

# 团 体 标 准

T/ZHCA 501—2020

---

## 保健食品润肠通便功能的斑马鱼检测方法

A zebrafish based test for relieving constipation efficacy of functional food

2020-06-10 发布

2020-08-01 实施

---

浙江省保健品化妆品行业协会 发布



## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本标准由浙江省保健品化妆品行业协会(ZHCA)归口。

本标准起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、国珍健康科技(北京)有限公司、完美(广东)日用品有限公司、浙江康恩贝制药股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、北京宝德润生医药科技发展有限公司、杭州民生健康药业有限公司、宁波御坊堂生物科技有限公司、无限极(中国)有限公司、浙江寿仙谷植物药研究院有限公司、正大青春宝药业有限公司。

本标准主要起草人：张勇、周佳丽、邢岩、李晓敏、吴健、张正方、张卫华、杨善岩、贾福怀、陆智、李振宇、应旭辉。



# 保健食品润肠通便功能的斑马鱼检测方法

## 1 范围

本标准规定了一种保健食品润肠通便功能的快速检测方法。

本标准适用于保健食品产品、配方和原料润肠通便功能的快速检测和筛查。

有以下特征的受试物不适用于本标准的方法：

——受试物不能溶解、乳化或制备成均匀分散的悬浮液；

——受试物会产生自体荧光，无法消除对测试的干扰。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 5749 生活饮用水卫生标准

GB 14924.2 实验动物 配合饲料卫生标准

GB/T 21808 化学品 鱼类延长毒性 14 天试验

SN/T 0476 进出口卤虫卵检验方法

NY 5072 无公害食品 渔用配合饲料安全限量

NY 5073 无公害食品 水产品中有毒有害物质限量

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**无可观察效应浓度 no observed effect concentration; NOEC**

与对照相比，对试验生物未产生显著效应的最高受试物浓度。

[来源：GB/T 21808, 2.5]

### 3.2

**亲鱼 brood fish**

指用来繁殖测试所需鱼卵的成年斑马鱼。

## 4 方法原理

斑马鱼消化道的解剖结构、细胞结构与人类消化道相似，具有内皮、结缔组织、环状肌肉和外纵肌层。从斑马鱼受精后 5 d 开始，其消化道出现了自发、有节奏的肌肉收缩，与人体的肠蠕动非常相似。斑马鱼已经被广泛用于肠蠕动、肠炎等相关疾病和药物研究工作。

尼罗红(Nile Red)是一种荧光染料，可用于脂类及蛋白质等的染色。给斑马鱼喂食尼罗红一定时间后，斑马鱼肠道内会充满尼罗红，但肠道内的尼罗红本身不会被斑马鱼吸收进入体内。因此，在尼罗红荧光淬灭之前，斑马鱼肠道内尼罗红荧光信号的减弱基本上是因为尼罗红从体内排泄出去造成的。

用荧光体视显微镜拍摄斑马鱼肠道内的荧光并用图像处理软件计算荧光强度,荧光强度跟斑马鱼肠道内的尼罗红排泄速度呈负向线性关系,尼罗红排泄得越快,荧光信号越弱。根据斑马鱼肠道的荧光信号值来计算受试物对斑马鱼肠道内食物排泄的促进作用,从而评价受试物的润肠通便功能。

## 5 试剂和材料

5.1 尼罗红(Nile Red,CAS:7385-67-3):喂食给斑马鱼的荧光材料。用丙酮或甲醇配制成质量浓度为1 mg/mL的母液,使用时用E3培养液进行稀释。

5.2 三卡因(Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt,又称MS-222,CAS:886-86-2):用于麻醉斑马鱼。

5.3 甲基纤维素(Methyl cellulose,CAS:9004-67-5):用于固定斑马鱼。用超纯水配制成体积分数为3%的液体胶状物,将甲基纤维素缓慢加入到沸水中,边加边搅拌,甲基纤维素完全溶解后,停止加热,继续搅拌至冷却到室温;用锡箔纸密封烧杯口,放置在4℃的冰箱中保存。

5.4 斑马鱼繁殖容器:用于繁殖斑马鱼鱼卵。用聚苯乙烯或其他惰性材料制成的容器,容器中有可移动的网格板或透明板来隔开雄鱼和雌鱼,同时要有聚苯乙烯或其他惰性材料做成的隔栅或丝网来隔离成鱼和鱼卵,网格尺寸应保证产下的鱼卵可以顺利漏过。

5.5 斑马鱼孵育容器:用于斑马鱼鱼卵和幼鱼的孵育。用聚苯乙烯或其他惰性材料制成的容器,如6孔细胞培养板、培养皿、培养罐等。

5.6 液体量取器材及其他易耗品:移液枪、容量瓶、烧杯、铝箔、巴氏吸管等。

5.7 其他常规试剂:盐酸、氢氧化钠、氯化钙、硫酸镁、碳酸氢钠、氯化钾和亚甲基蓝等,试剂纯度不低于化学纯等级。

## 6 仪器和设备

6.1 斑马鱼养殖设备:设备需配有温控装置,养殖容器用玻璃或聚碳酸酯等惰性材料制成,用于饲养成年斑马鱼。

6.2 斑马鱼鱼卵和幼鱼培养设备:带有温控和进风装置,推荐使用生化培养箱。

6.3 电子天平:分度值为0.1 mg。

6.4 水质检测设备:盐度计(电导率测定仪)、硬度计、pH计、溶解氧测定仪。

6.5 普通体视显微镜:用于在明场下观察斑马鱼个体发育和行为是否正常。

6.6 荧光体视显微镜:用于检测斑马鱼肠道内的荧光,需配有红色荧光通道来进行荧光观察,同时配有相机进行图像拍摄。

## 7 试验准备

### 7.1 受试鱼类

#### 7.1.1 鱼种的选择

推荐使用野生型AB品系斑马鱼(*Danio rerio*),亲鱼应具有较好的繁殖能力——鱼龄以(6~12)月为佳。使用其他品系的斑马鱼时,要根据实际情况对试验条件做相应调整,并在报告中说明鱼种选择理由和试验方法。

#### 7.1.2 亲鱼的驯养

在繁殖前,亲鱼应在符合下列条件的环境中驯养14 d以上:

- a) 水:见 7.2 a)成鱼养殖用水。
- b) 水温:(26~28.5)℃。
- c) 光照:推荐光照/黑暗周期为 14 h/10 h,每天光照应不少于 12 h。
- d) 溶解氧:6 mg/L~饱和。
- e) 喂养:每天至少喂食两次,可以搭配喂食活饵饲料(卤虫幼虫)和热带鱼配合饲料,每天至少喂食一次活饵饲料。用于孵化卤虫幼虫的卤虫卵应按 SN/T 0476 的规定进行检验,有毒有害物质的含量应符合 NY 5073 的规定执行。配合饲料的卫生安全指标应符合 GB 14924.2 和 NY 5072 的规定。
- f) 斑马鱼疾病处理:对于患病的斑马鱼不做任何疾病处理,发现患病个体应立即隔离并人道地处死。
- g) 驯养期间,亲鱼的整体死亡率不超过 10%时,该批鱼可以使用;超过 10%,应舍弃整批鱼并人道地处死。

### 7.1.3 斑马鱼幼鱼的孵育

- a) 第一天,斑马鱼饲养房间灯光关闭前 5 h 左右,将亲鱼放在斑马鱼繁殖容器内做繁殖前适应性饲养,期间雌雄亲鱼以网格板或透明板隔开,雌雄比例为 2:1,密度不超过 3 尾鱼/L,不喂食。
- b) 第二天,斑马鱼饲养房间的灯光开启后 10 min 内,移除繁殖容器中隔开雄鱼和雌鱼的网格板或透明板,让斑马鱼开始繁殖。繁殖开始后 1 h 左右将亲鱼从斑马鱼繁殖容器中拿走,收集鱼卵。将存活的鱼卵用成鱼养殖用水清洗干净后,放入斑马鱼孵育容器中进行孵育。鱼卵应在斑马鱼孵育容器底部稀疏地分布,不能紧密聚集,液面高度以不超过容器的 2/3 为宜。将斑马鱼孵育容器放在温度可控的环境中进行孵育,容器的水温控制在(26~28.5)℃。
- c) 鱼卵收集后 6 h 应再次检查,清理死亡的鱼卵。此后,每天检查并清理一次死亡的鱼卵,同时每次更换至少 2/3 的水体。斑马鱼开始孵化后,换水时要将卵膜清理干净。
- d) 在孵育过程中,如果要移动鱼卵/幼鱼,推荐使用巴斯德吸量管。在换水或移动鱼卵/幼鱼的过程中,尽量避免其直接暴露在空气中。

早期发育阶段的正常斑马鱼鱼卵和死亡鱼卵的典型图片见附录 A 的图 A.1 和图 A.2。

## 7.2 试验用水

- a) 成鱼养殖用水。将饮用水净化处理后(反渗透水、去离子水或双蒸水均可),每升水加入 400 mg 左右的人工海盐和 10 mg 左右的  $\text{NaHCO}_3$  即可作为成鱼养殖用水,人工海盐和  $\text{NaHCO}_3$  的用量可根据水质情况适当进行调整。水体的电导率维持在(450~550)  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 维持在 6.8~7.5,总硬度(以  $\text{CaCO}_3$  计)维持在(50~100) mg/L。饮用水水质应符合 GB 5749 的规定。
- b) 鱼卵和幼鱼孵育使用 E3 培养液(60×E3 培养液配制方法为,将  $\text{NaCl}$ :344 mg, $\text{KCl}$ :15.2 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :58 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :98 mg,定容至 20 mL)。
- c) E3 培养液也可用作试验用水,用于配制受试物贮备液和配制试验溶液。

## 7.3 试验溶液

- a) 试验溶液尽量用试验用水配制,受试物难以用水溶解时方可考虑使用低毒的助溶剂或分散剂。推荐的溶剂有二甲基亚砜、乙醇、甲醇、二甲基甲酰胺、三甘醇。适合的分散剂有聚氧乙烯脂肪酸甘油酯、吐温 80、0.01%的纤维素甲醚、聚氧乙烯氢化蓖麻油。当使用某种助溶剂时,所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致,且质量浓度或体积分数不大于 1%。同时,应加设溶剂对照组试验,溶剂对照组不能对斑马鱼的存活有明显影响或引起其他任何可观察的不利影响,

也不能对试验结果有显著性影响。

- b) 试验中不需要调节试验溶液的 pH。如果加入受试物后试验溶液的 pH 有明显变化,按照 GB/T 21808 中 6.3.2 的相关规定对受试物贮备液的 pH 进行调节。
- c) 如果试验溶液富含营养物质,容易腐败变质,且无法通过换液来遏制水体变质,可考虑加入一定量的亚甲基蓝来抑菌滋生,以减缓水质恶化。如果使用亚甲基蓝,溶液中的终质量浓度应不大于 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,且所有试验组的终质量浓度应保持一致。
- d) 小分子单体化合物的检测质量浓度上限为 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,混合物或相对分子质量 $<3$  kD 的大分子化合物的检测质量浓度上限为 2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对于很难溶解或均匀分散的物质、相对分子质量 $\geq 3$  kD 的大分子化合物,均不适合采用水溶暴露方式,应考虑采用其他方式进行处理。

## 8 试验程序

### 8.1 准备

#### 8.1.1 斑马鱼幼鱼的选取

试验开始时,选取体型正常、鱼鳔完全充气、能够正常悬浮游动、体长接近的受精后 5 d 的斑马鱼,放入惰性材料制成的容器中,斑马鱼最大负荷不超过 10 尾/ $\text{mL}$ 。

#### 8.1.2 暴露条件

- a) 持续时间:向装有受精后 5 d 斑马鱼的容器中加入尼罗红(终质量浓度为 10  $\text{ng}/\text{mL}$ ),过夜暴露(16~18)h,使斑马鱼肠道完全充满尼罗红。尼罗红暴露结束后加入受试物,持续暴露 24 h。暴露期间不投饵。
- b) 更换试验溶液:通常暴露时间在 24 h 及以内不需要更换溶液。如果受试物富含营养物质,试验溶液容易腐败变质,可考虑换液,换液频率可根据水质情况调整。
- c) 光照:暴露期间避光处理,避免光照对受试物稳定性的影响。
- d) 水温:(26~28.5) $^{\circ}\text{C}$ 。
- e) 溶解氧:6  $\text{mg}/\text{L}$ ~饱和。
- f) pH:6.8~7.5。

#### 8.1.3 预试验

- a) 预试验用于确定受试物的 NOEC,为后续正式试验的浓度设置提供参考。以几何级数浓度系列设置 5 个初始受试物浓度,浓度的间隔系数不大于 3.2。
- b) 将受试物储备液用 E3 培养液稀释成一组浓度适宜的工作液系列,向 6 孔培养板的每个孔中加入适量的特定浓度受试物工作液。另外设置一个 E3 培养液对照组。如果必须使用助溶剂,所有组别中的助溶剂浓度应保持相同,同时还应设置一个相应的溶剂对照组。每个孔 3  $\text{mL}$  溶液,每个孔均放入 30 尾受精后 6 d 的斑马鱼。

如果一次试验需要使用多个 6 孔培养板时,每个板上至少需要设置一个 E3 培养液对照组或一个溶剂对照组。

- c) 在暴露开始后 1 h、8 h 和 24 h 进行观察,及时清除死亡的斑马鱼,并对斑马鱼的死亡和其他毒性效应进行记录,确定受试物的 NOEC。在最后一次观察时,向水溶液中加入麻醉剂,将斑马鱼麻醉后在普通体视显微镜的明场下观察(推荐使用三卡因作为麻醉剂,三卡因的质量浓度不超过 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),观察时斑马鱼应头朝左、腹部朝下、完全侧躺,所有斑马鱼的体位应该保持一致。



死亡判断标准:静止不动、无心脏跳动、躯干呈白色不透明颜色、对机械刺激无反应。

异常表型:心包水肿、静脉瘀血、血流缺失/减少、出血、脑变性/萎缩/水肿、下颌畸形、眼畸形/水肿、肝脏变性/肿大/萎缩、卵黄囊吸收延迟、肠道发育异常、躯干弯曲/缩短/水肿、肌肉变性、鳔未充气。异常表型的典型图见附录 A 的图 A.3~图 A.6。

异常行为学指标:身体侧翻、游动不协调、游动剧烈和反常的静止。

## 8.2 正式试验

### 8.2.1 试验分组

- a) 模型对照组:喂食尼罗红后用 E3 培养液养殖的斑马鱼。
- b) 阳性对照组:喂食尼罗红后用阳性对照样品处理的斑马鱼,每次试验设置一个阳性对照组即可。
- c) 受试物处理组:喂食尼罗红后用受试物处理的斑马鱼,受试物根据需要设置多个不同的浓度组。
- d) 溶剂对照组:喂食尼罗红后用助溶剂处理的斑马鱼;如果受试物配制过程中使用了助溶剂,则应设置该组。

### 8.2.2 受试物浓度设置

根据预试验的结果,确定正式试验的浓度范围,试验最高浓度组不得高于 NOEC 值或该类受试物的检测质量浓度上限[见 7.3 d)]。以几何级数浓度系列设置至少 3 个不同的浓度组,浓度的间隔系数 $\leq 3.2$ 。浓度组别设置少于 3 个时需说明理由。

### 8.2.3 造模

根据试验需求,预先筛选好足够数量的受精后 5 d 斑马鱼,根据斑马鱼数量选择一个大小合适的容器,将一次试验的所有斑马鱼转入同一个容器中进行尼罗红暴露,以减少个体差异。加入斑马鱼和尼罗红后,将容器用铝箔纸包裹,在生化培养箱中避光孵育过夜(16~18)h。液面高度不超过 2 cm。

### 8.2.4 受试物处理

尼罗红暴露结束后,将斑马鱼用 E3 培养液洗脱后转入 6 孔细胞培养板中,每个孔 30 尾斑马鱼。向 E3 培养液中加入受试物,使各试验组受试物的终浓度与预先设定的浓度一致。同时设置阳性对照组和模型对照组,并在必要时设置溶剂对照组。所有组别的溶液总体积都是 3 mL。充分混匀后,将 6 孔细胞培养板用铝箔纸包裹,在生化培养箱中避光孵育 24 h 至试验终点(时间从加入受试物开始算起)。如果组别较多,不同试验组别的受试物处理时间应该有一定的间隔,以减少因为拍照时间过久造成不同组别的受试物处理时间差异较大。

### 8.2.5 观察和拍照

到受试物处理终点,先在荧光显微镜的可见光通道下进行观察,剔除表型和行为异常的斑马鱼[见 8.1.3 c)]。从表型和行为正常的斑马鱼中随机选取至少 12 尾斑马鱼,用三卡因麻醉后,将斑马鱼用甲基纤维素固定(甲基纤维素要提前在室温放置至少 30 min)在荧光显微镜的红色荧光通道下观察并拍照,拍照时斑马鱼应头朝左、腹部朝下、完全侧躺,所有斑马鱼的体位应该保持一致。

### 8.2.6 图像分析

拍照完成后,使用图像分析软件对获取到斑马鱼荧光图片进行分析,将软件的分析参数设置为明亮

度总和,以此来计算斑马鱼肠道内残留的尼罗红荧光信号值,每组的有效数据不少于 10 个。

### 8.2.7 注意事项

每次试验前需要检测一次受试物溶液的溶解氧和 pH,试验过程及终点不需要再次检测。在转移斑马鱼的时候,要注意避免损伤到斑马鱼。

## 9 结果评价

### 9.1 数据处理

#### 9.1.1 统计学分析

将图像分析计算得到荧光信号值记为  $S$ (统计学处理结果用  $\text{mean} \pm \text{SE}$  表示)。一般采用方差分析,但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验。方差齐,计算  $F$  值。 $F$  值  $< F_{0.05}$ ,结论:各组均数间差异无显著性; $F$  值  $\geq F_{0.05}$ ,  $P \leq 0.05$ ,用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计。对非正态或方差不齐的数据应进行适当的变量转换,待满足正态或方差齐要求后,用转换后的数据进行统计;若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的,改用秩和检验进行统计。

#### 9.1.2 润肠通便功能的定量计算

根据各组斑马鱼肠道内尼罗红荧光信号值的平均值  $\bar{S}$ ,计算受试物的润肠通便作用(以食物排泄促进率表示),公式如下:

$$\text{食物排泄促进率} = \frac{\bar{S}_{(\text{模型对照组})} - \bar{S}_{(\text{受试物处理组})}}{\bar{S}_{(\text{模型对照组})}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

如果受试物配制过程中使用了助溶剂,则公式(1)中的模型对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

### 9.2 结果判定及说明

9.2.1 当一个受试物的试验结果满足下列要求时,可以判定该受试物有润肠通便的功能:

受试物处理组至少有一组的荧光信号值与模型对照组相比有统计学上的显著性差异,即  $P < 0.05$ 。

9.2.2 食物排泄促进率的定量计算结果不作为判定受试物是否有润肠通便功能的依据,仅用于比较不同受试物之间润肠通便功能的强弱。

## 10 保证试验有效性的条件

10.1 预试验中,E3 培养液对照组(如果使用了助溶剂,也包括溶剂对照组),斑马鱼的死亡率或异常率不得超过 10%,超过 10%则该次试验视为失败。

10.2 正式试验中,阳性对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异,且平均值之差必须大于 2 倍的模型对照组内标准偏差(SD);否则,该次试验视为失败。

10.3 正式试验中,如果使用了助溶剂,溶剂对照组与模型对照组之间不能存在统计学上的显著性差异,如果溶剂对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异,则该次试验视为失败。

## 11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容:

- a) 检验依据；
- b) 样品和阳性对照的信息,包括与试验操作相关的理化性状；
- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息；
- d) 试验条件和方法,包括试验具体步骤；
- e) 试验的日期；
- f) 数据处理与结果评价方法；
- g) 结论。

附录 A  
(资料性附录)  
斑马鱼典型图

图 A.1 为在 28.5 °C 环境下的正常斑马鱼早期发育图,其中:a)为单细胞期(受精后 0.2 h 左右);b)为二细胞期(受精后 0.75 h 左右);c)为胚盾期(从侧面观察,受精后 6 h 左右);d)为原基-6 期(受精后 25 h 左右)。

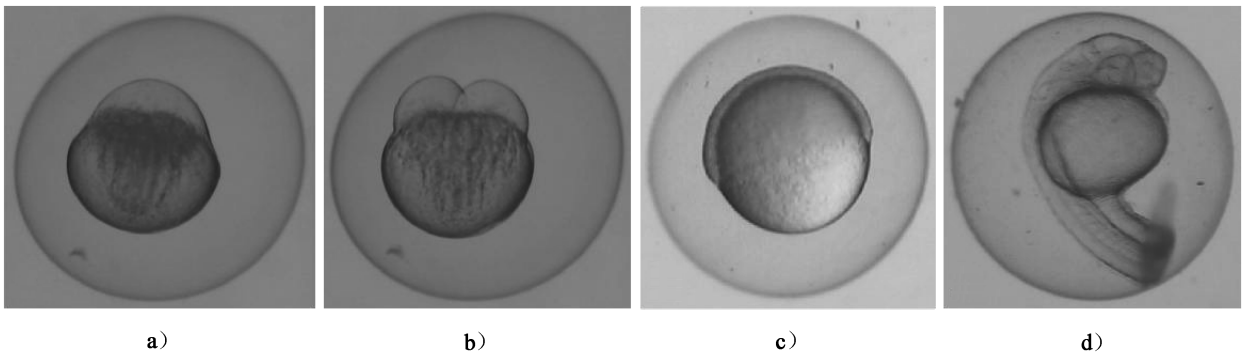


图 A.1 在 28.5 °C 环境下的正常斑马鱼早期发育图

图 A.2 为斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图,其中:a)为卵凝结;b)中 \* 表示为心包水肿,箭头所指为体节;c)中 \* 表示为眼芽缺失,箭头所指为尾部未分离。图 A.2 来自 OECD 236。

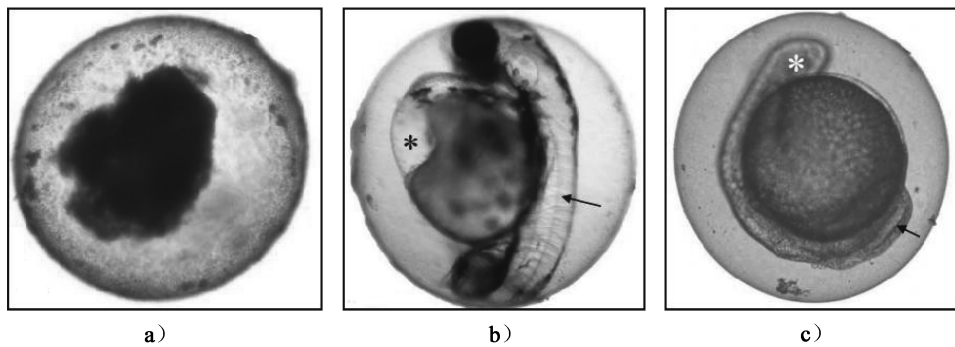


图 A.2 斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图

图 A.3 为斑马鱼整体图,其中:a)为正常斑马鱼;b)为出现躯干缩短和弯曲的斑马鱼。

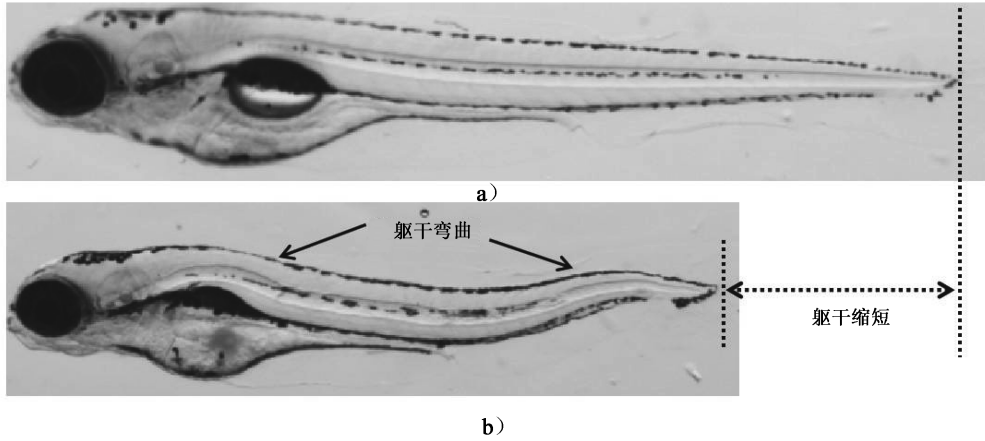


图 A.3 斑马鱼整体图

图 A.4 为斑马鱼主要组织器官异常示意图,其中:a)为正常斑马鱼;b)为表型异常的斑马鱼。图 A.4 a)中虚线 1 所包含区域为下颌,虚线 2 所包含区域为心脏,虚线 3 所包含区域为肝脏,虚线 4 所包含区域为卵黄囊,虚线 5 所包含区域为肠道,虚线 6 所包含区域为鱼鳔。

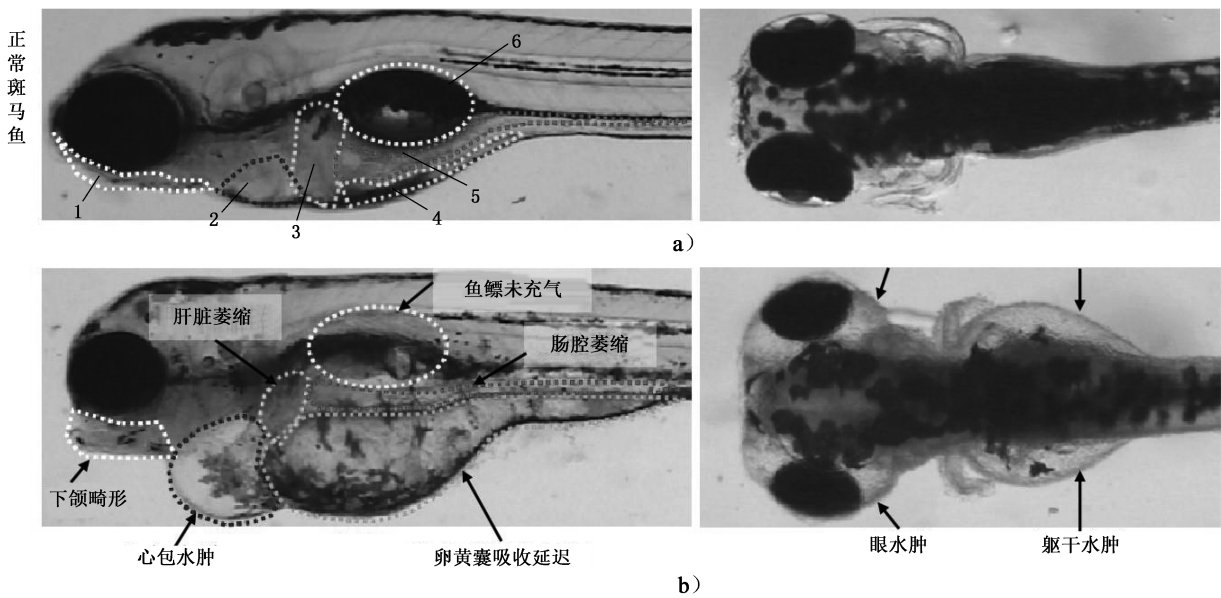


图 A.4 斑马鱼主要组织器官异常示意图

图 A.5 为斑马鱼肝脏局部图,其中:a)为正常斑马鱼,虚线 1 所包含区域为肝脏,虚线 2 所包含区域为卵黄囊;b)为出现肝脏发黑(变性)和卵黄囊吸收延迟的斑马鱼。

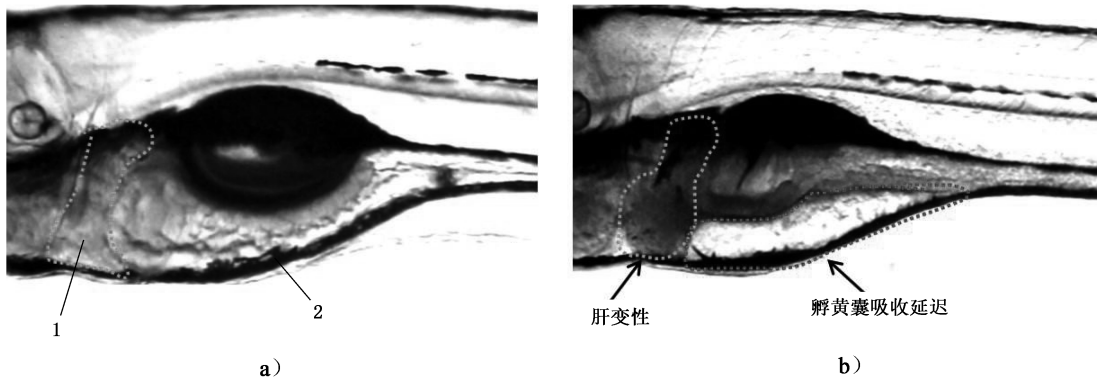


图 A.5 斑马鱼肝脏局部图

图 A.6 为斑马鱼肌肉变性典型图,其中:a)为正常斑马鱼,b)为出现肌肉变性(肌肉纹理不清晰、表面不平整、颜色偏暗)的斑马鱼。

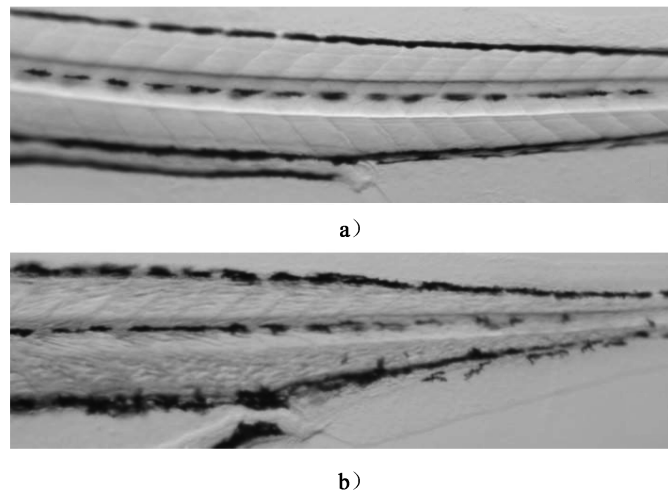


图 A.6 斑马鱼肌肉变性典型图

## 参 考 文 献

- [1] Field, H A, K A Kelley, et al. Analysis of gastrointestinal physiology using a novel intestinal transit assay in zebrafish[J]. *Neurogastroenterol Moti*, 2009, 121(3): 304-12.
- [2] Monte Westerfield. *The Zebrafish Book, a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*[M]. Edition 5. Eugene; University of Oregon Press, 2007.
- [3] Wang Z, J Du, et al. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 392.
- [4] Zhou J, S Y Guo, et al. Human prokinetic drugs promote gastrointestinal motility in zebrafish[J]. *Neurogastroenterol Moti*, 2014, 26(4): 589-95.
- [5] GB/T 21807—2008 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验[S].
- [6] Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. *Guidance on the housing and care of Zebrafish Danio rerio*[R]. West Sussex; Research animals department, science group, 2010.
- [7] Brand M, Granato M. Keeping and raising zebrafish. In *Zebrafish: A Practical Approach (Chapter 4)*, S. Schulte-Merker and C. Nüsslein-Volhard, eds[M]. New York; IRL Press, 1999.
- [8] OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test—Guidelines for the Testing of Chemicals [S].
-