中的死鱼数目及溶解氧浓度，并及时将死鱼取出。试验期间试液无需强制曝气。

9.2.2.3 每隔 24h 更换一次试验液，试验液更换后，立即将受试鱼转移到其中，转移时应从低浓度开始依次向高浓度过渡，以避免使用抄网造成污染。

9.2.2.4 根据试验结果确定该物质 96h 对试验鱼的最高全存活浓度和最低全致死

浓度。如果该浓度范围无法确定，则另选一个浓度范围进行试验，以确定正式试验所需的最高全存活浓度和最低全致死浓度。

9.2.3 正式试验

9.2.3.1 在预试验中确定的最高全存活浓度和最低全致死浓度之间，以几何级数做间距，至少设置 5 个浓度为正式实验的浓度。其浓度范围在 3 个依次的几何系列浓度中最好能够测得 20% 到 80% 的死亡率，以估算 LC_{50} 值。

9.2.3.2 至少取 6 个容器，分别加入一定量的标准稀释水。其中 1 个作为空白对照，其余容器中加入不同量的受试物储备液，配制成所要求的浓度范围。如果试验过程中使用了助溶剂，则需设置溶剂对照，溶剂对照中助溶剂的浓度为试验液中助溶剂的最高浓度。试液总体积为 10L。

9.2.3.3 调节并保持试验液温度在 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。用尼龙或其他软惰性材料编织的小孔抄网从驯养鱼群中随机选取 10 尾鱼放入每个试验容器中。所有鱼需在 30min 内转移完毕。

9.2.3.4 试验历时 96h，每隔 24h 更换一次试液，试液更换后，立即将受试鱼转移到其中，转移时应从低浓度开始依次向高浓度过渡，以避免使用抄网造成污染。试验开始和试验结束时，测定试液及储备液中被测物质的浓度，每次更换试液的时候，也应对受试物浓度进行测定。

9.2.3.5 试验过程中，试液无需强制曝气。每天测定一次各试液的溶解氧，pH 和温度。试验期间，试液温度波动范围不得超过 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，pH 波动范围不得超过 ± 0.2 。

9.2.3.6 试验开始后 3~6h 内随时观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率，其后于 24h、48h、72h、96h 观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率，及时清除死鱼。死鱼的判断标准为用玻璃棒轻触鱼的尾部，没有反应即认为死亡。

9.2.3.7 采取适当的数理统计方法（10 结果计算）或数据处理软件对试验数据进行处理，求出 96h- LC_{50} 值及 95% 置信限。

9.3 流水式法

9.3.1 限度试验

在本标准规定的试验条件下，以受试物的最大水溶解度为限度试验浓度（当该物质的最大水溶解度大于 100mg/L 时，以 100mg/L 为试验浓度进行试验），取 10 尾鱼进行试验，试验历时 96h。启动流水装置，更新溶液的速率至少为 25L/d。

如果出口溶液的溶解氧浓度能维持大于空气饱和值（ASV）60%以上，则更新速率可以降低至 12L/d。试验液可连续更新，也可在短时间内间歇更新。试验结束时，如果受试鱼没有死亡，就不再进行下一步实验。试验结果以 96h-LC₅₀ 大于该物质的最大水溶解度或大于 100mg/L 表示。

9.3.2 预试验

9.3.2.1 宜采用流水式法进行预试验，亦可采用静水式法或换水式法进行预试验。采用流水式法进行预试验时，按照 9.3.2.2 以后的步骤进行。

9.3.2.2 准备好流水式装置，分别在 6 个容器中加入适量的标准稀释水，向其中 5 个容器中加入适量的受试物储备液，配制一组适宜的浓度系列，该系列浓度一般以 10 为公比做间距，例如：0.1，1，10，100，1000 mg/L，也可根据需要以其他公比进行配制。第六个容器用做空白对照。试液总体积不宜超过 5L。

9.3.2.2 每个容器中放 5 尾鱼，调节并保持试验液温度在 23℃±1℃。试验历时 96h。每天记录一次每个容器中的死鱼数目及溶解氧浓度，并及时将死鱼取出。试验期间试液无需强制曝气。

9.3.2.3 启动流水装置，更新溶液的速率至少为 25L/d。如果出口溶液的溶解氧浓度能维持大于空气饱和值（ASV）60%以上，则更新速率可以降低至 12L/d。试验液可连续更新，也可在短时间内间歇更新。

9.3.2.4 根据试验结果确定该物质 96h 时对试验鱼的最高全存活浓度和最低全致死浓度。如果该浓度范围无法确定则另选一个浓度范围进行试验，以确定正式试验所需的最高全存活浓度和最低全致死浓度。

9.3.3 正式试验

9.3.3.1 在预试验中确定的最高全存活浓度和最低全致死浓度之间，以几何级数做间距，至少选择 5 个浓度为正式实验的浓度。其浓度范围在 3 个依次的几何系列浓度中最好能够测得 20%到 80%的死亡率，以估算 LC₅₀ 值。

9.3.3.2 至少取 6 个容器，均加入一定量的标准稀释水。其中 1 个作为空白对照，其余容器中加入不同量的试验物质储备液，配制成所要求的浓度范围。如果试验过程中使用了助溶剂，则需设置溶剂对照，溶剂对照中助溶剂的浓度为试验液中助溶剂的最高浓度。

9.3.3.3 调节并保持试验液温度在 23℃±1℃。用尼龙或其他软惰性材料编织的小

孔抄网从驯养鱼群中随机选取 10 尾鱼放入每个试验容器中。所有鱼需在 30 min 内转移完毕。

9.3.3.4 启动流水装置，更新溶液的速率至少为 25L/d。如果出口溶液的溶解氧浓度能维持大于空气饱和值（ASV）60%以上，则更新速率可以降低至 12 L/d。试液可连续更新，也可在短时间内间歇更新。试验开始和试验结束时，测定试液及储备液中被测物质的浓度。

9.3.3.5 每天测定一次各试液的溶解氧、pH 和温度，试验开始和结束时亦要测定。试验期间，试验液温度波动范围不得超过±1℃，pH 波动范围不得超过±0.2。

9.3.3.6 试验开始后 3~6h 内随时观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率，其后于 24h、48h、72h、96h 观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率，及时清除死鱼。死鱼的判断标准为用玻璃棒轻触鱼的尾部，没有反应即认为死亡。

9.3.3.7 采取适当的数理统计方法（10 结果计算）或数据处理软件对试验数据进行处理，求出 96h-LC₅₀ 值及 95% 置信限。

10 结果计算

LC₅₀ 的计算可采用寇氏法、直线内插法或概率单位图解法估算，也可应用有关毒性数据计算软件进行分析和计算。

10.1 寇氏法

用寇氏法可求出受试鱼在 24h、48h、72h、96hLC₅₀ 值及 95% 置信限。

LC₅₀ 的计算公式如下：

$$\log LC_{50} = X_m - i(\sum P - 0.5)$$

式中：

X_m——最高浓度的对数；

I——相邻浓度比值的对数；

∑P——各组死亡率的总和（以小数表示）。

95% 置信限的计算公式如下：

$$\text{先求标准误： } S \log LC_{50} = i \sqrt{\sum \frac{pq}{n}}$$

式中：

p——1 个组的死亡率;

q——1-p;

i——相邻浓度比值的对数;

n——各浓度组鱼的数量。

$$95\% \text{ 置信限} = \log LC_{50} \pm 1.96S \log LC_{50}$$

10.2 直线内插法

采用线性刻度坐标, 绘制死亡百分率对受试物浓度的曲线, 从引起 50% 死亡率的内插浓度值求出 LC_{50} 值, 见图 1。

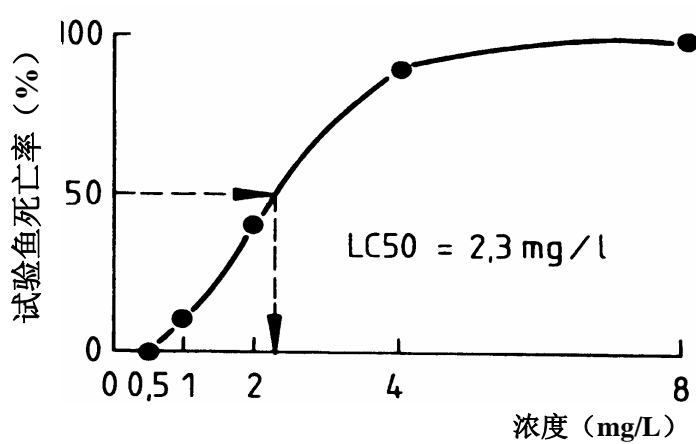


图 1 直线内插法估算 LC_{50}

10.3 概率单位图解法

用半对数纸, 以浓度对数为横坐标, 死亡百分率对应的概率单位为纵坐标绘图。将各实测值在图上用目测法画一条相关直线, 从直线中读出 LC_{50} 值。

10.4 结果表示

以 96h- LC_{50} 表示受试物在相应时间内对斑马鱼致死率的影响。

检测化学物质样品时, 以毫克/升表示, 计算结果有效位数保留 4 位。

检测废水样品时, 以百分数或毫升/升表示, 计算结果有效位数保留 4 位。

10.5 试验结果的有效性

试验过程中须满足下列条件, 该试验结果有效。

10.5.1 受试物浓度不低于理论浓度的 80%。

10.5.2 试验结束时所有对照组和处理组溶解氧浓度不应低于空气饱和值的 (ASV)60%。

10.5.3 对照组受试鱼的死亡率或非正常率 \leq 10%，或每缸 \leq 1尾。

10.5.4 参比物质重铬酸钾对受试鱼的 24h-LC₅₀ 在 200~400mg/L 之间，且同一实验室不同时期的试验结果一致。

10.5.5 试验期间应保持实验室条件正常，如出现停电、停水等情况而影响试验的，应及时停止试验，待实验室条件恢复正常后重新进行试验。

11 试验报告

试验报告须包括下列内容：

- a. 受试物名称、来源、纯度和理化性状。
- b. 试验方法及标准稀释水、储备液、试验液的配制方法及性质。
- c. 试验鱼的名称、来源、大小、数目及预养情况。
- d. 试验条件：水温、光照、溶解氧、pH 值、水质等。
- e. 试液浓度及试验开始后 24h、48h、72h、96h 的 LC₅₀ 值和 95% 置信限、
- f. 中毒症状及所采用的计算方法。
- g. 对照组鱼的死亡率、行为反应异常的比例。

附录 A (规范性附录)

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 的驯养繁殖条件及方法

A1 引言

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 俗称蓝条鱼、花条鱼、斑马担尼鱼, 隶属鲤科、短担尼鱼属, 原产印度, 后移殖到缅甸、孟加拉、新加坡等地。

斑马鱼体长为 4~6cm, 最大体长可达 8cm。体呈纺锤形, 稍侧扁, 臀鳍较长, 尾鳍呈叉形。体侧有像斑马一样的纵向条纹, 其背部橄榄色, 条纹为银蓝色, 在体侧从鳃盖后直伸到尾, 在臀鳍上也有与体侧相似的条纹, 具有一定的观赏价值, 是一种典型的亚热带水观赏鱼类。

斑马鱼除了具有经济、观赏价值外, 由于个体小, 周期产卵, 且产卵周期短、产卵量高、卵大、体外受精、体外发育等一系列特点被广泛应用于胚胎学、发育生物学、毒理学、分子生物学等研究, 具有很高的科研价值和广泛的应用前景。

A2 生活习性

斑马鱼性情温和, 活泼好动, 适宜混养。对水质要求不苛刻, 喜在中性的水中生活, 喜新水, 适宜水温 22~30℃, 极限低温为 10℃。斑马鱼在热带鱼中算是适温范围最广的鱼类之一, 水温在 15~40℃之间都可生存。斑马鱼喜在上层水域活动觅食, 对饵料不挑剔, 各种鱼虫及人工饵料均可投喂。

A3 人工繁殖

A3.1 材料

容积 2L 以上的玻璃容器均可作产卵箱。由于成鱼贪吃鱼卵, 故需要有保护鱼卵和幼鱼的方法。一种行之有效的方法是, 在距产卵箱底部 2cm 处设一挡板, 板上开孔 (孔眼直径约 3~5mm), 将成鱼限制在挡板上。当雌鱼产卵时, 卵通过板孔落入箱底, 而成鱼不能到达此区。

A3.2 方法

斑马鱼属卵生鱼类, 4 月龄进入性成熟期, 一般用 6 月龄鱼繁殖较好。斑马鱼繁殖周期约 10d 左右, 一年可连续繁殖许多次, 而且产卵量较多。

成熟后的雌雄鱼应分开饲养。产前 12h 停止喂养。将新鲜自来水放置 48h

或经曝气 1h 后的蒸馏水注入产卵箱内,于晚间将雌雄鱼按 1 : 2 的比例放入产卵箱中。产卵箱内温度控制在 20~26℃,一般于次日上午或中午开始产卵,大约 3h 产卵完毕。雌鱼每次产卵约 300 粒,个体大者可达千粒,此时将成鱼取走,留下卵待孵化。

鱼卵孵化时间约为 60h,孵化时温度控制在 26℃左右。孵化完,鱼苗附着在箱壁上 24~48h 内不动。当鱼苗能自由游动时,用原生动物或特制的小颗粒鱼食喂饲。3 周后,用新孵化的丰年虫无节幼体喂鱼苗,一个月后转移到容积两百升的水族箱内,喂以活的或特制的饲料,三个月后,鱼性成熟,体长达 3.5cm 左右。

附录 B (规范性附录)

青鳉鱼 (*Oryzias latipes*) 的驯养繁殖条件及方法

B1 前言

青鳉属鲈形目 (Cyprinodontiformes) 青鳉科 (Oryziatidae) 青鳉属 (*Oryzias*)，英文名称为 Japanese Medaka，是一种小型淡水鱼类。成年个体体长一般在 20-40mm 之间。其性皮实，耐受温度和盐分的范围较广，食性较杂，极易饲养管理。在我国华北、华东及华南各地均有广泛的分布。因为其清楚的遗传背景及易获得性，近年来被广泛用作水生毒理学的实验材料。

B2 环境参数

青鳉属卵生鱼类。鱼苗经过 2-6 个月的生长，体长 20mm 左右开始性成熟。天然产卵在 4~9 月之间，6、7、8 月为产卵高峰。产卵温度范围在 16~29℃，以 21~26℃ 较为适宜。一尾正常雌鱼在生殖季节能产出 3000 粒卵。

水温 25℃ 时，受精卵经过 11 天发育即可孵出鱼苗。鱼苗阶段摄食原生动物及轮虫等，逐步转吃小型浮游甲壳动物、藻类及其它碎屑。

B3 人工繁殖

B3.1 材料

水族箱、玻璃缸和其它水槽均可用来饲养青鳉。用前，先用洗涤剂洗刷、自来水冲洗干净。然后用曝气的自来水灌至八成满。为防止水分过量蒸发导致盐分升高，容器可以加盖，或补充适量的蒸馏水。容器大小与水的体积视鱼数量多少而定。一般 50 升的水族箱放养 100 尾成年青鳉是比较合适的。

B3.2 繁殖条件

饲养用水的 pH 在 7 左右，溶解氧充足，且不能含有毒物质。鱼缸放在朝北或朝东靠窗户处比较适宜。在暗室内，用日光灯亦可控制青鳉正常产卵。水温控制在 15-27℃ 之间为宜。产卵温度，夏季 21-26℃，冬季 25-28℃。温度超过 30℃，持续 24h 以上则有致死危险。温度突然变化也会产生不利影响。

青鳉的食性较杂，凡用以喂养热带鱼的饵料都可作为青鳉鱼的饵料。需要注意的是，每天要喂食两次，每次喂的量宜少，切忌过量，不然会恶化水质。另外，

每周应适当加喂些活食，尤其在繁殖期间，每周应喂 2~3 次活食，如小型枝角类和新孵出的丰年虫等。

每天用虹吸管将缸底沉积物清除干净，换入部分新水，保护水质清新。如发现死鱼，要及时清除。青鳉一般不易生病，如果发现疾病感染，则要把鱼缸彻底清洗、消毒，再把健康个体放养进去。

B4 繁殖方法

B4.1 产卵

成熟青鳉按 3 雌 2 雄的比例放养在适当大小的水族箱中，控制光照和温度，即可进行人工引产。用日光灯照明 16 小时，保持黑暗 8 小时（光周期可用计时器自动控制）；水温控制在 25~28℃ 之间；食物充足。在以上条件下，10 天之内即可使青鳉产卵。只要满足以上条件，在冬季照样可以产卵繁殖。如果实验工作需要，可使产卵提前或推后进行，只要预先把光照周期调整好即可。

B4.2 鱼卵孵化

卵产出后，卵块应尽可能及时取走，不然会被亲鱼吃掉。可用小抄网将腹部带有卵块的雌鱼捞至水面（但不离开水面），再用大口吸管将卵块吸下来，移至孵化槽孵化。已脱落沉底的受精卵也要同时吸出。

收集到的受精卵放入小网箱内，再悬挂到孵化槽中。孵化槽水温保持在 15~25℃，并充以空气，保持溶解氧充足。凡发白或长霉的死卵要及时剔除。在有条件或要求严格的情况下，受精卵应经过消毒，培养用的水经由人工配制，这样可以避免微生物的侵袭。

B4.3 鱼苗的发育

鱼苗孵出以后，用吸管或细密小网小心移入鱼苗培育槽中培养。该槽中最好有少量水草和固着藻类，可帮助补充氧气；但要有大的青鳉或别的鱼存在，因为它们会把鱼苗吃掉。鱼苗放养密度按 1 尾/4cm² 水面计。

第一周内的鱼苗，喂些“肥水”（含原生动物、轮虫等）、成熟蛋黄。第 2、3 周喂以新孵出的丰年虫。仅少量食物即够，切勿多喂。正常饲养管理条件下，4~6 周内可长至 15mm。此时可按成年鱼进行饲养管理。

附录 C (规范性附录)

孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*) 的驯养繁殖条件及方法

C1 引言

孔雀鱼 (*Ledistes reticulatus*), 俗名彩虹鱼。隶属花鳉科, 虹鳉属。原产于委内瑞拉及巴西。全长可达 5~6cm, 是一种小型热带观赏鱼。孔雀鱼的适应性很强, 容易饲养, 生物学家常把孔雀鱼当作实验材料进行毒理学研究。

C2 生活习性

孔雀鱼适应性强, 可在水温 13~35℃ 的水中生存, 最适生长水温为 23~26℃。对水质要求不高, 较耐低氧。食性属杂食性, 水蚤、丰年虫、纤毛虫、丝蚯蚓及昆虫幼虫均是它喜欢的食料, 它也能吃些植物性饲料, 如水族箱内生长的青苔。

C3 人工繁殖

C3.1 材料

饲养孔雀鱼, 以水族箱为容器最适宜, 当然, 条件受限者可用小型的玻璃缸或盆子等容器, 另外还须有一些辅助设备和用具, 如: 捞鱼网, 捞虫网, 储水桶, 水温计, 增温棒, 过滤器, 增氧器具和照明设施等。

C3.2 繁殖方法

达性成熟的雌雄孔雀鱼, 从外形上区别十分明显。雌鱼身材较雄鱼肥大, 体色不鲜艳; 雄鱼具有美丽鲜艳的体色。选择全长 5~6cm 孔雀鱼若干组作为亲鱼, 雌雄比例以 1:3~1:4 为宜, 雄鱼最好选择色彩鲜艳且属同一品系的优良品种。

把挑好的亲鱼放入消过毒且刷洗干净的水族箱中。孔雀鱼属卵胎生, 繁殖能力很强。繁殖时对水质的要求并不高, pH 值在 6.5~7.5 之间即可, 硬度在 6~12 德国度之间都可以, 但水温一定要保持在 25~27℃ 之间。水族箱中最好种些水草。每天投喂丰富的水蚤或红线虫, 以保证亲鱼的正常发育, 同时需要保持水质清新。饲养一段时间, 待雌鱼腹部膨大后, 随即把雌鱼捞出进行单养。当雌鱼腹部出现黑色胎斑, 说明快要产仔, 当肛门空出, 即将临产。每尾发育健全雌孔雀鱼, 可产幼鱼 30~50 尾, 产幼鱼的多少, 与雌亲鱼的规格、身体状况、喂养条件等都有着密切关系。幼鱼产出第 2 天就要喂食, 第一周喂纤毛虫与丰年虫, 第二周投

喂丝蚯蚓与干饲料。
