|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 点击此处添加ICS号 |
| CCS  |

|  |
| --- |
| D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png SCSF |

B  |

团体标准

T/SCSF XXXX—XXXX

水产养殖调水用品安全性评价技术规范 第2部分：生物类

Technical specification for safety assessment of aquacultural water conditioning supplies

Part 2：Biological agents

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中国水产学会  发布

**前言**

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是T/SCSF\*\*\*《水产养殖用调水用品生物安全性评价技术规范》的第2部分。T/SCSF\*\*\*已经发布了以下部分：

——第1部分：化学类

——第2部分：生物类

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。

本文件由中国水产学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

水产养殖调水用品安全性评价技术规范 第2部分：生物类

* 1. 范围

本文件规定了水产养殖调水用品（生物类）安全性评价的要求、评价内容与方法、评价程序、评价结果、报告和资料存档。

本文件适用于水产养殖调水用品（生物类）的安全性评价。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 22213 水产养殖术语

GB/T 26426 饲料中副溶血性弧菌的检测

HJ/T 415 环保用微生物菌剂环境安全评价导则

SC/T 7028 水产养殖动物细菌耐药性调查规范 通则

SN/T 4739 致病性嗜水气单胞菌检疫技术规范

NY/T 3152.4-2017 微生物农药环境风险评价试验准则 第4部分：鱼类毒性试验

NY/T 3152.6-2017 微生物农药环境风险评价试验准则 第4部分：第6部分：藻类生长影响试验

* 1. 术语和定义

 GB/T 22213界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

水产养殖调水用品（生物类） water conditioning supplies for aquaculture (biological)

调节养殖水体水质、底质理化指标，改善养殖动物生长环境的，以生物为主要功能成分的一种物质或几种物质的混合物及其制剂。

3.2

水产养殖调水用品（生物类）安全评价safety assessment of water conditioning supplies for aquaculture (biological)

通过基本生物学背景（包括来源、组成、分类、生物安全级别分类等）、致病性、耐药性及生态安全性（生态毒性、卫生学等）等综合评价水产养殖调水用品（生物类）的安全性。

* 1. 基本要求

列入《肥料登记资料要求》、《饲料原料目录》、《饲料添加剂目录》及后续增补和修订的公告的生物物质及其制剂，免于进行本文件规定的安全性评价；未列入上述目录的水产养殖调水用品（生物类）需进行本文件规定的安全性评价。

4.1评价目的

开展安全性评价，分析和评价水产养殖调水用品（生物类）及其使用过程中，对水产养殖动物、人畜健康及生态安全的有害影响和潜在风险。

4.2评价重点

4.2.1 水产养殖调水用品（生物类）所含各菌种（株）的生物学特征。

4.2.2 致病性。

4.2.3 菌种对抗菌药物的耐药性。

4.2.4 水产养殖调水用品（生物类）及其使用过程中代谢产物的潜在危害。

4.2.5 其他生物类产品根据其生物特性开展其他项目的安全性评价。

5 评价内容

5.1 基本生物学背景评价

水产养殖调水用品（生物类）的菌种（株）来源、组成及生物学特征等；确认各生物、菌种（株）的鉴定和检测技术。

5.1.1　水产养殖调水用品（生物类）组成

明确构成的各类成份组成。

5.1.2　菌剂各菌种（株）的来源及分类

详细描述构成水产养殖调水用品（生物类）各种菌种（株）的来源及其分类特征。

5.1.3　菌剂各菌种（株）的危害分类

根据《病原微生物实验室生物安全管理条例》和《动物病原微生物分类名录》，确定构成菌种（株）的微生物危害分类等级。参照资料性附录A。

5.2 致病性评价

通过溶血性检测，评价生物体、菌种（株）的致病性。水产养殖调水用品（生物类）不得具有致病性。溶血性检验方法见资料性附录B。

5.3 耐药性评价

通过对常用抗菌药物的耐药性试验，掌握各组成菌种（株）对抗菌药物的耐药性，评价其对人畜健康及生态环境安全可能产生的有害影响及潜在风险。耐药性评价参照资料性附录C。

5.4 生态安全评价

对水产养殖调水用品（生物类）及各类终产物进行生态安全评价，包括生态毒性评价和卫生学评价。

5.4.1生态毒性评价

根据水产养殖调水用品（生物类）的使用环境以及终产物的最终排放形式，可选择藻类生长影响试验、水产养殖动物毒性试验等进行生态毒性测试，完成生物体及其终产物的生态毒性评价。生态毒性参照资料性附录D。

5.4.2卫生学评价

水产养殖调水用品（生物类）主要卫生指标包括气单胞菌、弧菌等病原菌均不得检出。检测方法参照资料性附录E、附录F。

6评价报告

6.1 在安全性评价实施过程中，数据记录应真实、准确、完整、规范、清晰，并妥善保管。

6.2 数据的有效位数以所用仪器的精度为准，采用国家法定计量单位和国家推荐使用的单位。

6.3 根据不同的试验设计采用相应的统计分析方法进行数据分析。

6.4 每个安全性评价试验必须单独形成最终报告。每个试验最终报告中应包含试验概述和报告正文。

试验报告正文至少应包括：

a）试验名称；

b）摘要；

c）试验目的；

d）受试物；

e）试验时间和地点；

f）试验材料和方法；

g）结果与讨论；

h）结论；

i）原始数据及相关的图表和照片；未纳入统计分析的数据或由于数据缺乏、数据丢失而无法评价的情况应具体说明；

j）参考文献；

k）试验机构和操作人员，包括试验机构的名称，试验操作人员、试验负责人和报告签发人的签名，报告签发时间，加盖签发机构的单位公章或专门的分析测试章；委托检测的数据应提供检测机构出具的检测报告。

6.5 应对试验报告每页进行编码，格式为“第 页，共 页”，并加盖骑缝章，确保报告的完整性。

6.6 资料存档

最终报告、原始记录、图表和照片、试验方案、受试物样品及其检测报告等原始资料应存档备查，保存时间一般不得少于5年。

附录A

（资料性附录）

动物病原微生物分类名录

|  |  |
| --- | --- |
| 类别 | 动物病原微生物 |
| 一类 | 口蹄疫病毒、高致病性禽流感病毒、猪水泡病病毒、非洲猪瘟病毒、非洲马瘟病毒、牛瘟病毒、小反刍兽疫病毒、牛传染性胸膜肺炎丝状支原体、牛海绵状脑病病原、痒病病原。 |
| 二类 | 猪瘟病毒、鸡新城疫病毒、狂犬病病毒、绵羊痘/山羊痘病毒、蓝舌病病毒、兔病毒性出血症病毒、炭疽芽孢杆菌、布氏杆菌。 |
| 三类 | 多种动物共患病病原微生物：低致病性流感病毒、伪狂犬病病毒、破伤风梭菌、气肿疽梭菌、结核分支杆菌、副结核分支杆菌、致病性大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、致病性链球菌、李氏杆菌、产气荚膜梭菌、嗜水气单胞菌、肉毒梭状芽孢杆菌、腐败梭菌和其他致病性梭菌、鹦鹉热衣原体、放线菌、钩端螺旋体。牛病病原微生物：牛恶性卡他热病毒、牛白血病病毒、牛流行热病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛病毒腹泻/粘膜病病毒、牛生殖器弯曲杆菌、日本血吸虫。绵羊和山羊病病原微生物：山羊关节炎/脑脊髓炎病毒、梅迪/维斯纳病病毒、传染性脓疱皮炎病毒。猪病病原微生物：日本脑炎病毒、猪繁殖与呼吸综合症病毒、猪细小病毒、猪圆环病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪丹毒杆菌、猪支气管败血波氏杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、猪肺炎支原体、猪密螺旋体。马病病原微生物：马传染性贫血病毒、马动脉炎病毒、马病毒性流产病毒、马鼻炎病毒、鼻疽假单胞菌、类鼻疽假单胞菌、假皮疽组织胞浆菌、溃疡性淋巴管炎假结核棒状杆菌。禽病病原微生物：鸭瘟病毒、鸭病毒性肝炎病毒、小鹅瘟病毒、鸡传染性法氏囊病病毒、鸡马立克氏病病毒、禽白血病/肉瘤病毒、禽网状内皮组织增殖病病毒、鸡传染性贫血病毒、鸡传染性喉气管炎病毒、鸡传染性支气管炎病毒、鸡减蛋综合征病毒、禽痘病毒、鸡病毒性关节炎病毒、禽传染性脑脊髓炎病毒、副鸡嗜血杆菌、鸡毒支原体、鸡球虫。兔病病原微生物：兔粘液瘤病病毒、野兔热土拉杆菌、兔支气管败血波氏杆菌、兔球虫。水生动物病病原微生物：流行性造血器官坏死病毒、传染性造血器官坏死病毒、马苏大麻哈鱼病毒、病毒性出血性败血症病毒、锦鲤疱疹病毒、斑点叉尾鮰病毒、病毒性脑病和视网膜病毒、传染性胰脏坏死病毒、真鲷虹彩病毒、白鲟虹彩病毒、中肠腺坏死杆状病毒、传染性皮下和造血器官坏死病毒、核多角体杆状病毒、虾产卵死亡综合症病毒、鳖鳃腺炎病毒、Taura综合症病毒、对虾白斑综合症病毒、黄头病病毒、草鱼出血病毒、鲤春病毒血症病毒、鲍球形病毒、鲑鱼传染性贫血病毒。蜜蜂病病原微生物：美洲幼虫腐臭病幼虫杆菌、欧洲幼虫腐臭病蜂房蜜蜂球菌、白垩病蜂球囊菌、蜜蜂微孢子虫、跗腺螨、雅氏大蜂螨。其他动物病病原微生物：犬瘟热病毒、犬细小病毒、犬腺病毒、犬冠状病毒、犬副流感病毒、猫泛白细胞减少综合症病毒、水貂阿留申病病毒、水貂病毒性肠炎病毒。 |
| 四类 | 是指危险性小、低致病力、实验室感染机会少的兽用生物制品、疫苗生产用的各种弱毒病原微生物以及不属于第一、二、三类的各种低毒力的病原微生物。 |

附录B

（资料性附录）

溶血性检验方法

1. 培养基的制备

采取健康的水产养殖动物新鲜血液，用20 mmol/L Tris盐溶缓冲液（TBS：pH = 7.5）洗涤3次（2000 g 4 ℃离心3 min），最后用TBS配制成10%细胞悬液。营养琼脂培养基熔化后，冷却到55 ℃，无菌地加入已灭菌的3 mL 10%水产养殖动物细胞悬液。用手旋转或翻转试管使其混合，倒入培养皿中。

1. 菌种培养

微生物可以倾倒平板接种，也可以划线接种。适宜温度过夜培养。

1. 结果观察

若菌落周围有清晰的环带出现，则表明有溶血现象，即微生物在卵磷脂平板上形成1个外圈透明内圈混浊的同心圆。最终确定溶血素的检出率。

附录C

（资料性附录）

细菌耐药性检测方法

1. 细菌分离鉴定

根据不同细菌分别选择适宜的培养基、培养条件和鉴定方法.对样品进行细菌分离培养，采用生理生化反应和分子生物学等方法对分离菌株进行菌种鉴定。

1. 药物敏感性试验

采用微量肉汤稀释法对分离菌株进行药物敏感性测定。具体方法参照SC/T 7028-2022。

1. 结果判定

根据不同抗菌药物对受试菌的最小杀菌浓度（MIC）值结果，将菌株判定为敏感、中介或耐药。

附录D

（资料性附录）

一、藻类生长影响试验

1. 试验概述

在一定试验条件下，以一定的供试物浓度或剂量测试对受试藻类生长的影响。当供试物最大危害暴露量处理组中较对照组藻类生长影响达到50％及以上时，则还需进行供试物对藻类剂量效应试验，以测定EC50值。

1. 试验方法

2.1 试验生物

受试藻可来自绿藻门、裸藻门、轮藻门和蓝藻门等，推荐普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）。

2.2 供试物

通常情况下，试验中供试物应采用同一批次的产品。但在不得不使用另一批次产品时，应在试验报告中记录供试物的批次。

2.3 计数方法

以个体数目为计数单位，可采用血球计数板法等测定。

2.4 培养基

普通小球藻宜用SE或BG11培养基。

2.5 试验条件

藻类适宜的试验环境温度21 ℃~24 ℃（单次试验温度控制在± 2 ℃），连续均匀光照，光照强度差异应保持在± 15%范围内，光强4440 lx～8880 lx。试验条件在满足藻类生长条件下，应充分考虑供试物的生长和活性要求。

2.6 试验操作

试验设置处理组，空白对照组和灭活对照组等，每组设置3个平行，各处理组和对照组应避免交叉污染。

2.7 结果观察

试验期间每日对藻类生长情况进行观察和记录，在显微镜下用血球计数板准确计数藻类细胞数，同一样品至少计数2次。对数据进行数理统计，比较处理组与对照组藻类生长差异。试验观察时间持续96 h。

二、水产养殖动物毒性试验

1. 试验概述

在一定试验条件下，以一定的供试物浓度或剂量测试对受试草鱼、河蟹或南美白对虾的毒性和致病性等影响。当供试物最大危害暴露量出现对受试生物50％及以上的个体死亡或致病时，则还需进行剂量效应试验和致死（病）验证试验。致死毒性以LD50/ LC50表征；致病性以ID50/ IC50表征。

2. 试验方法

2.1 试验生物

推荐草鱼、河蟹或南美白对虾等。受试动物要求健康无病，未性成熟的当年生个体，并采用满足其生理要求的驯养和试验条件。并根据以下原则选择受试鱼：

——尽可能与目标水产养殖动物分类地位相近；

——生物学资料丰富的鱼种；

——选择幼年期的试验物种，避开产卵期。

受试动物应在测试环境条件下驯养7 d～14 d，每日光照12 h～16 h，每天定时喂食1次～2次，及时清除粪便及食物残渣。试验前24 h停止喂食。

2.2 供试物

通常情况下，试验中供试物应采用同一批次的产品。但在不得不使用另一批次产品时，应在试验报告中记录供试物的批次。

2.3 试验条件

试验用水为去氯处理24 h自来水（必要时经活性炭处理）或注明配方的人工稀释水，水质硬度在10 mg/L～250 mg/L（以CaCO3计），pH在6.0～8.5，试验期间溶解氧不低于空气饱和值的60%。试验条件在满足试验动物生长条件下，应充分考虑供试物的生长和活性要求。

2.4 试验操作

试验设置处理组，空白对照组和灭活对照组等，每组设置4个平行，每个平行10尾。各处理组和对照组应避免交叉污染。

2.5 结果观察

试验期间每日对受试动物的饲料食用状况、异常行为、死亡等进行观察和记录。当鱼没有任何肉眼可见的活动，如鲍呼吸、碰触尾鳍无反应，即可判断该动物已死亡。试验观察时间应持续30 d。当在试验观察时间末期，处理组受试动物开始出现死亡或明显病征，则需延长试验观察时间，直至受试动物恢复正常或确定死亡。

附录E

（资料性附录）

弧菌检测方法（副溶血弧菌）

1. 检样制备和初始悬液

以无菌操作称取试样25 g（mL），加人225 mL 37 ℃预热的增菌培养基（ASPW），均质1 min～2 min，制成1：10的初始悬液。

1. 第一次选择性增菌

对于深度冷冻的样品将初始悬液于37 ℃培养6 h ± 1 h，对千新鲜的或干燥的样品将初始悬液（9.1）千41.5 ℃培养6 h ± 1 h。

1. 第二次选择性增菌

用无菌移液管吸取1 mL培养液注人含10 mL ASPW的试管内，于41.5 ℃培养18 h ± 1 h.

1. 分离

培养的两次增菌液，分别用接种环各划线接种在两种培养基上，一块TCBS琼脂平板和一块科玛嘉弧菌显色培养基（或TSAT）琼脂平板。翻转上述平皿置37℃培养箱中培养．24 h ± 3 h后，检查平板上的可疑菌落。

典型的副溶血性弧菌在TCBS琼脂平板上表面光滑，菌落绿色（庶糖阴性），直径2 mm～3 mm。

典型的副溶血性弧菌在科玛嘉弧菌显色培养基上表面光滑，菌落粉紫色，直径2 mm～3 mm。

典型的副溶血性弧菌在TSAT琼脂平板上表面光滑，菌落暗红色，直径2 mm～3 mm。

1. 确证试验

5.1 挑选每个平板上的至少5个可疑菌落，如果平板上的可疑菌落数少于5个，挑选平板上所有可疑菌落。将挑选的菌落划线接种在含盐营养琼脂平板表面，翻转上述平皿置37 ℃培养箱中培养24 h ± 3 h比获得单菌落，用纯培养物进行确证试验。

5.2 氧化酶反应

用玻璃棒挑取在含盐营养琼脂平板上纯培养的单菌落，在浸有氧化酶试剂的滤纸上划线。也可按照说明使用商业上的测试片。如果在10 s内变为紫红色、紫罗兰色或深紫色为阳性。

附录F

（资料性附录）

气单胞菌检测方法（嗜水气单胞菌）

1. 菌种分离培养

先将菌株接种于普通肉汤28 ℃培养24 h，再划线接种千普通琼脂平板，使之形成单个菌落。

1. 菌落选取

嗜水气单胞菌在普通琼脂平板上，28 ℃ ± 1 ℃培养24 h的菌落为光滑、微凸、圆整、无色或淡黄色，有特殊芳香气味。

1. 氧化酶试验

用铅金耳挑取普通琼脂平板上单个菌落少许，涂布于浸有1％盐酸四甲基对苯胺的滤纸片上，10 s内观察细菌涂处的颜色，若细菌涂布处出现红色，判为阳性，嗜水气单胞菌应为阳性。

**参 考 文 献**

国务院令424号—2004 病原微生物实验室生物安全管理条例

农业部令53号—2005 动物病原微生物分类名录

农业部161号公告—2001 肥料登记资料要求

农业部1773号公告—2012 饲料原料目录

农业部2038号公告—2017 饲料原料目录

农业部2133号公告—2014 饲料原料目录

农业部2249号公告—2015 饲料原料目录

农业部2634号公告—2017 饲料原料目录

农业农村部22号公告—2018 饲料原料目录

农业农村部356号公告—2020 饲料原料目录

农业部2045号公告—2013 饲料添加剂目录

农业部2134号公告—2014 饲料添加剂目录

农业农村部21号公告—2018 饲料添加剂目录

农业农村部53号公告—2018 饲料添加剂目录

农业农村部356号公告—2020 饲料添加剂目录

农业农村部1231号公告—2009 饲料添加剂目录

