



中华人民共和国国家标准

GB/T 23389—2009

水产饲料安全性评价 繁殖试验规程

Principle of aquafeed safety evaluation—Reproduction test

2009-03-26 发布

2009-07-01 实施

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会 发布

前 言

本标准是在参阅了 GB 15193.15—2003《繁殖试验》及国内外相关文献的基础上,根据我国技术发展水平研究制定的。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:中国农业科学院饲料研究所、国家水产饲料安全评价基地。

本标准主要起草人:刘海燕、薛敏、吴秀峰、郑银桦。

水产饲料安全性评价 繁殖试验规程

1 范围

本标准规定了水产饲料安全性评价繁殖试验规程的基本技术要求。

本标准推荐采用斑马鱼(*Brachydanio rerio*),并不排除其他鱼种[如青鳉(*Oryzias latipes*)和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)],但应对试验条件做相应的改变。

本标准适用于水产动物使用的配合饲料、单一饲料及饲料添加剂的安全性评价,不包括饲料药物添加剂。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法

GB 11607 渔业水质标准

GB 13078 饲料卫生标准

NY 5072 无公害食品 渔用配合饲料安全限量

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

平均产卵量 average fecundity

雌性亲鱼产卵的平均数量,单位为(万)粒/尾,计算公式如下:

平均产卵量=每组产卵数/每组雌性亲鱼尾数

3.2

受精率 fertilization rate

胚胎发育至高囊胚期时,发育正常的受精卵数占参与受精的总卵数的百分比,计算公式如下:

受精率=(每组受精卵数/每组产卵数)×100%

3.3

卵径 egg diameter

受精卵动物极到植物极的直径,单位为毫米(mm)。

3.4

卵重 egg weight

受精卵平均重量,单位为毫克(mg)。

3.5

孵化率 hatching rate

鱼类胚胎发育阶段中,从卵内破膜而出的个体数与受精卵数量的百分比,计算公式如下:

孵化率=(每组孵出仔鱼数/每组受精卵数)×100%

3.6

初孵仔鱼 yolk-sac larvae

仔鱼出膜后,已经完成了仔鱼发育,背鳍褶上已经具备了标志种的分类特征的鳍条原基,未摄食,依赖卵黄囊的营养进行早期发育,称为初孵仔鱼。

3.7

开口期仔鱼 first feeding larvae

开口期开始至开口期结束的仔鱼阶段。

3.8

畸形率 malformation rate

初孵仔鱼或开口期仔鱼在发育阶段出现畸形的个体数与孵化数量的百分比,计算公式如下:

畸形率=(每组仔鱼畸形个数/每组孵化数) $\times$ 100%

3.9

初孵仔鱼存活率 survival of yolk-sac larvae

仔鱼在开口期前初孵仔鱼存活个体数与孵出仔鱼数量的百分比,计算公式如下:

初孵仔鱼存活率=(每组初孵仔鱼存活数/每组孵出仔鱼数) $\times$ 100%

3.10

开口期仔鱼存活率 survival of first feeding larvae

开口期结束时,开口期仔鱼存活个体数与开口期开始时仔鱼数量的百分比,计算公式如下:

开口期仔鱼存活率=(开口期仔鱼期结束时的存活数/开口期开始时的仔鱼数) $\times$ 100%

3.11

性成熟系数 gonadosomatic index, GSI

性成熟系数表示亲鱼的性成熟程度,以亲鱼性腺占其体重的百分数表示,计算公式如下:

性成熟系数=(性腺重/体重) $\times$ 100%

4 原理

通过对 3.1~3.11 繁殖指标的影响的评价,揭示受试物对水产动物繁殖性能的影响,为受试物在水产动物饲料中应用安全性提供判定依据。

5 试验动物

试验动物推荐斑马鱼并不排除其他鱼种(如青鳉和剑尾鱼),但应对试验条件做相应的改变。实验动物应采用种质纯正、来源明确、健康、规格整齐的同批苗种。正式试验前应有不低于 2 周的驯养期,并且保证试验动物的健康活泼。

6 剂量与分组

6.1 剂量设计参考的原则

6.1.1 原则上高剂量组的动物在饲喂受试物期间应当出现明显中毒反应,低剂量组不出现中毒反应。在此二剂量间再设 2 个及 2 个以上剂量组,以期获得比较明确的剂量-反应关系。对能或不能求出经口或注射 LD₅₀ 的受试物分别进行规定。

6.1.2 能求出经口或注射 LD₅₀ 的受试物:以经口服或注射 LD₅₀ 的 10%~25% 作为繁殖试验的最高剂量组,此 LD₅₀ 百分比的选择主要参考 LD₅₀ 剂量反应曲线的斜率。然后在此剂量下设几个剂量组,最低剂量组至少是试验水产动物可能摄入量的 3 倍。

6.1.3 对于不能求出经口或注射 LD₅₀ 的受试物:繁殖试验应尽可能涵盖试验水产动物可能摄入量 100 倍的剂量组。对于试验水产动物摄入量较大的受试物,高剂量可以按在饲料中的最大掺入量进行

设计。

6.2 分组

至少应设 4 个剂量组和一个对照组。受试物如果为商品配合饲料,直接饲喂,不设剂量组。需要另外设计对照组。每组不少于 6 个重复,每个重复至少 30 个个体。

7 操作步骤

7.1 受试物的处理

将受试物粉碎至所要求的粒度(对于斑马鱼应全部通过筛孔 0.048 mm 分样筛),粒度的测定方法符合 GB/T 5917.1。根据受试物试验剂量的设计,把受试物添加到试验动物的配合饲料中,液体受试物按照试验剂量直接添加到其他原料的混合物中。充分混合,适当加工,制成营养组成、适口性、水稳定性、粒径等特性都符合试验目的和试验动物要求的试验饲料,减少受试物以外的因素对试验动物的影响。受试配合饲料直接饲喂。对某一种受试物进行评价时,要考虑到饲料配方中是否存在其他拮抗或协同作用的成分。在确定配方前分析相关原料常规营养成分,并分析其卫生指标,结果应符合 GB 13078 和 NY 5072 标准。

7.2 受试物的给予

7.2.1 途径

用含有受试物的试验饲料或者受试饲料喂养斑马鱼(应注意受试物在饲料中的稳定性)。当受试物添加到饲料中时,需将受试物剂量按每 100 g 斑马鱼的摄入量折算为饲料的量(mg/kg)。

7.2.2 试验动物空腹处理

试验斑马鱼应在试验开始及结束前空腹 24 h。

7.2.3 试验周期

F₀ 代斑马鱼 14 日龄时开始用对照组饲料进行开口驯养,30 日龄时开始分别投喂试验饲料正式开始试验。在 F₁ 代完成开口后 2 周结束试验,期间继续饲喂对照组饲料。

7.3 试验条件

7.3.1 试验系统

对于水溶性受试物的安全性评价应采用流水养殖系统,对于非水溶性受试物的安全评价采用流水养殖系统或循环水养殖系统均可接受。养殖容器材料应无毒无害,废水排放符合国家有关环保规定。

7.3.2 养殖条件

试验期间要保持养殖系统水温、流速、光照及养殖密度等条件处于斑马鱼最适生长要求范围。

7.3.3 水质条件

养殖过程中的水质应参照我国渔业水质标准 GB 11607 的要求。

7.3.4 试验管理

试验开始与结束时称重。斑马鱼要定时定量投喂,详细记录投喂量及残饵量,测定饲料的溶失率以准确计算斑马鱼的摄食量。

F₀ 代斑马鱼 14 日龄时开始用对照组饲料进行开口驯养,30 日龄时开始分别投喂试验饲料正式开始试验。快到繁殖期时,将 F₀ 代斑马鱼按雌雄比为 1:2 的配比放入产卵箱,在距箱底高度为 5 cm 的位置用 30 目网片拦住以防斑马鱼吞噬鱼卵,每天定时记录产卵情况,测量卵径与卵重,产卵统计时间为 20 天。

受精卵孵化在 24 孔板中进行,每孔 1 粒,置于光照培养箱中,温度为(26±1)℃,光照时间为日:夜=14 h:10 h。在 F₁ 代完成开口后 2 周结束试验,期间继续饲喂对照组饲料。

7.4 观察指标

必测指标:开始产卵时间、平均产卵量、受精率、卵径、卵重、孵化率、畸形率、初孵仔鱼存活率、开口期仔鱼存活率、试验结束时 F₁ 代存活率及终末体重、性成熟系数、性腺组织切片观察和胚胎发育情况。

8 数据处理与报告

试验设计时应应选择适当的统计学方法,所有观察到的结果都应进行统计学分析和评价。完整、准确地描述对照组与各剂量组斑马鱼间各项指标的差异,以揭示受试物对繁殖性能的影响。

受试物如对斑马鱼繁殖性能造成负面影响,可判定为不安全;如对斑马鱼繁殖性能未造成负面影响,必要时可进行靶动物的繁殖试验。
