



团 体 标 准

T/JSYX XX—2025

水产养殖水体噬菌体环境改良剂

Phage-based Environmental conditioner in Water for Aquaculture

(征求意见稿)

2025-XX-XX 发布

2025-XX-XX 实施

江苏省渔业协会 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。

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专利的责任。

本文件由江苏省渔业协会归口。

本文件起草单位：菲吉乐科（南京）生物科技有限公司、南京农业大学、中国药科大学、安徽菲吉乐科生物技术有限公司、河海大学、扬州大学、山东省药学院。

本文件主要起草人：贾红颖、陈迪、肖道、丁良、汤芳、黄金虎、马家乐、赵哲、董小敬、李涛、郑志勇、林琳、张岱州、陈凯。

水产养殖水体噬菌体环境改良剂

1 范围

本标准规定了水产养殖水体噬菌体环境改良剂的噬菌体选择、组成和特性、标签和说明书、包装、运输和贮存、保质期等技术要求和效率测定方法。

本文件适用于水产养殖水体噬菌体环境改良剂的质量控制和效力检测。

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 包装储运图示标志

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

GB/T 9724 化学试剂pH值测定通则

GB/T 36911-2018 运输包装指南

GB 38598-2020 消毒产品标签说明书通用要求

GB/T 38502-2020 消毒剂实验室杀菌效果检验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

噬菌体 bacteriophage, phage

噬菌体是一类能够感染并于细菌细胞内复制的病毒，具有严格的宿主特异性。噬菌体由单链或双链DNA或RNA组成的基因组和外层包裹的蛋白质衣壳组成。

3.2

裂解性噬菌体 lytic phage

侵入宿主菌后，能在宿主菌内复制使宿主菌迅速裂解、并释放子代噬菌体颗粒的噬菌体。

3.3

噬菌体环境改良剂 bacteriophage preparations for environmental conditioner

由单一噬菌体或裂解谱相异的多种裂解性噬菌体组成，可特异性杀灭相应病原菌，用于水产养殖水体中杀灭病原菌的制剂。

3.4

噬菌斑 plaque

裂解性噬菌体侵染宿主菌，导致宿主菌破裂、溶解死亡，在长满菌苔的双层琼脂培养基中形成肉眼可见的透明空斑。

3.5

噬菌斑形成单位 plaque forming unit, PFU

在长满菌苔的双层琼脂培养基中，细菌被噬菌体杀死后形成透明空斑，一个空斑即为一个噬菌斑形成单位（PFU）。

3.6

噬菌体效价 phage titer

指1 mL待测样品液中含有裂解性噬菌体的颗粒数，采用噬菌斑形成单位来表示（PFU/mL）

3.7

裂解谱 bacterial lysis spectrum

根据噬菌体对不同菌株的裂解效率确定噬菌体能够裂解的菌株范围。

4 噬菌体选择

4.1 应为裂解性噬菌体。

4.2 能特异性裂解相应的靶标细菌。

4.3 遗传背景明确、经过测序确定不携带已知的抗生素耐药基因、病原菌毒力基因、溶原相关基因等。

5 组成和特性

5.1 组成

可以是单一噬菌体，也可以选择裂解谱不同的多种裂解性噬菌体组合。

5.2 剂型

制剂剂型为液体或固体。

5.3 理化标准

5.3.1 液体噬菌体环境改良剂的理化指标

表 A.1 液体噬菌体环境改良剂的理化指标

项目	指标
性状	制剂颜色为无色或淡黄色，色泽一致，可有少量絮状沉淀；有培养基自然气味，无发霉、变质现象，无酸败等气味。
效价，PFU/mL	单一噬菌体 $\geq 10^8$ （检测方法见本文件 10.1）
pH 值	6.0~8.5

5.3.2 固体噬菌体环境改良剂的理化指标

表 A.2 固体噬菌体环境改良剂的理化指标

项目	指标
性状	制剂颜色为无色或淡黄色的粉末或细小颗粒状，色泽一致，无发霉、结块现象，有培养基自然气味，无酸败等气味。
效价，PFU/g	单一噬菌体 $\geq 10^8$ （检测方法见本文件 10.1）
pH 值	6.0~8.5

5.3.3 制剂的杀菌效率，为杀灭对数值大于或等于 3，检测方法见本文件 10.2。

5.3.4 制剂相应细菌的裂解谱不低于85%，检测方法见本文件 10.3。

5.3.5 细菌不得检出，按照GB 4789.2规定检测微生物菌落总数。

6 标签和说明书

标签应含有产品名称、主要有效成分及其含量、使用范围、生产日期及有效期、生产企业名称、地址和联系方式、贮存条件等。说明书还应包括使用方法、注意事项等。

7 包装

7.1 包装应密封、防潮、防水、不易破损。包装材料应无毒、无害。包装应符合 GB/T 191 的规定。

7.2 液体制剂采用塑料瓶或玻璃瓶，规格为：100 mL/瓶、250 mL/瓶、500 mL/瓶等，或按用户指定要求进行包装。

7.3 固体制剂采用聚丙烯袋或铝塑复合袋，规格为：100 g/袋、250 g/袋、500 g/袋、1000 g/袋等，或按用户指定要求进行包装。

8 运输和储存

8.1 运输

噬菌体制剂运输应符合 GB/T 36911-2018 运输包装指南要求。运输工具应清洁、干燥，并有防雨、防污染措施。不得与有毒、有害物品混装、混运。

8.2 储存

噬菌体制剂应保存于干燥、避光处，不得与有毒、有害物品混合贮存。液体制剂和固体制剂均阴凉、避光保存。

9 保质期

制剂保质期应根据产品特性确定，不同噬菌体制剂的保质期可有所不同。在符合运输、贮存条件的情况下，制剂保质期至少为12个月。

10 效力测定方法

10.1 噬菌体效价

10.1.1 检测方法

取1 mL待测噬菌体制剂实际使用浓度的液体样本，加入9 mL已灭菌的SM（见附录A.1）缓冲液，然后按照10倍梯度稀释法稀释，将样本依次稀释到 10^{-6} 。取100 μ L各稀释度样品，加入到含100 μ L新鲜培养的宿主菌液中，混匀后于30 $^{\circ}$ C孵育5 min，将上述200 μ L混合液加入含8~10 mL上层半固体培养基（见附录A.2）的试管中，混匀，倾倒在含底层固体培养基（见附录A.2）的平皿，室温静置至上层半固体培养基凝固。于宿主菌最佳培养条件下倒置培养，待平皿上可见清晰的噬菌斑即可计数。每个稀释度设3个平行试验。

噬菌体制剂固体样本应先采用无菌生理盐水溶解成制剂实际使用体积，然后与液体制剂相同的方法进行测定。

10.1.2 噬菌斑计数

噬菌斑计数按照 GB 4789.2 中菌落计数原则，选择50~300 PFU/平板的最适稀释度平板进行噬菌斑计数，获得3个平行试验的噬菌斑平均数。

10.1.3 计算方法

噬菌体效价（PFU/mL）为噬菌斑平均数乘以稀释倍数再乘以10。

10.1.4 结果判断

噬菌体效价（PFU/mL）为噬菌斑平均数乘以稀释倍数再乘以10。

10.2 噬菌体制剂杀菌效率

10.2.1 检测方法

按照GB/T 38502-2020消毒剂实验室杀菌效果检验方法，采用噬菌体敏感的对应宿主菌为指示菌。取1 mL待测定的实际使用浓度的液体噬菌体制剂样本，加入新鲜培养的1mL浓度为 10^8 CFU/mL的指示菌液中，轻轻混匀，室温静置孵育30 min，用无菌生理盐水将上述混合液作连续10倍倍比递减的4-6个稀释度，每个稀释度分别取100 μ L加到宿主菌适宜的固体培养基平板上，涂布均匀，根据宿主菌确定最适培养时间和培养温度。每个稀释度设3个平行。同时，设生理盐水替代噬菌体制剂处理为对照组，按上述相同的方法与指示菌混合处理、稀释、培养。

噬菌体制剂固体样本应先采用无菌生理盐水溶解成制剂实际使用体积，然后与液体制剂相同的方法进行测定。

10.2.2 计数

按照GB 4789.2菌落计数原则，选择50~300 CFU/平板的最适稀释度平板进行菌落计数。根据相应的稀释倍数，获得3个平行试验的平均菌落数，并换算为对数值（N）。菌落计数的平皿的稀释度实验组与对照组相对应。按式（1）计算噬菌体制剂的杀灭对数值（KL）。

10.2.3 计算公式：

$$KL = N_0 - N_x \dots\dots\dots (1)$$

式中：

KL——杀灭对数值；

N_0 ——对照组平均菌落数对数值；

N_x ——试验组平均菌落数对数值。

10.2.4 结果判定

每次试验需重复3次，噬菌体制剂杀灭细菌的对数值报告结果取 3 次的平均值。噬菌体制剂对指示菌的杀灭对数值大于或等于3表明该制剂杀菌效率合格。

10.3 噬菌体裂解谱

10.3.1 制备菌液

吸取50-100 μ L已鉴定的噬菌体对应的菌株菌液加入至1 mL TSA 培养基的EP管中，放于摇床 30 $^{\circ}$ C，180-200 rpm培养，菌液变浑浊即可。用接种环挑取少量菌液先划线TSA平板，置于30 $^{\circ}$ C培养箱过夜培养，次日挑单个菌落于TSA培养基中30 $^{\circ}$ C活化至菌液浑浊。

细菌来源为不同区域分离株，菌株分离地间隔5 km以上，菌株数量原则上不少于30株。

10.3.2 平板制备

试管中加入300-500 μL 在 10.3.1 制备好的菌液，并加入5-8 mL已融化并冷却至40-45 $^{\circ}\text{C}$ 的半固体培养基，迅速混匀后倾注到底层TSA琼脂平板上（避免产生气泡），等待上层琼脂凝固。

10.3.3 点滴与培养

用无菌枪头吸取10 μL 待验证的噬菌体溶液（粉剂噬菌体称取1 g，溶解到9 mL SM缓冲液或生理盐水中，使用0.22 μm 滤膜过滤后备用），点滴至平板标记的相应位置，净化台中静置15-20 min，待点滴噬菌体风干后，将上述操作的平板倒置放进30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜培养。

10.3.4 结果观察

培养结束后，观察是否有透亮噬菌斑，若有透明噬菌斑说明待测菌能被该噬菌体裂解，并通过噬菌斑的透亮程度判断其裂解能力；若没有噬菌斑则说明该待测菌不能被该噬菌体裂解。

10.3.5 噬菌体裂解谱统计

10.3.5.1 裂解判定标准

根据噬菌斑的透明程度分为：

噬菌斑清晰透亮：+++

噬菌斑较明显（微模糊）：++

噬菌斑微透明（模糊）：+

无噬菌斑：—

10.3.5.2 统计“被检测的菌株总数”和“能被该噬菌体成功裂解的菌株数（裂解包括+++、++、+三类总和）”。

10.3.5.3 计算裂解谱

裂解谱=（能被该噬菌体成功裂解的菌株数 \div 被检测的菌株总数） \times 100%。

噬菌体制剂对对应细菌的裂解谱大于85%，表明噬菌体直接裂解谱合格。

附录A
(规范性附录)
缓冲液和培养基的制备

A.1 SM 缓冲液的配置

氯化钠5.8 g, 硫酸镁2 g, 1 mol/L Tris-HCl 50 mL, 明胶0.25 g, ddH₂O 1000 mL。

分别取上述成分, 混合, 溶解。pH值调节至7.2~7.4。121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

A.2 双层琼脂培养基的制备

A.2.1 下层TSA培养基琼脂配方如下:

胰蛋白胨 1.5% (g/100 mL)

大豆蛋白胨 0.5% (g/100 mL)

氯化钠 0.5% (g/100 mL)

琼脂1.5% (g/100 mL)

pH值 7.2~7.4

将以上各成分混合煮沸, 充分溶解后, 121 °C高压灭菌20 min, 冷却到40 °C左右, 倾注90 mm灭菌平皿, 铺满平皿底层即可, 琼脂凝固后2~8 °C保存备用。

A.2.2 上层TSA半固体培养基配方如下:

胰蛋白胨 1.5% (g/100 mL)

大豆蛋白胨 0.5% (g/100 mL)

氯化钠 0.5% (g/100 mL)

琼脂0.75% (g/100 mL)

pH值 7.2~7.4。

将以上各成分混合煮沸, 充分溶解后, 121 °C高压灭菌20 min, 冷却到40 °C左右, 分装到灭菌的小试管, 约8~10 mL/管, 2~8 °C保存备用, 使用前需加热融化已凝固的上层半固体培养基。

A.3 TSB培养基的制备

胰蛋白胨 1.5% (g/100 mL)

大豆蛋白胨 0.5% (g/100 mL)

氯化钠 0.5% (g/100 mL)

pH值 7.2~7.4。

121 °C高压蒸汽灭菌20 min

将以上各成分混合煮沸, 充分溶解后, 121 °C高压灭菌20 min, 冷却后后2~8 °C保存备用。