

T/NNAS

团 体 标 准

T/NNAS XXXX—XXXX

鮰鱼诺卡氏菌病噬菌体-益生菌共发酵制剂

Bacteriophage-probiotic co-fermentation preparation for *Seriola*
nocardiosis

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

南宁市标准化协会 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。

本文件由广西壮族自治区水产科学研究院提出并宣贯。

本文件由南宁市标准化协会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区水产科学研究院、广东海洋大学、北部湾大学、广西安桂水产养殖有限公司。

本文件主要起草人：黄婷、夏立群、鲁义善、甘桢、汪志文、陈建林、蔡小辉、胥鹏、陆专灵、罗永巨、欧阳贤华、彭银辉、陈丽婷、陈福艳、严欣、何智昌、韦信贤。

鳊鱼诺卡氏菌病噬菌体-益生菌共发酵制剂

1 范围

本文件界定了用于防治鳊鱼诺卡氏菌病 (*Nocardia seriolae*) 的特异性噬菌体与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 共发酵制剂的术语和定义, 规定了技术要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输、贮存等内容。

本文件适用于以特异性裂解鳊鱼诺卡氏菌的噬菌体为主体, 经与解淀粉芽孢杆菌共发酵、后处理制得的噬菌体-益生菌联合制剂的工业化生产、质量评价及在水产养殖中的应用。

2 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 191 包装储运图形符号标志
- GB/T 6435 饲料中水分的测定
- GB/T 13080 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定
- GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鳊鱼诺卡氏菌病 *Seriola nocardiosis*

由致病性鳊鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*) 感染引起的鱼类慢性肉芽肿性疾病, 常见于加州鲈、杂交鳢、鳊鱼、黄尾鳊等海水淡水养殖品种, 表现为体表溃疡、内脏结节、生长迟缓甚至死亡。

3.2

特异性噬菌体 *specific bacteriophage*

指经筛选、纯化后, 能够高效、特异性地识别并裂解鳊鱼诺卡氏菌目标菌株的噬菌体, 不裂解其他非目标细菌。本文件所指特异性噬菌体应具备明确的宿主谱、裂解动力学参数及遗传稳定性。

3.3

解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*

一种革兰氏阳性、可形成芽孢的益生菌, 具有产酶、产抗菌肽及定植肠道的能力, 用于协同噬菌体抑制环境中的有害菌并促进鱼类健康。

3.4

共发酵 *co-fermentation*

将特异性噬菌体与活化后的解淀粉芽孢杆菌按一定比例接种至同一无菌发酵培养基中, 在同一生物反应器内同步进行发酵的过程。该过程旨在实现噬菌体大量扩增与益生菌芽孢形成的时空耦合, 并利用益生菌代谢产物稳定噬菌体活性。

3.5

噬菌体效价 *bacteriophage titer*

单位体积 (mL) 的制剂中所含有的具有感染活性的噬菌体颗粒数量, 以噬菌斑形成单位 (PFU, Plaque Forming Units) 表示。

3.6

益生菌活菌数 *viable probiotic count*

单位体积 (mL) 或单位质量 (g) 的制剂中所含的解淀粉芽孢杆菌活菌数量, 以菌落形成单位 (CFU, Colony Forming Units) 表示。

3.7

共发酵终产物 co-fermentation product

指完成共发酵工艺后, 经离心、浓缩、冷冻干燥或直接液体灌装等后处理得到的最终产品形态 (可为冻干粉或液体浓缩液), 其中包含活性噬菌体颗粒、解淀粉芽孢杆菌芽孢/营养体、及益生菌代谢产物。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 噬菌体种源

应来源于健康水产环境或病鱼样本, 经分离纯化后鉴定为肌尾噬菌体科或短尾噬菌体科等适合水产应用的类型。应经全基因组测序, 确认不携带溶源性相关基因、抗生素抗性基因及毒力因子基因。对至少3株独立的鲫鱼诺卡氏菌流行株的裂解率 $\geq 90\%$ 。

4.1.2 益生菌种源

解淀粉芽孢杆菌菌株应来源于国家认可的菌种保藏中心, 或经安全性评价确认无致病性、无产毒能力。菌株应具有良好的产酶 (蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶) 及产抗菌肽能力, 且对养殖水体中常见条件致病菌 (如弧菌) 具有拮抗作用。

4.1.3 培养基

共发酵用培养基应经配方优化, 同时支持噬菌体吸附、增殖及益生菌芽孢形成。培养基成分应公开、可控, 不应使用含有动物源蛋白或违禁添加物的原料。

4.2 生产过程要求

4.2.1 共发酵工艺参数

共发酵工艺参数应符合下列要求:

- 发酵温度: $28\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ (根据菌株特性调节);
- 初始 pH: $7.0\sim 7.5$, 发酵过程中通过自动补料控制 pH 在 $6.8\sim 7.8$;
- 溶氧 (DO): 第一阶段 (益生菌活化期) 溶氧 $\geq 30\%$, 后期 (芽孢诱导期) 可降至 $0\%\sim 10\%$;
- 接种比例: 噬菌体与益生菌的初始接种量比例 (PFU:CFU) 应经验证, 推荐范围为 $1:1$ 至 $10:1$;
- 发酵周期: $48\text{ h}\sim 72\text{ h}$, 以噬菌体效价达到峰值且益生菌芽孢率 $\geq 80\%$ 为终点。

4.2.2 后处理工艺

4.2.2.1 液体产品

发酵液经微滤除菌 (保留噬菌体与芽孢)、浓缩后灌装。

4.2.2.2 冻干粉产品

加入保护剂 (如海藻糖、脱脂奶粉、谷氨酸钠), 通过真空冷冻干燥制得。终产品应保持均匀一致, 无肉眼可见杂质。

4.3 质量要求

4.3.1 外观指标

液体产品为浅黄色或乳白色悬浮液, 无沉淀结块; 粉剂为浅黄色或白色粉末, 松散无结块。

4.3.2 理化指标

理化指标应符合表1规定。

表1 理化指标

项目	要求
水分（粉剂）	≤5%
pH值（液体）	6.0~8.0
重金属（以Pb计）	≤10 mg/kg

4.3.3 生物指标

生物指标应符合表2规定。

表2 生物指标

项目	要求
噬菌体效价	≥1×10 ⁹ PFU/mL（液体）或≥1×10 ¹⁰ PFU/g（粉剂）
解淀粉芽孢杆菌活菌数	≥1×10 ⁸ CFU/mL（液体）或≥1×10 ⁹ CFU/g（粉剂）
芽孢率	≥80%
沙门氏菌	不得检出
大肠菌群	≤10 MPN/g

4.4 安全要求

安全要求应符合下列规定：

- 噬菌体必须经动物安全性试验（斑马鱼或其它易感鱼类模型）确认无急性毒性及组织损伤；
- 共发酵产物不得含有外源性抗生素残留；
- 产品应通过鱼类攻毒保护试验验证：在鲈鱼诺卡氏菌攻毒模型中，使用推荐剂量处理组的相对保护率（RPS）≥60%。

4.5 稳定性要求

液体产品在4℃避光保存条件下，效价在6个月内下降不超过1个对数单位。冻干粉产品在室温（25℃）避光保存条件下，效价在12个月内下降不超过1个对数单位。

5 检验方法

5.1 外观检查

取适量样品置于洁净白瓷皿中，在自然光下目视观察。

5.2 理化检验

5.2.1 水分

按GB/T 6435规定执行。

5.2.2 pH测定

取液体样品，用pH计直接测定；粉剂样品按1:10（质量体积比）用无菌蒸馏水复溶后测定。

5.2.3 重金属（以Pb计）

按GB/T 13080规定执行。

5.3 生物检验

5.3.1 噬菌体效价测定

采用双层琼脂平板法。以鳊鱼诺卡氏菌指示菌（推荐使用标准株或流行株）为宿主菌，将样品梯度稀释后与宿主菌混合，倾倒入LA培养基（1.5%琼脂底层+0.7%琼脂顶层），37℃培养18 h~24 h后计数噬菌斑。每个稀释度做3个平行，取平均值。

5.3.2 解淀粉芽孢杆菌活菌计数

采用平板涂布法，使用LB培养基，37℃培养24 h后计数。若需区分芽孢与营养体，可将样品经80℃水浴处理10 min后涂布，所得计数即为芽孢数。

5.3.3 芽孢率测定

取发酵终产物涂片，经孔雀石绿芽孢染色法显微观察，统计视野中芽孢数占总菌数的比例。

5.3.4 沙门氏菌

按GB/T 13091规定执行。

5.3.5 大肠菌群

按GB/T 18869规定执行。

5.4 相对保护率（RPS）测定

选用健康加州鲈或模式鱼类（如斑马鱼、罗非鱼），随机分为3组：攻毒对照组、治疗组、空白对照组。治疗组按产品推荐用法（如拌料或水体泼洒）连续给药3 d~5 d，然后腹腔注射致病性鳊鱼诺卡氏菌菌悬液（剂量≥LD₉₀），连续观察14天记录死亡情况。相对保护率RPS（%）按公式（1）计算。

$$RPS = 1 - \frac{a}{b} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：
RPS——相对保护率（%）；
a——治疗组死亡率（%）；
b——攻毒对照组死亡率（%）。

6 检验规则

6.1 组批

同一批原料、同一工艺、同一班次生产的同一规格产品为一批。

6.2 出厂检验

每批产品出厂前应进行外观、pH、噬菌体效价、益生菌活菌数、芽孢率、大肠菌群检验，合格方可出厂。

6.3 型式检验

型式检验项目包括第4章全部技术指标。有下列情况之一时应进行型式检验：
——新产品投产鉴定时；
——原料、工艺发生重大变动时；
——停产6个月以上恢复生产时；
——国家质量监督机构提出要求时。

6.4 判定规则

检验结果全部符合本文件要求时，判定该批产品合格。若有一项指标不合格，允许双倍样品复检一次，若复检仍不合格，则判定该批产品不合格。

7 标志、包装、运输、贮存

7.1 标志

标志应符合GB/T 191的规定。包装上应标明产品名称、标准编号、净含量、噬菌体效价、益生菌活菌数、生产日期、保质期、贮存条件、生产单位名称及地址、使用方法及注意事项。应标注“水产专用，非食用”。

7.2 包装

液体产品应使用食品级塑料桶或聚乙烯袋密封包装。粉剂产品应采用铝箔袋真空包装或加干燥剂。包装应密封、防潮、避光。

7.3 运输

运输过程中应避免高温、日晒、雨淋，严禁与有毒有害物质混运。液体产品需防冻。

7.4 贮存

液体产品应在4℃~8℃冷藏保存。粉剂产品应在阴凉干燥处(≤25℃)保存。开封后应尽快用完。

7.5 保质期

液体产品保质期6个月，粉剂产品保质期12个月（从生产日期算起）。

参 考 文 献

- [1] GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
 - [2] GB 4789.35 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验
 - [3] GB/T 26428 饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测
-