

余露军,李建军,蔡磊,等. 实验鱼质量控制标准研制的思考与建议[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 115-122.

Yu LJ, Li JJ, Cai L, et al. Suggestions for the development of experimental fish quality control standards [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 115-122.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.017

实验鱼质量控制标准研制的思考与建议

余露军,李建军,蔡磊,魏远征,苗宗余,黄韧*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 实验鱼作为重要的实验材料,在生命科学、医学以及水环境安全性评价等研究中发挥着越来越重要的作用。目前,国内实验鱼生产量和研究队伍发展迅速,实验鱼的使用量也逐年上升,但实验鱼质量良莠不齐,可能对科学实验结果造成严重影响,因此迫切需要制定实验鱼质量控制标准对其生产加以规范和引导。本文就实验鱼质量控制及其研究现状进行综述,以期实验鱼质量控制标准的制定提供建议和参考。

【关键词】 实验鱼;质量控制;建议

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0115-08

Suggestions for the development of experimental fish quality control standards

YU Lujun, LI Jianjun, CAI Lei, WEI Yuanzheng, MIAO Zongyu, HUANG Ren*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com

【Abstract】 As an important experimental subject, experimental fish play an increasingly important role in life science, medicine, and water environment safety evaluation. At present, domestic production and research teams of experimental fish are expanding rapidly; the use of experimental fish is increasing yearly. However, the quality of the experimental fish is inconsistent, which may have a serious impact on the result of scientific experiments. Therefore, there is an urgent need to formulate experimental fish quality control standards to regulate and guide their production. This paper reviews the quality control of experimental fish and its research status, and provides suggestions and references for the development of experimental fish quality control standards.

【Keywords】 experimental fish; quality control; suggestion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

实验动物被国际学界公认为“活的精密仪器”,质量控制及其标准化是实验动物的必然要求。鱼类具有种类多、繁殖力强、遗传容易控制、饲养设施要求简单等诸多优点,实验鱼在遗传学、发育生物学、毒理学、生态学等研究中应用广泛^[1-2],全球实验鱼用量仅次于大小鼠,我国仅斑马鱼生产和使用单位已超过 300 家,但实验鱼质量良莠不齐,相关试

验结果可靠性难以保障,迫切需要制定质量控制标准加以规范和引导。

国家标准化管理委员会下达的《2009 年第二批国家标准制修订计划的通知》批准制定《实验动物鱼类环境与质量控制标准》,技术归口单位为全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC281),计划编号为 20091329-T-469,起草单位为广东省实验动物

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05)。

Funded by National Key Technologies R&D Program of China (2015BAI09B05).

【作者简介】 余露军(1982—),男,硕士,工程师,研究方向:水生实验动物微生物学。Email: ljyu1212@163.com

【通信作者】 黄韧(1959—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:1649405216@qq.com

监测所(以下简称“动监所”)、中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心(以下简称“CZRC”)、中国水产科学研究院珠江水产研究所(以下简称“珠江所”)、上海实验动物研究中心(以下简称“动物中心”)、中国医学科学院医学实验动物研究所。CZRC 负责斑马鱼(*Danio rerio*)研究资源的收集、收藏和分享,在遗传分析、繁殖技术及病原控制上有良好的工作积累,也是国内斑马鱼品系保存量最多的单位^[3]。动物中心长期开展斑马鱼病原、养殖环境等方面的研究工作。珠江所于 1987 年开始剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)实验动物化研究,在剑尾鱼生物学特性、病原、营养和环境要求等方面积累了大量数据,剑尾鱼 RR-B 近交系为我国自主培育的第一个超过 20 代的近交鱼^[4]。动监所自 1997 年开始诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)实验动物化研究,先后建立了虾虎鱼遗传、微生物、营养和环境需求等质控方法,是目前国际上实验动物化程度最高的海水实验鱼类^[2]。本文以上述单位研究工作为基础,综述实验鱼质控标准研究现状,以期为我国实验用斑马鱼、剑尾鱼、虾虎鱼质量控制标准的制定提供建议和参考。

1 研究背景与现状

1.1 我国实验鱼质量控制现状

目前,来自观赏鱼市场或自然水域的实验鱼直接应用于科学研究的现象难以杜绝,不同实验室内相互引种复壮也常有发生,导致实验鱼遗传背景混乱。另外,由于场地和经费的限制,大部分实验鱼房为开放环境,鱼房条件、病原控制措施以及风险防范意识差异较大。对国内 19 个实验鱼代表性实验室的调研结果显示,烈性传染病虽极少发生,但实验鱼病害问题也较为普遍,如斑马鱼常见病害及其在各实验室的发生率为:竖鳞病(67%)、红鳃病(50%)、下颌红鳃(42%)、脊椎弯曲(25%)、烂尾(25%)、游动异常(25%)、白点病(8%);除 CZRC 等少数实验室坚持开展病原监测外,很多实验室对此重视不够,实验鱼疾病发生、传播风险较大。

各实验室对实验鱼养殖设施和水环境控制较为重视,大多具有较好的硬件基础,除红鲫、剑尾鱼采用自制玻璃缸并配套水处理养殖系统外,其他更小个体实验鱼的养殖均为商品化的循环水养殖系统,配套水质过滤、硝化处理、紫外消毒等水处理措施,部分斑马鱼养殖系统还配备了超滤、反渗透、电导率自动调节及监控设备。大部分实验室关注水温、pH、电导率三个水环境指标,而对非离子氨、亚

硝酸盐等水质指标检测较少;而鱼房环境指标则主要是通过空调和抽风机进行温度和湿度控制,以满足实验鱼和实验人员的基本需求。

1.2 国内外实验鱼质量控制标准研究现状

欧美等国制订一系列实验鱼使用指南,如《Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing》(研究、教学和测试用鱼的使用和管理指南,加拿大动物保护协会,2005)^[5]、《Guidelines for the Use of Fishes in Research》(研究用鱼使用指南,美国,2014)^[6]、《Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research》(研究用鱼的健康和福利监测指南,挪威,2006)^[7]、《A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio Rerio*)》(实验室使用斑马鱼指南,美国,2000)^[8]、《Guidance on the housing and care of zebrafish》(斑马鱼养殖和管理指南,英国,2013)^[9]等。但上述指南多是原则性的(提出一些基本要求)或资料性的(方向性建议、指导),多数指标参数未明确规定,不利于规范执行。

在国内,2009 年《实验动物 鱼类环境与质量控制标准》国家标准(20091329-T-469)获得立项;2013 年 12 月 20 日北京市质量技术监督局发布了实验用鱼质量控制地方标准,包括实验用鱼微生物学等级及监测、寄生虫学等级及监测、遗传质量控制、病理诊断、配合饲料、环境条件 6 个部分^[10-15];2016 年 12 月 29 日湖南省质量技术监督局批准发布了《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制》(DB43/T 1191-2016)^[16]。

2 实验鱼质量控制标准研究的思考

2.1 种质

2.1.1 种质鉴定的必要性

“种”的准确是实验动物的基本要求,也是动物实验结果可信的前提。通过数据库(www.fishbase.org)检索发现斑马鱼、剑尾鱼和诸氏鲮虾虎鱼同属的已定种分别有 20 种、28 种和 31 种,部分近缘种体型、体色极其相似,且部分种间可能无生殖隔离。为了解国内斑马鱼、剑尾鱼和诸氏鲮虾虎鱼种质资源状况,工作组对国内实验鱼使用单位及观赏鱼交易市场进行实地调研和取样,结果表明国内存在大量 *Danio* 属、*Xiphophorus* 属和 *Mugilogobius* 属鱼类。利用形态学和分子生物学方法对采集样本进行种质鉴定,已鉴定出 *Danio* 属鱼类有 6 种(其中 5 种可定种)、*Xiphophorus* 属鱼类 2 种、*Mugilogobius* 属鱼类 2 种。根据采集的样本发现 *Danio* 属其他鱼类与斑

马鱼体型非常相似;采集的 2 种 *Xiphophorus* 属在体色、体型上与剑尾鱼相似,且已证实市场上存在剑尾鱼(*X. helleri*)和月光鱼(*X. maculatus*)的杂交种;2 种 *Mugilogobius* 属鱼类(*M. abei*, *M. myxodermus*)不仅在体型体色上与诸氏鲮鲤虎鱼相似,且部分生态位重叠,极易发生混杂。因此,引进实验鱼时有必要进行种质鉴定。

2.1.2 种质鉴定方法

传统形态学鉴定虽为经典的物种分类方法,但由于实验鱼可量性状和一些质量性状在不同养殖条件下可能出现较大差异,本标准仅将形态学中的可数性状作为检测指标。同时,线粒体 DNA 条形码序列是一段位于细胞色素 C 氧化酶亚单位 I(COI)基因 5' 端 655 bp 的序列,Hebert 等^[17]于 2003 年首次提出 DNA 条形码概念,随后启动了全球动物物种 DNA 条形码测序计划,现在已经建立了以线粒体 COI 基因序列为依据的 DNA 条形码数据库(<http://www.boldsystems.org>)并广泛应用于物种鉴定,因此建议将 DNA 条形码检测方法作为实验鱼形态鉴别不可检验时的补充方法。

Hebert 等^[17]将 DNA 条形码序列歧义度小于 2.7% 作为鸟类种内判别阈值;Lambert 等^[18]研究结果显示种内 DNA 条形码序列歧义度在 0% ~ 1.24% 之间;通常认为 DNA 条形码序列歧义度种内差异小于 1%^[19]。本实验室对市场采集的鱼类进行 DNA 条形码检测, *Danio* 属样本与斑马鱼、*Xiphophorus* 属样本与剑尾鱼、*Mugilogobius* 属样本与诸氏鲮鲤虎鱼序列歧义度差异均极显著($P < 0.01$),斑马鱼、剑尾鱼、诸氏鲮鲤虎鱼种内 DNA 条形码序列歧义度 0% ~ 0.76% (未发表数据),但考虑到样本量有限,且国内实验鱼使用单位较多,来源也较复杂,因此建议实验鱼种内 DNA 条形码序列歧义度阈值定为 1%。

2.2 遗传质量管理

实验鱼培育过程中存在遗传污染、突变、漂变等情况,有必要对实验鱼遗传质量进行管理。国内 19 个代表性实验室调研结果表明,各实验室对实验鱼遗传质量关注度不高,检测方法尚不成熟,均不进行日常遗传质量检测,仅实验鱼基因插入或敲除时才会对特定基因进行检测。文献发现,国外暂无实验鱼遗传质量检测标准,仅少量实验室利用微卫星分子标记开展实验鱼遗传多样性评价。由此可见,遗传质量检测仍为当前实验鱼质量控制中的薄弱环节,鉴于国家标准的通用性、实用性和可操作性,建议通过遗传管理措施,尽可能保证实验鱼遗

传质量,具体措施如:①实验鱼种源宜引自行业认可的实验鱼种源单位或实验室;②引种数量和传代方式宜根据实验鱼应用方向确定,如需保持群体较高遗传杂合度,引种数量应不少于 25 对,采用非近亲交配方式繁殖后代;③如需保持群体较高遗传纯合度,引种数量根据需要确定,采用全同胞兄妹、雌核发育等方式繁殖后代;④实验鱼引种、传代过程应建立包括种名、来源、数量、雌雄比例、繁殖生产情况等信息的谱系档案;⑤常用实验鱼最佳繁殖年龄均在 6 ~ 15 月龄,此阶段实验鱼繁殖量大、产卵质量最佳,传代亲本宜选自此阶段的实验鱼。

2.3 微生物和寄生虫

实验鱼疾病直接影响实验鱼的养殖成功与否,同时会引起实验鱼生理生化指标异常,从而影响实验鱼在免疫学、毒理学等领域的应用^[20-22],部分病原还可能危及实验人员健康^[23]。实验鱼病原控制指标,首先应符合我国动物疫病相关法规规定,不能携带人鱼共患病原,同时需对实验鱼传染性强、致死率高的病原加以控制。

2.3.1 斑马鱼病原控制指标与要求

CZRC 连续多年病原检测服务结果表明,嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是引起斑马鱼败血症的主要病原;动物中心对上海地区斑马鱼病原检测结果也证实嗜水气单胞菌为实验室内检出率和致死率较高的病原^[24]。值得注意的是,嗜水气单胞菌为条件致病菌,广泛栖息于自然水体中,有致病株和无毒株之分^[25]。鉴于致病性嗜水气单胞菌对斑马鱼具有较大的危害性,且为 2008 年农业部公告《一、二、三类动物疫病病种名录》(以下简称“疫病名录”)规定的二类水生动物疫病(细菌性败血症)的病原,属于可能造成重大经济损失,需要采取严格控制、扑灭等措施,防止扩散的病原,因此建议将致病性嗜水气单胞菌规定为斑马鱼必检指标。

国外学者研究表明,多种分枝杆菌能自然感染斑马鱼,引起斑马鱼内脏器官肉芽肿等病变,但只有海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)对斑马鱼具有高致病性^[26-28]。CZRC、珠江所以以及国际斑马鱼中心(https://zebrafish.org/wiki/health/disease_manual/bacterial_diseases)检测结果显示,海分枝杆菌是实验室内斑马鱼常见病原,影响斑马鱼正常繁殖,甚至导致斑马鱼死亡。同时,海分支杆菌还属于人鱼共患病原,国外已有感染实验人员的报道^[23]。基于海分支杆菌对斑马鱼和实验人员的危害考虑,建议将海分支杆菌规定为斑马鱼必检指标。

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)为我国

“疫病名录”规定的三类水生动物疫病的病原,可通过饮食或创口接触等感染人类,属于人鱼共患病病原^[29]。刘春等^[30]研究表明,迟缓爱德华菌能自然感染野生斑马鱼,引起斑马鱼大量死亡,但实验室内斑马鱼尚无感染该病原的报道。鉴于迟缓爱德华菌对实验室内斑马鱼潜在的传播感染风险,建议将迟缓爱德华菌规定为斑马鱼必要时检测指标。

多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 是水产养殖以及观赏鱼行业最为严重的病原之一,为我国“疫病名录”规定的三类水生动物疫病的病原^[31]。斑马鱼对该病原敏感,感染会导致大量死亡^[32]。调研发现国内个别实验室发生过引种未经隔离的斑马鱼感染多子小瓜虫,造成大量死亡的案例。鉴于多子小瓜虫对斑马鱼危害极大,常造成毁灭性的损失,建议将其规定为斑马鱼必检指标。

微孢子虫 (*Pseudoloma neurophilia*) 是斑马鱼最常见的病原之一^[33-34], CZRC 和珠江所均从斑马鱼检出过该病原。斑马鱼感染初期并无明显症状,只有严重感染时,才会导致斑马鱼脊椎弯曲,影响斑马鱼神经生物学和骨骼发育生物学等方面的研究结果^[35]。综合微孢子虫的危害程度和国内检出情况,建议将微孢子虫规定为斑马鱼必要时检测指标。

此外,柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)、温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 等病原感染实验室内斑马鱼的情况也偶有发生 (<http://www.zfish.cn/inforscan/252.html>), 但仅水质异常、鱼体受伤等情况下出现,建议根据养殖状况进行适时自查与监测。

2.3.2 剑尾鱼病原控制指标与要求

珠江所对剑尾鱼 20 多年病原研究结果显示,实验室内剑尾鱼病原菌主要有嗜水气单胞菌、柱状黄杆菌、温和气单胞菌等^[4,36],其中嗜水气单胞菌感染引起的细菌性败血症危害较大,而其他病原大多在水质异常、鱼体损伤时易发生继发性感染。剑尾鱼寄生虫病原有多子小瓜虫、车轮虫等,但多与水源及外来生物携带病原有关,实验室内管理得当情况下较少发生^[4,37]。鉴于致病性嗜水气单胞菌和多子小瓜虫分别为我国“疫病名录”规定的二类 and 三类水生动物疫病病原,且对剑尾鱼具有较强的致病性,建议将致病性嗜水气单胞菌和多子小瓜虫规定为剑尾鱼必检指标,其他病原根据养殖状况适时检测。

2.3.3 虾虎鱼病原控制指标与要求

动监所对虾虎鱼病原调查结果表明,致病性嗜

水气单胞菌、迟缓爱德华菌和创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 在野外和驯养环境下能自然感染虾虎鱼,引起虾虎鱼出血、溃烂等病症,其中迟缓爱德华菌对虾虎鱼具有强致病性^[38-39],但实验室内虾虎鱼封闭群连续多年监测均未检出上述致病菌^[2],表明这些病原可能为野外环境条件下的条件致病菌。鉴于致病性嗜水气单胞菌和迟缓爱德华菌分别为我国“疫病名录”规定的二类和三类水生动物疫病的病原,且考虑到迟缓爱德华菌对虾虎鱼的强致病性,建议将致病性嗜水气单胞菌和迟缓爱德华菌规定为虾虎鱼必检指标,将创伤弧菌规定为虾虎鱼必要时检测指标。此外,在驯养过程中,老龄化虾虎鱼偶有眼点淀粉卵涡鞭虫 (*Amyloodinium ocellatum*) 感染的情况,且考虑到刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 对海水鱼类危害极大,为我国“疫病名录”规定的二类水生动物疫病的病原,因此建议将刺激隐核虫规定为虾虎鱼必检指标,眼点淀粉卵涡鞭虫为必要时检测指标。

2.4 饲料质量要求

实验动物饲料质量与实验动物质量密切相关。已有不少学者在实验鱼的营养需求和饲料配方等方面开展了研究工作,如魏远征等^[40-41]研究了虾虎鱼饲料营养需求,确定了虾虎鱼饲料配方;吴淑勤等^[4]研究了剑尾鱼饲料营养需求,并比较了投喂配合饲料与生物饵料对剑尾鱼性腺发育的影响,探讨了配合饲料投喂策略;杭州环特生物科技有限公司对斑马鱼开口饲料营养需求和配方开展了研究;美国 Zeigler 公司生产斑马鱼专用饲料。然而,由于配合饲料仅少量实验室采用,需求量少,商品化生产较为困难,加之大量研究表明投喂生物饵料的实验鱼在生长速度和存活率方面明显优于人工配制的微粒饲料,尤其在开口阶段^[42],因此国内现有实验鱼生产和养殖过程中仍以生物饵料为主。生物饵料包括轮虫、卤虫、草履虫以及桡足类和枝角类等,其中轮虫、卤虫、草履虫是最常使用的生物饵料。生物饵料携带病原微生物可能感染实验鱼,影响实验鱼质量和存活。为防止生物饵料引入病原,建议生物饵料应以不携带实验鱼应排除的微生物和寄生虫作为基本要求,且其培育用海水应符合 NY 5052 的规定,淡水应符合 GB 5749 的规定,以免有毒有害物质通过食物链传递至实验鱼。

2.5 环境指标及要求

养殖环境对实验鱼具有重要影响,如水温直接影响鱼类生长、繁殖及免疫能力等各项生理活动,

适宜的水温是鱼类生存和健康的重要保障^[43-45]; pH 则会引起鳃组织损伤, 降低精子活力, 破坏卵膜结构, 对鱼类生长发育、繁殖产生重要影响^[46-47]; 盐度直接影响渗透压调节, 与鱼类生长、繁殖、疾病及存活密切相关^[48-49]; 溶解氧是鱼类生存和生长发育的关键因子, 水体溶解氧过低, 会导致鱼体缺氧, 从而影响其摄食率、消化率、免疫力等, 严重时窒息死亡^[50]; 非离子氨和亚硝酸盐不仅影响鱼类血液指标和免疫机能, 严重时还会导致鱼类中毒死亡^[51-52]。虽然鱼类生活在水中, 但光照强度和光周期对鱼类繁殖和疾病等方面也具有重要影响^[53]。基于上述研究结果, 建议实验鱼质量控制标准对养殖水温、日水温差、电导率、pH、溶解氧、盐度、非离子氨、亚硝酸盐、水面照度及明暗交替时间等水环境指标进行控制, 同时对饲养间温度、最低工作照度、噪声等环境指标进行规定。

2.5.1 饲养间环境指标

(1) 室温和日室温差: 饲养间温度超出要求的水温范围较多或日室温差较大, 则水温难以控制, 故需控制饲养间气温和日室温差。考虑到水体比热容较大, 水温昼夜温差波动幅度较气温小, 为降低能耗, 饲养间温度控制范围可略大于水温 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), 建议日室温差不超过 6°C 。

(2) 噪声: 大量研究表明, 鱼类对长期的噪音具有适应能力^[54-56]。Matthews 等^[53]、Barney 等^[57]研究表明斑马鱼能适应养殖房的水泵、水流等环境噪音, 音乐等噪音也不会引起斑马鱼的异常行为反应。斑马鱼在 70 dB 噪声持续刺激下, 其行为(运动速度和转次)无明显变化^[58]; 虹鳟分别在 117 dB 和 149 dB 噪声暴露 5 个月后, 平均体重、体长、特定生长速率、肥满度、饲料利用率及成活率均无显著差异^[59]。国外实验室对斑马鱼生产和使用过程中环境噪音的管理通常是基于人类的健康和舒适度而定^[53]。GB 22337-2008《社会生活环境噪声排放标准》规定社会生活噪声排放昼间限值为 70 dB, 实验鱼饲养间实测噪声大多为 60 ~ 67 dB, 此噪声下实验鱼的行为、生长及繁殖指标均无异常。因此, 建议实验鱼饲养间噪声应 ≤ 70 dB。

(3) 最低工作照度: 工作照度是满足管理操作人员工作需求的照度, 实验鱼与陆生实验动物管理人员的工作照度需求一致, 建议参照 GB 14924-2010《实验动物 环境及设施》设定工作照度应 ≥ 200 lx。

2.5.2 水环境指标

(1) 水温: Spence 等^[60]对孟加拉国斑马鱼原产地 9 个不同地区的水温监测结果显示, 斑马鱼原产

地水温范围为 $16.5 \sim 33^{\circ}\text{C}$, 表明斑马鱼对温度具有广泛性的适应性; Matthews 等^[53]研究结果表明斑马鱼养殖水温在 $24 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 状态最佳, 建议斑马鱼养殖水温宜为 $24 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 。根据吴淑勤等^[4]研究结果, 建议剑尾鱼水温宜为 $20 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 。同时, 根据动监所近 20 年的养殖实践, 建议虾虎鱼水温宜为 $22 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 日水温差: 鱼类属于变温动物, 体温随着水温的升降而变化, 因此水温波动会引起鱼体一系列应激反应, 易导致实验鱼发病、甚至死亡。理论上日水温差越小越好, 但结合养殖实践和可操作性, 建议日水温差控制在 4°C 内较合适。

(3) 电导率: Avdesh 等^[61]推荐斑马鱼电导率适宜范围为 $300 \sim 1500 \mu\text{S}/\text{cm}$; 根据国内主要斑马鱼和剑尾鱼养殖鱼房调研结果, 其养殖水电导率控制在 $500 \mu\text{S}/\text{cm}$ 左右。由于养殖水源的地域性差异, 考虑可操作性, 建议斑马鱼和剑尾鱼养殖水电导率范围为 $300 \sim 1500 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

(4) pH: 根据 Avdesh 等^[61]研究结果, 斑马鱼适宜 pH 范围为 $6.8 \sim 7.5$; 《剑尾鱼养殖手册》推荐剑尾鱼适宜 pH 范围为 $6.8 \sim 8.3$ ^[62]; GB 11607-89《渔业水质标准》规定海水鱼养殖 pH 值范围为 $7.0 \sim 8.5$, 而天然海水的 pH 值常稳定在 $7.9 \sim 8.4$ 。根据养殖实践, 建议虾虎鱼 pH 值控制在 $7.0 \sim 8.5$ 。

(5) 溶解氧: GB 11607-89《渔业水质标准》要求海淡水鱼溶解氧每天必须有 16 h 以上大于 $5 \text{ mg}/\text{L}$, 其余任何时候不得低于 $3 \text{ mg}/\text{L}$ 。为保障实验鱼质量, 建议实验鱼循环养殖系统中养殖水溶解氧大于 $5 \text{ mg}/\text{L}$ 。由于实验鱼仔鱼为半静水养殖, 生物饵料、残饵和粪便会导致水体溶氧降低, 但增氧可能影响实验鱼仔鱼的活动, 结合实践情况, 建议实验鱼仔鱼静水养殖溶解氧不低于 $3 \text{ mg}/\text{L}$ 。

(6) 盐度: 李建军等^[63]研究表明, 虾虎鱼繁殖适宜盐度范围为 $10.0 \sim 20.0$, 生长盐度适宜范围为 $0.0 \sim 40.0$, 而世界大洋的平均盐度为 35.0 , 故建议虾虎鱼养殖盐度宜为 $10.0 \sim 35.0$ 。

(7) 非离子氨浓度: GB 11607-89《渔业水质标准》规定分子态氨浓度应小于 $0.02 \text{ mg}/\text{L}$, 这是理想、安全的水质氨指标, 氨浓度在 $0.02 \text{ mg}/\text{L}$ 以下时一般不会导致鱼类发病。而海水鱼类对氨氮具有一定的耐受性, 虾虎鱼氨氮的安全浓度为 $0.91 \text{ mg}/\text{L}$ ^[64], 可适当提高海水实验鱼的非离子氨浓度限值。因此, 建议斑马鱼、剑尾鱼养殖水非离子氨浓度 $\leq 0.02 \text{ mg}/\text{L}$, 虾虎鱼非离子氨 $\leq 0.04 \text{ mg}/\text{L}$ 。

(8)亚硝酸盐浓度:亚硝酸盐是氨转化为硝酸盐过程中的中间产物,亚硝酸盐对鱼类有毒性。水体中亚硝酸盐浓度过高时,可通过渗透与吸收作用进入鱼类血液,将鱼红血球中的血红蛋白转化为高铁血红蛋白,从而使血液丧失载氧能力。一般淡水中亚硝酸盐浓度 $\leq 0.2 \text{ mg/L}$ 对鱼类无毒性^[61],较高的盐浓度(较高的离子强度)能减低亚硝酸对鱼的毒性,即海水中亚硝酸盐毒性较小,故虾虎鱼推荐亚硝酸盐 $\leq 0.4 \text{ mg/L}$ 。

(9)水面照度及昼夜明暗交替时间:斑马鱼适宜的水面照度为 $54 \sim 324 \text{ lx}$,明暗交替时间 $14 \text{ h} / 10 \text{ h}$ ^[53];根据国内外研究结果和国内实验鱼房调研情况,昼夜明暗交替时间 $14 \text{ h} / 10 \text{ h}$ 是目前最常用的参数。剑尾鱼和虾虎鱼水面照度及昼夜明暗交替时间参照斑马鱼范围,可正常繁殖和生长。因此,建议斑马鱼、剑尾鱼、虾虎鱼水面照度为 $54 \sim 324 \text{ Lux}$,明暗交替时间 $14 \text{ h} / 10 \text{ h}$ 。

3 展望

近年,随着实验鱼在科学研究中的广泛应用,我国实验鱼科研队伍及养殖规模也在逐年扩大。然而,由于无统一的实验鱼质量控制方法加以规范,各实验鱼研究人员的专业背景、研究方向各不相同,其对实验鱼质量控制的理念和认知存在一定差异,导致国内实验鱼的质量良莠不齐,不利于我国实验鱼的开发、应用。目前,斑马鱼、剑尾鱼、虾虎鱼在种质、遗传、微生物和寄生虫、饲料及环境质量控制方面已开展大量前期研究,并在实验鱼养殖过程中得到反复实践验证,建议加快推进实验鱼质控标准制定进度,为规范我国实验鱼的生产和使用提供依据;同时也为提高我国实验鱼质量、促进我国科学研究水平提供保障。

参 考 文 献(References)

- [1] 贾顺姬, 孟安明. 中国斑马鱼研究发展历程及现状[J]. 遗传, 2012, 34(9): 1082-1088.
Jia SJ, Meng AM. The development of zebrafish research in China [J]. Hereditas, 2012, 34(9): 1082-1088.
- [2] 李建军, 余露军, 蔡磊, 等. 诸氏鰕虾虎鱼实验动物化研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 493-498.
Li JJ, Yu LJ, Cai L, et al. Advances in research on *Mugilogobius chulae*, a laboratory marine fish resource [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 493-498.
- [3] 李阔宇, 潘鲁媛, 孙永华. 斑马鱼资源的开发保藏与国家斑马鱼资源中心[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 93-98.
Li KY, Pan LY, Sun YH. Development and maintenance of zebrafish resources, and the China Zebrafish Resource Center [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 93-98.
- [4] 吴淑勤, 黄志斌, 李凯彬, 等. 水生实验动物—剑尾鱼 [M]. 北京: 中国农业出版社; 2005.
Wu SQ, Huang ZB, Li KB, et al. Aquatic laboratory animal—*Xiphophorus helleri* [M]. Beijing: China Agricultural Press; 2005.
- [5] CCAC guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing [EB/OL]. [2005]. <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>.
- [6] Use of Fishes in Research Committee. Guidelines for the use of fishes in research [M]. American Fisheries Society; 2014.
- [7] Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research [J]. Lab Anim, 2006, 40(4): 323-340.
- [8] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [M]. University of Oregon Press; 1994.
- [9] Guidance on the housing and care of Zebrafish. [EB/OL]. [2011-05]. <https://www.scifilabel.se/wp-content/uploads/2013/10/Guidance-zebrafish.pdf>.
- [10] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 1 部分: 微生物学等级及监测; DB11/T 1053.1-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 1: Microbiological standards and monitoring; DB11/T 1053.1-2013 [S]. 2013.
- [11] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 2 部分: 寄生虫学等级及监测; DB11/T 1053.2-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 2: Parasitological standards and monitoring; DB11/T 1053.2-2013 [S]. 2013.
- [12] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 3 部分: 遗传质量控制; DB11/T 1053.3-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 3: Genetic quality control; DB11/T 1053.3-2013 [S]. 2013.
- [13] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 4 部分: 病理学诊断规范; DB11/T 1053.4-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 4: Specification of pathological diagnosis; DB11/T 1053.4-2013 [S]. 2013.
- [14] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 5 部分: 配合饲料技术要求; DB11/T 1053.5-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 5: Technical quality standard for formula feeds; DB11/T 1053.5-2013 [S]. 2013.
- [15] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 6 部分: 环境条件; DB11/T 1053.6-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 6: Environment and housing facilities; DB11/T 1053.6-2013 [S]. 2013.
- [16] 湖南省质量技术监督局. 实验鱼类 实验红鲤 C1HD 系遗传质量控制; DB43/T 1191-2016 [S]. 2016.
Hunan Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision.

- Laboratory fish Genetic quality control of laboratory red crucian carp C1HD strain; DB43/T 1191-2016[S]. 2016.
- [17] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321.
- [18] Lambert DM, Baker L, Huynen O, et al. Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? [J]. J Hered, 2005, 96(3): 279-284.
- [19] Avise JC. Phylogeography-the history and formation of species [M]. Cambridge: Harvard University Press; 2000.
- [20] Yoon S, Mitra S, Wyse CA, et al. First demonstration of antigen induced cytokine expression by CD4 - 1^+ lymphocytes in a poikilotherm: studies in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. PLoS One, 2015, 10(6): 1-26.
- [21] Pressley ME, Phelan PE, Witten PE, et al. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish [J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29(6): 501-513.
- [22] 付小哲, 方伟, 林强, 等. 约氏黄杆菌减毒活疫苗对鳊免疫效果评价 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(5): 33-38.
- Fu XZ, Fang W, Lin Q, et al. Immune response of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) to attenuated *Flavobacterium johnsoniae* vaccine [J]. South Chin Fish Sci, 2017, 13(5): 33-38.
- [23] Slany M, Jezek P, Bodnarova M, et al. Fish tank granuloma caused by *Mycobacterium marinum* in two aquarists; two case reports [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 1-4.
- [24] 杨迟. 实验用斑马鱼常见病菌的分离检测及其致病性研究 [D]. 上海: 东华大学; 2014.
- Yang C. Isolation and detection of common pathogenic bacteria and associated pathogenic research on laboratory zebrafish [D]. Shanghai: Donghua University; 2014.
- [25] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 淡水鱼细菌性败血症 [J]. 中国水产, 2011, 38(3): 54-55.
- Ceng AP, Jiang YL, Qian D, et al. Freshwater fish bacteria septicemia [J]. J Fish Chin, 2011, 38(3): 54-55.
- [26] Watral VG, Kent ML. Pathogenesis of *Mycobacterium* spp. in zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2007, 145(1): 55-60.
- [27] Kent ML, Whipps CM, Matthews JL, et al. Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004, 138(3): 383-390.
- [28] Chang CT, Whipps CM. Activity of antibiotics against mycobacterium species commonly found in laboratory zebrafish [J]. J Aquat Anim Health, 2015, 27(2): 88-95.
- [29] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 迟缓爱德华氏菌病 [J]. 中国水产, 2011, 38(7): 49-50.
- Ceng AP, Jiang YL, Qian D, et al. Edwardsiellasis [J]. J Fish Chin, 2011, 38(7): 49-50.
- [30] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3): 105-111.
- Liu C, Li LB, Wang KB, et al. Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Edwardsiella tarda* from *Danio rerio* [J]. J Huazhong Agric Univ, 2013, 32(3): 105-111.
- [31] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 小瓜虫病 [J]. 中国水产, 2011, 38(8): 37-38.
- Ceng AP, Jiang YL, Qian D, et al. Ichthyophthiriasis [J]. J Fish Chin, 2011, 38(8): 37-38.
- [32] von Gersdorff Jørgensen L. Infection and immunity against *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 57: 335-339.
- [33] Kent ML, Bishop-Stewart JK. Transmission and tissue distribution of *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton) [J]. J Fish Dis, 2003, 26(7): 423-426.
- [34] Ramsay JM, Watral VG, Schreck CB, et al. *Pseudoloma neurophilia* infections in zebrafish *Danio rerio*; effects of stress on survival, growth, and reproduction [J]. Dis Aquat Organ, 2009, 88(1): 69-84.
- [35] Kent ML, Harper C, Wolf JC. Documented and potential research impacts of subclinical diseases in zebrafish [J]. ILAR J, 2012, 53(2): 126-134.
- [36] 潘厚军, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用 [J]. 水产学报, 2000, 24(5): 467-471.
- Pan LJ, Wu SQ, Li KB, et al. Application of *Xiphophorus helleri* detection of virulence of fish pathogenic bacteria [J]. J Fish Chin, 2000, 24(5): 467-471.
- [37] Garcia F, Fujimoto RY, Martins ML, et al. Protozoan parasites of *Xiphophorus* spp. (Poeciliidae) and their relation with water characteristics [J]. Arq Bras Med Vet Zootecn, 2009, 61(1): 156-162.
- [38] 余露军, 苗宗余, 蔡磊, 等. 诸氏鲮虾虎鱼“溃烂病”病原及其致病影响因子分析 [J]. 南方水产科学, 2018, 14(5): 45-52.
- Yu LJ, Miao ZY, Cai L, et al. Pathogenicity and impact factors of pathogen causing ulcer disease on *Mugilogobius chulae* [J]. South Chin Fish Sci, 2018, 14(5): 45-52.
- [39] 余露军, 蔡磊, 陈小曲, 等. 诸氏鲮虾虎鱼致病性创伤弧菌的分离与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(9): 51-54.
- Yu LJ, Cai L, Chen XQ, et al. Isolation and identification of pathogenic *Vibrio vulnificus* from diseased *Mugilogobius chulae* [J]. Prog Vet Med, 2015, 36(9): 51-54.
- [40] 魏远征, 林忠婷, 李建军, 等. 不同饲料对诸氏鲮虾虎鱼生长和利用效果的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 29-36.
- Wei YZ, Lin ZT, Li JJ, et al. Effect of dietary nutrient level on the growth and feed utilization of *Mugilogobius chulae* [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(1): 29-36.
- [41] 魏远征, 林忠婷, 李建军. 诸氏鲮虾虎鱼幼鱼饲料纤维素适宜含量的初步研究 [J]. 广东农业科学, 2017, 44(1): 149-155+2.
- Wei YZ, Lin ZT, Li JJ. Preliminary study on suitable cellulose content in formulated diet for juvenile *Mugilogobius chulae* [J]. Guangdong Agric Sci, 2017, 44(1): 149-155+2.
- [42] 王雪, 刘可春, 王希敏, 等. 斑马鱼仔鱼的人工培育实验 [J]. 山东科学, 2010, 23(4): 27-30.
- Wang X, Liu KC, Wang XM, et al. Experiments for artificial cultivation of zebrafish larvae [J]. Shandong Sci, 2010, 23(4):

- 27-30.
- [43] 龙华. 温度对鱼类生存的影响 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(S1): 254-257.
- Long H. The effect of temperature on fish survival [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni, Nat Sci, 2005, 44(S1): 254-257.
- [44] 彭俊, 王辉, 强俊, 等. 温度和盐度对吉富品系尼罗罗非鱼受精率和孵化率的联合影响 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 847-856.
- Peng J, Wang H, Qiang J, et al. Combined effect of temperature and salinity on the fertilization and hatching rate in the GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. J Fish Sci China, 2011, 18(4): 847-856.
- [45] 覃川杰, 杨川, 陈昌福. 水温对鱼类免疫活动的影响 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2011, 39(5): 129-133.
- Tan JJ, Yang C, Chen CF. Effect of environmental temperature on immune status of fish [J]. J Henan Norm Univ (Nat Sci), 2011, 39(5): 129-133.
- [46] 吴晗, 白俊杰, 姜鹏. pH 对转红色荧光蛋白基因唐鱼孵化率和仔鱼存活的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(1): 27-30.
- Wu H, Bai JJ, Jiang P. Effects of pH on hatching rate and larval survival in transgenic white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* expressing red fluorescent protein gene [J]. J Dalian Ocean Univ, 2014, 29(1): 27-30.
- [47] 张甫英, 李辛夫. 酸性水对几种主要淡水鱼类的影响 [J]. 水生生物学报, 1997, 21(1): 40-48.
- Zhang PY, Li XF. Effect of acid water on several major freshwater fishes [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1997, 21(1): 40-48.
- [48] 王云峰, 朱鑫华. 盐度对鱼类生态生理学特征的影响 [J]. 海洋科学集刊, 2002, 10(44): 151-158.
- Wang YF, Zhu XH. A review on impact of salinity on patterns of fish ecophysiology [J]. Stud Mar Sin, 2002, 10(44): 151-158.
- [49] 康自强, 邓超准, 于慧娟, 等. 盐度对鱼类的影响 [J]. 福建水产, 2013, 35(5): 395-401.
- Kang ZQ, Zeng CZ, Yu HJ, et al. Study advances in the effect of salinity change on fish [J]. Fujian Fish, 2013, 35(5): 395-401.
- [50] 况新宇. 高溶氧对西伯利亚鲟、杂交鲟生长、氧化应激及免疫功能的影响 [D]. 大连: 大连海洋大学; 2016.
- Kiang XY. Effect of high dissolved oxygen on growth, oxidative stress, and immune capacity of *Acipenser baerii* and Hybrid Sturgeon [D]. Dalian: Dalian Ocean University; 2016.
- [51] 李波. 氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的毒性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学; 2010.
- Li B. Effects of ammonia and nitrite toxicity on Yellow Catfish *pelteobagrus fulvidraco* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University; 2010.
- [52] 叶俊. 亚硝酸盐急性胁迫对草鱼血液生理生化指标和非特异性免疫性能的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学; 2013.
- Ye J. The acute effect of nitrite on blood physiological and biochemical parameters and non-specific immunity in grass carp *Copharyngodon idellus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University; 2013.
- [53] Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A virtual tour of the guide for zebrafish users [J]. Lab Anim (NY), 2002, 30(3): 34-40.
- [54] Nedelec SL, Campbell J, Radford AN, et al. Particle motion: the missing link in underwater acoustic ecology [J]. Methods Ecol Evol, 2016, 7(7): 836-842.
- [55] Radford AN, Lebre L, Lecaillon G, et al. Repeated exposure reduces the response to impulsive noise in European seabass [J]. Global Chang Biol, 2016, 22(10): 3349-3360.
- [56] Nedelec SL, Mills SC, Lecchini D, et al. Repeated exposure to noise increases tolerance in a coral reef fish [J]. Environ Pollut, 2016, 216: 428-436.
- [57] Barney R, Maggy J. Guidance on the housing and care of zebrafish *Danio rerio* [M]. West Sussex: Research Animals Department, Science Group; 2011.
- [58] 凌睿. 物理刺激下斑马鱼运动异常行为及控制对策 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学; 2013.
- Ling R. Abnormal swimming behavior under physical stimulation in zebrafish (*Danio rerio*) and control measures [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology; 2013.
- [59] Davidson J, Bebak J, Mazik P, et al. The effects of aquaculture production noise on the growth, condition factor, feed conversion, and survival of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2009, 288(3): 337-343.
- [60] Spence R, Fatema MK, Reichard M, et al. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh [J]. J Fish Biol, 2006, 69(5): 1435-1448.
- [61] Avdesh A, Chen M, Mathew TM, et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction [J]. J Vis Exp, 2012, 10(69): 4196-4196.
- [62] Tamaru CS, Cole B, Bailey R, et al. A manual for commercial production of the swordtail, *Xiphophorus helleri* [M]. Hawaii: CTSA Publication; 2001.
- [63] 李建军, 杨笑波, 魏社林, 等. 盐度对裸项栉鰕虎鱼繁殖和生长的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 40-43.
- Li JJ, Yang XB, Wei DL, et al. Effects of salinity on multiplication and growth of *Bareneck goby* [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(3): 40-43.
- [64] 林忠婷, 李建军, 陈琳, 等. 非离子氨和亚硝酸氮对虾虎鱼仔鱼的急性毒性及安全浓度评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(9): 45-48.
- Lin ZT, Li JJ, Chen L, et al. Acute toxicity and safety assessment of non-ion ammonia and nitrite on larvae of *ctenogobius gymnauchen* [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(9): 45-48.