

《饲料添加剂 植物乳杆菌》（征求意见稿）标准编制说明

1. 任务来源

2011 年全国饲料工业标准化技术委员会下达了制订国家标准《饲料添加剂 植物乳杆菌》的任务（项目编号：20110867-Q-469），由国家粮食局科学研究院提出，全国饲料工业标准化技术委员会归口，国家粮食局科学研究院、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所作为承担单位主持该标准的制订工作。

本标准是按照 GB/T1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构与编写规则》的要求进行编写的。

2. 标准的主要单位和起草人

本标准的起草单位为国家粮食局科学研究院、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。本标准的主要起草人为张晓琳、韩伟、李爱科、魏永刚、李晓敏、赵晨、黄颖、郝淑红。

3. 标准制订的必要性和意义

随着人们生活质量的提高以及全球经济一体化，动物性食品安全已成为一个世界性的挑战和全球重要的公共卫生问题。其中，抗生素残留问题是影响动物性食品安全的重要因素之一。基于对抗生素危害性的认识，“安全、绿色、环保”的新型饲用抗生素替代产品已成为饲料行业的重点发展方向。微生物饲料添加剂由于不仅具有与抗生素饲料添加剂相似的有益作用，而且还具有无毒、无副作用、无残留、无抗药性，同时也不污染环境等优点，已逐步发展成为最具有应用前景的抗生素替代产品。

植物乳杆菌，作为较早被人们利用和进入工业化的乳酸菌菌种之一；其自身的优良性能在饲料添加剂中得以体现：大量的动物实验表明，植物乳杆菌具有良好的生物安全性，同时具有促进动物生长、调整肠道菌群结构、抑制有害病原菌生长、减少疾病发生、降低仔猪腹泻率等优良特性。因此，植物乳杆菌饲料添加剂的使用能够部分或全部替代饲用抗生素，以利得到更加安全与优质的动物产品。但植物乳杆菌类产品也存在一些问题，如菌株的纯化与传代、安全性评价、存储过程中抗逆性差、货架期短、检测方法不统一，导致产品稳定性和益生特性差异

大。

目前,在中华人民共和国农业部公告 2045 号《饲料添加剂品种目录(2013)》中,允许添加的微生物共有 34 种,包括:地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、两歧双歧杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、乳酸肠球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、德式乳杆菌乳酸亚种(原名:乳酸乳杆菌)、植物乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、产朊假丝酵母、酿酒酵母、沼泽红假单胞菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、嗜热链球菌、罗伊氏乳杆菌、动物双歧杆菌、黑曲霉、米曲霉、迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纤维二糖乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种(原名:保加利亚乳杆菌)、产丙酸丙酸杆菌、布氏乳杆菌、副干酪乳杆菌、凝结芽孢杆菌、侧孢短芽孢杆菌(原名:侧孢芽孢杆菌)。2012 年,欧盟委员会发布(EU) No.93/2012 号法规,批准植物乳杆菌(DSM8862 与 DSM8866)作为所有动物饲料添加剂。然而,涉及 2045 号公告中提及的微生物相关产品,尤其是单一微生物产品(包括植物乳杆菌),大多数尚未制订国家标准。

近几年,我国微生物饲料添加剂发展非常迅速,目前已形成年总产值超过 30-50 亿元的新兴产业,其中植物乳杆菌等乳酸菌产品最受关注,需求和产值也逐年提高。但由于我国的微生物饲料添加剂市场起步较晚,还没有对其形成一个完善的管理机制,尤其是尚没有针对每类具体产品的质量标准。当前国内市场比较混乱,例如,从我们在标准研制的 3 年中采样结果来看,作为主要品质检测指标的有效活菌数,超过 50%的样品与产品标识不符。因此,相关国家标准的制订和实施,将促进微生物饲料添加剂产业的可持续健康发展,加强微生物类产品有效管理,提高动物食品安全水平具有重要意义。

4. 确定国家标准主要内容的论据和编制过程

根据全国饲料工业标准化技术委员会的文件要求及制标任务通知,国家粮食局科学研究院(第一承担单位)随即下达了关于启动制订国家标准项目的任务,组织科研攻关团队,并立项实施。

本标准立足于本行业发展现状,同时关注行业发展趋势。首先在对我国历年微生物类国标、行标、地方标准及企标汇总分析的基础上,又参考了 ISO、欧盟、

台湾等的有关产品和检测标准，以使制订的标准能与最先进标准接轨。另外，本标准制订单位分别对内蒙古、山东、上海、河南、河北等代表性厂家生产的植物乳杆菌代表性产品进行采样，并对主要指标进行检测及分析，同时我们也统计了相关质量分析数据，从有关文献及部分饲料厂汇集了一批近年的植物乳杆菌产品卫生指标及动物应用效果分析结果，以使我们制订的标准具有实用性。在此基础上形成了《饲料添加剂 植物乳杆菌》国家标准征求意见稿。

在编制过程中，我们遵循以下原则：

（1）一致性原则

本标准在编制过程中采用或参考与《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）、《Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods》（ISO 16140）、《食品微生物指标制定和应用的原则》（GB/T 23784-2009）、《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB 4789.35-2010）等标准中就有关术语和定义、技术要求、试验方法和检验原则等相一致的原则和方法，并参考了大量国标、国外标准、行标及企标中的规定；以保证本标准既吸收国内外先进经验，又便于采标单位将标准中的要求纳入已建立的质量管理体系中来。同时，在充分研究和分析基础上，综合考虑我国企业、市场、消费者及监管机构的实际情况，科学、合理地编制本标准的内容。

（2）科学实用原则

科学性体现在，系统地分析代表性产品的有效技术指标，结合生产应用实际，凝练问题及产生原因、表现形式、预防措施等，明确产品在试验方法、检验规则、判定规则、包装、运输、储存、保质期等方面的要求，为该产品设置具有适当“门槛”或“标杆”。实用性体现在，研制标准过程考虑到产品生产、储运、流通、销售和应用各个环节的实际状况，不同行业同类技术成熟程度，消费者心理预期，标准涉及的检测成本等，最终体现在本标准的征求意见稿当中。

标准研制过程所处阶段和进度如下：

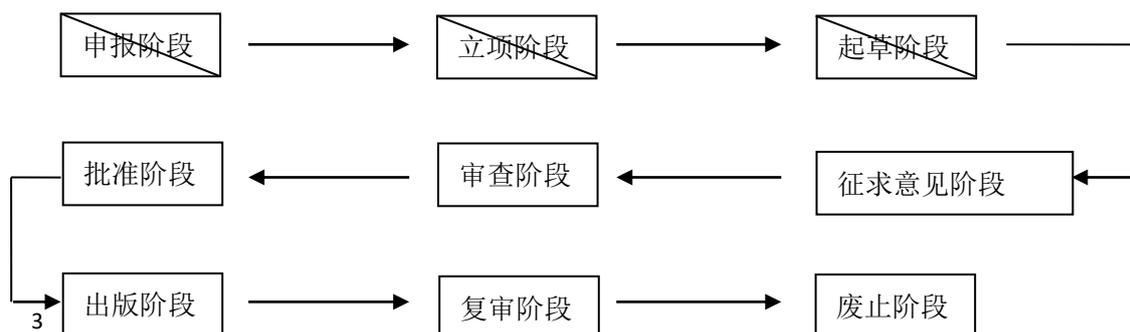


表1 标准研制工作-进度表

时间区段	工作内容
2011.7.20	成立工作小组：张晓琳、李爱科、韩伟、赵晨等，进行具体分工。
2011.8.1-2012.1.30	收集、查阅国内外相关资料、标准信息。
2012.2.1-2012.8.30	走访企业、消费者、相关专家学者，初步确定重点指标和研究思路，并重点确定标准采用的新方法及涉及新仪器，组织实验。
2012.8.22	第一次专家论证会
2011.8.1-2013.3.30.	采样阶段，采国内外的乳酸菌产品，并抽取国内有代表性的生产企业的样品。
2012.2.1-2014.5.30	试验论证和验证阶段。
2013.5.4-2013.8.30	结合试验验证、数据分析和专家意见，逐步确定标准重点考量指标。
2012.11.5-2014..4.30	广泛征求科研、生产、经营、质检及消费者的意见。
2014.6.15-2014.7.15	修改标准文本草稿，形成征求意见稿。新方法尝试。
2014.8.14-2015.4.23	再次国外内资料收集，企业电话访问。形成4次修改稿
2015.5.1-2015.11.30	形成征求意见稿。第二次专家论证会。函审等。

4.1 饲料添加剂 植物乳杆菌-采样和检测依据

根据农业部批准的获得（植物乳杆菌）饲料添加剂生产许可证的企业名单和市场直接购买方式、进行采样，共68个样品（包括同一公司不同品牌产品），如表2。其中，9个样品生产企业已停止生产或暂时不生产该产品，8个样品生产企业联系不到。采集样品经登记、编号、取/留样、盲样跟踪等步骤后、进行初步筛选，筛选原则为：①信息有追溯性；②样品标签上明确标识“植物乳杆菌”并在实物中确实含有植物乳杆菌；③活菌数量 \geq 产品标识活菌数；④市场上有售，并具有一定代表性。经过样品的初步检验，确定13个样品为跟踪检测和评价的样品。

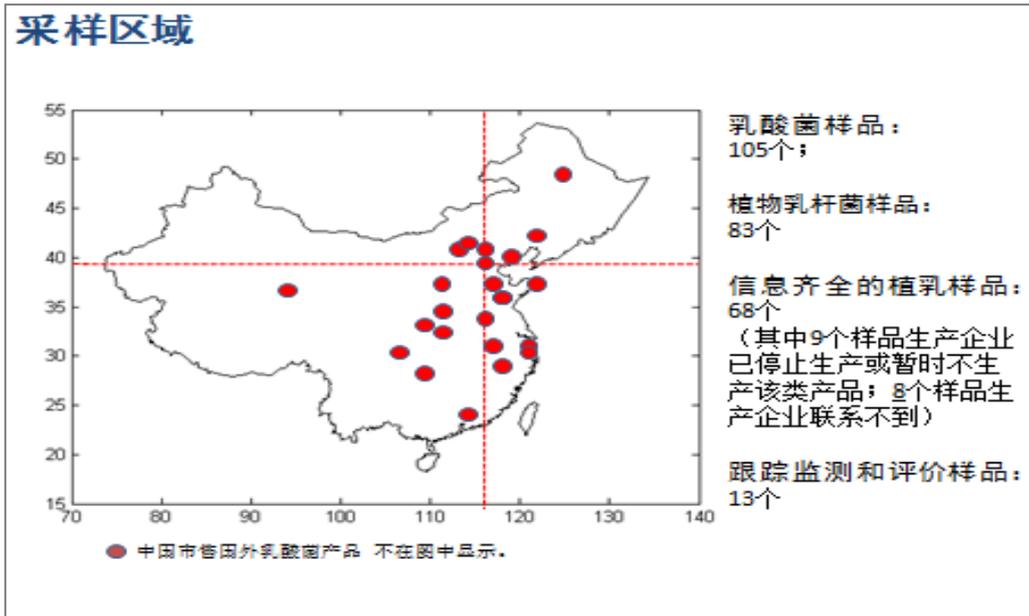


表2 （植物乳杆菌）饲料添加剂 生产企业名录

序号	省份	生产许可证号	获证企业名称
1	山东省	饲添（2009）2688	山东寿光富士达生物科技有限公司
2	河南省	饲添（2010）1064	郑州金百合生物工程有限公司
3	山东省	饲添（2010）1285	青岛绿海洋生物技术有限公司饲料厂
4	山东省	饲添（2010）1763	高唐华农生物工程有限公司
5	内蒙古自治区	饲添（2010）2774	内蒙古普泽生物制品有限责任公司
6	内蒙古自治区	饲添（2010）2857	内蒙古林泰生物科技发展有限公司
7	广东省	饲添（2010）2889	开平柏丽宝生物化学有限公司
8	湖南省	饲添（2011）1879	长沙蓝马生物饲料有限公司
9	辽宁省	饲添（2011）1986	沈阳丰美生物技术有限公司
10	辽宁省	饲添（2011）2122	大连三科生物工程有限公司
11	河北省	饲添（2011）3044	河北康达利药业有限公司
12	广东省	饲添（2011）3051	广州正无穷生物科技有限公司

13	山东省	饲添（2012）0662	青岛兴业生物工程有限公司
14	辽宁省	饲添（2012）2168	沈阳金科丰牧业科技有限公司
15	黑龙江省	饲添（2012）2316	哈尔滨中科生物工程有限公司
16	河北省	饲添（2012）3106	奥玛（唐山）生物工程有限公司
17	山东省	饲添（2012）3126	山东宝来利来生物工程股份有限公司
18	河北省	饲添（2012）3162	衡水鑫明科技有限公司
19	山东省	饲添（2006）2073	山东康地恩生物科技有限公司
20	重庆市	饲添（2008）2403	重庆优宝生物技术有限公司
21	上海市		润盈生物工程（上海）有限公司
22	河北省		沧州旺发生物技术研究所
23	北京市	饲添（2010）2774	北京和美科盛生物技术有限公司
24	江苏省		台湾生合生物科技股份有限公司、芯来旺生物科技（南京）有限公司
25	上海市		紫石生物集团

表3 跟踪检测和评价的样品

内部编号	品名	厂家	主要成分	备注
5	多利菌宝	山东康地恩生物科技股份有限公司	嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、屎肠球菌	同时进行：国标草案方法对多菌株区分试验。
11	优长素	重庆优宝生物技术有限公司	乳杆菌、酵母菌、芽孢杆菌、菌体蛋白、生物活性肽、酵母多糖	同时进行国标草案方法对多菌株区分试验。
16	产酶益生菌.群康（103 畜禽通用）	山东宝来利来生物工程股份有限公司	2 株高酶活性枯草芽孢杆菌、乳酸片球菌、植物乳杆菌及其代谢产物	同时进行：①同厂家不同品牌产品稳定性试验；②国标草案方法对多
17	植物乳杆	山东宝来利来生物工	植物乳杆菌及其代谢产物	菌株区分试验。

	菌	程股份有限公司	载体等	
19	润盈植物乳杆菌 200 亿	润盈生物工程（上海）有限公司	植物乳杆菌	
20	普泽植物乳杆菌	内蒙古普泽生物制品有限责任公司	植物乳杆菌	
22	旺发植物乳杆菌	沧州旺发生物技术研究所	植物乳杆菌	
26	润盈发酵包	润盈生物工程（上海）有限公司	植物乳杆菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌	同时进行：国标草案方法对多菌株区分试验。
29	青贮邦	北京和美科盛生物技术有限公司	干燥植物乳杆菌	同时进行：①同厂家不同品牌产品稳定性试验；②国标草案方法对多菌株区分试验。
32	乳安邦	北京和美科盛生物技术有限公司	干酪乳杆菌、植物乳杆菌	
33	发菌邦	北京和美科盛生物技术有限公司	干酪乳杆菌、植物乳杆菌	
34	芯来旺	台湾生合生物科技股份有限公司、芯来旺生物科技（南京）有限公司	植物乳杆菌	
35	紫石	紫石生物	植物乳杆菌	

4.2 饲料添加剂 植物乳杆菌-术语和定义的编制依据

主要参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等）、《常见细菌系统鉴定手册》（东秀珠、蔡妙英等）相关植物乳杆菌的鉴定部分。

4.3 饲料添加剂 植物乳杆菌-微生物形态的编制依据

4.3.1 菌体形态

参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等，809页）、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》（凌代文，6-16页），并经过对植物乳杆菌标准

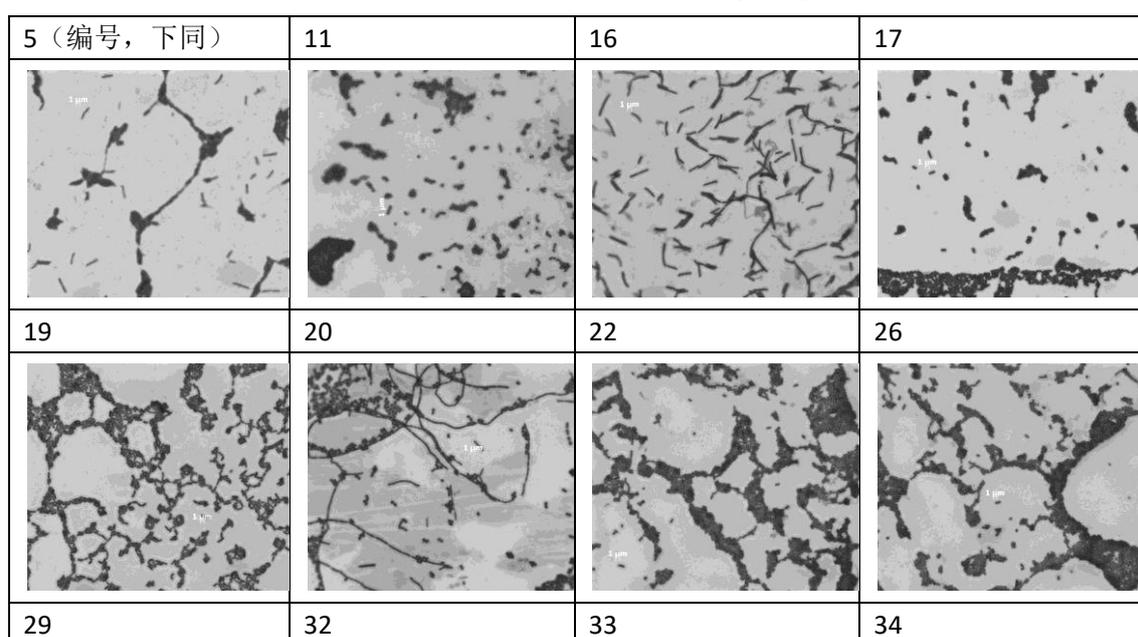
菌株和样品的革兰氏染色和显微观察，确定植物乳杆菌的菌体形态为：菌体细胞呈圆端直杆状，通常0.9~1.2 μm宽，3~8 μm长，单个、成对或成短链

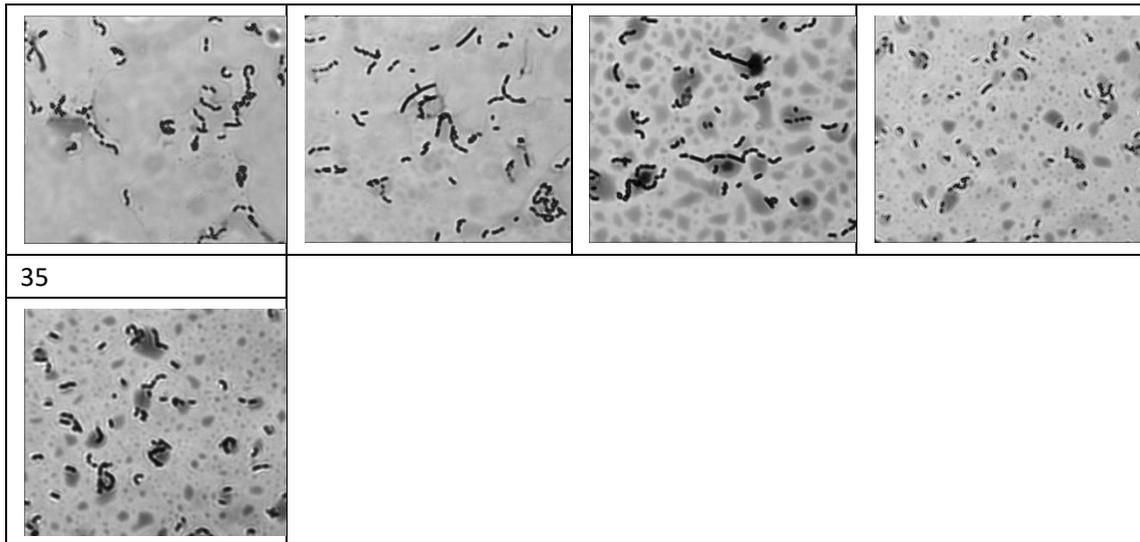
表4 跟踪检测和评价的样品-特征描述

编号	形态	革氏染色 ^a	芽孢	荚膜	鞭毛
5	直杆、短链	阳性	无	无	无
11	直杆、单个	阳性	无	无	无
16	直杆、单个	阳性	无	无	无
17	直杆、单个	阳性	无	无	无
19	直杆、单个	阳性	无	无	无
20	直杆、短链	阳性	无	无	无
22	直杆、单个	阳性	无	无	无
26	直杆、单个	阳性	无	无	无
29	直杆、短链	阳性	无	无	无
32	直杆、单个	阳性	无	无	无
33	直杆、短链	阳性	无	无	无
34	直杆、单个	阳性	无	无	无
35	直杆、短链	阳性	无	无	无

a:革兰氏染色部分为生理生化特征，放在标准中4.1.3。

图1 跟踪检测和评价样品显微形态





4.3.2 菌落形态

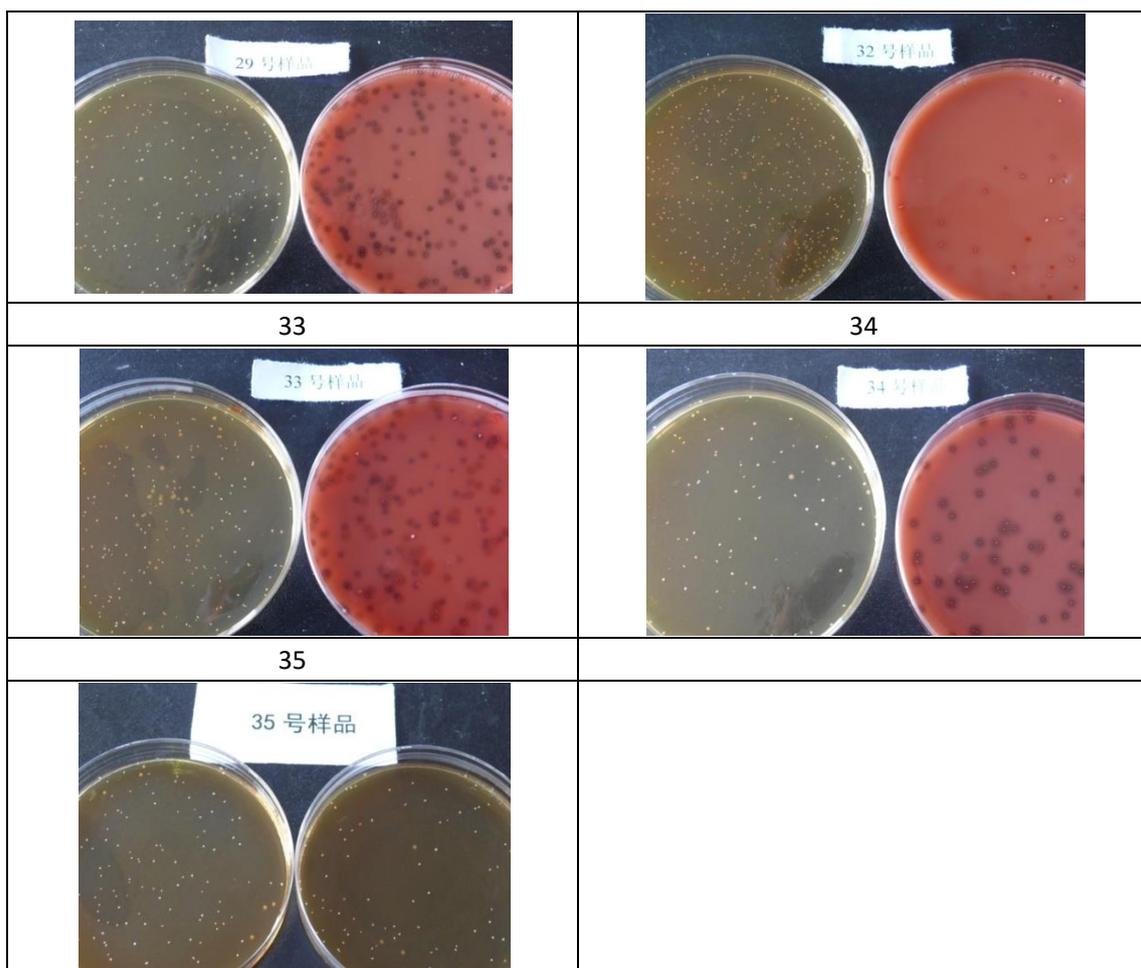
参考国家标准《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》(凌代文, 6-16页)、《食品卫生微生物学检验 乳酸菌饮料中乳酸菌检验》(GB/T4789.35)、《进出口食品中乳酸菌检验方法 第1部分: 分离与计数方法》(SN/T1941.1-2007)及数十篇乳酸菌文献, 选用适合乳酸菌的培养基为国标草案中分离用培养基, 见表5。跟踪检测的样品在下述培养基上培养(37°C ± 2°C, 24-48h), 菌落形态均符合典型特征, 如图3。

表5 适合乳酸菌的培养基及相应菌落形态

培养基名称	菌落形态
改良TJA	平皿底为黄色, 菌落中等大小, 微白色, 湿润, 边缘不整齐, 直径3mm ± 1mm, 如棉絮团状菌落
改良MC	平皿底为粉红色, 菌落较小, 圆形, 红色, 边缘似星状, 直径2mm ± 1 mm, 可有淡淡的晕
MRS	平皿底为黄色, 菌落中等大小, 圆形, 白色, 湿润, 凸起, 边缘整齐, 直径为3mm ± 1mm

图2 部分样品菌落形态

29 (编号, 下同)	32
-------------	----



4.3.3 生理生化特征

主要参考《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》(R.E.布坎南, N.E.吉本斯等, 809-811页)。凡在改良 TJA 或改良 MC 琼脂斜面上, 于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 24h~48h 培养, 刮取菌苔, 进行表 6 中试验, 以验证植物乳杆菌生理生化特征; 包括革兰氏染色、4% 牛磺胆酸钠的耐受性实验、利用精氨酸产氨及利用不同碳源实验。

表 6 植物乳杆菌生理生化特征

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	+	蔗糖	+
4%牛磺胆酸钠	+	麦芽糖	+
精氨酸产氨	-	甘露醇	+
碳水化合物反应		水杨苷	+
七叶苷	+	山梨醇	+
纤维二糖	+	棉籽糖	+

注：+为阳性反应；-为阴性反应。

图3 部分样品革兰氏染色结果

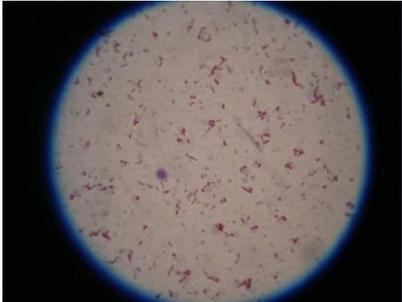
29 (编号, 下同)	32
	
33	34
	
35	
	

图4 跟踪检测样品的生理生化反应结果

5-26 号精氨酸产氨实验	29-35 号精氨酸产氨实验
---------------	----------------

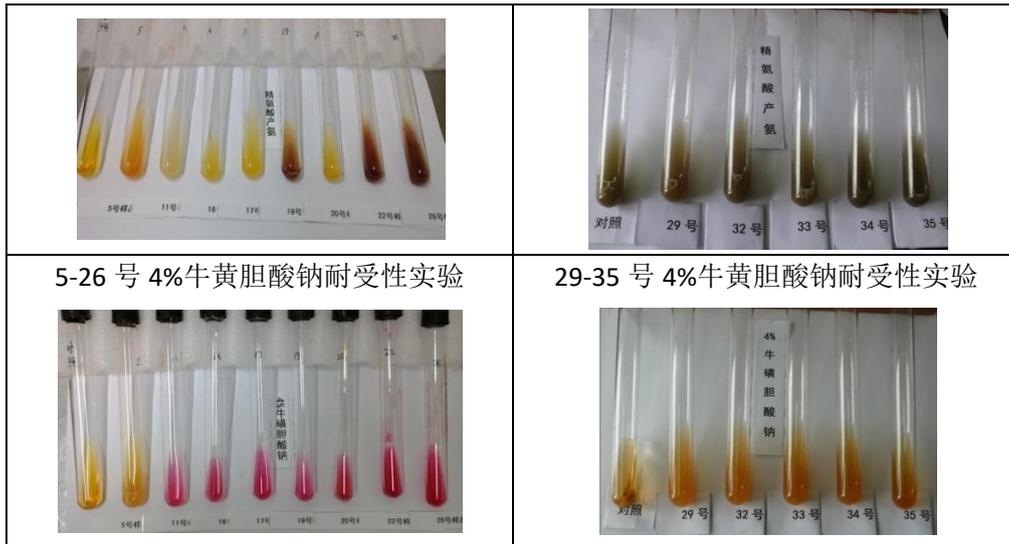


表7 跟踪检测样品的生理生化结果描述

编号	七叶 苷	纤维二 糖	麦芽 糖	甘露 醇	水杨 苷	山梨 醇	蔗 糖	还 原 硝 酸 盐 ^a	4% 牛 磺 胆 酸钠	精氨 酸产 氨	15 °C 生长 ^b
5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
22	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
26	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
29	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
32	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
33	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
34	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
35	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

a,b: 两项特征试验最终未列入标准的征求意见稿。

4.4 饲料添加剂 植物乳杆菌-感官特征的编制依据

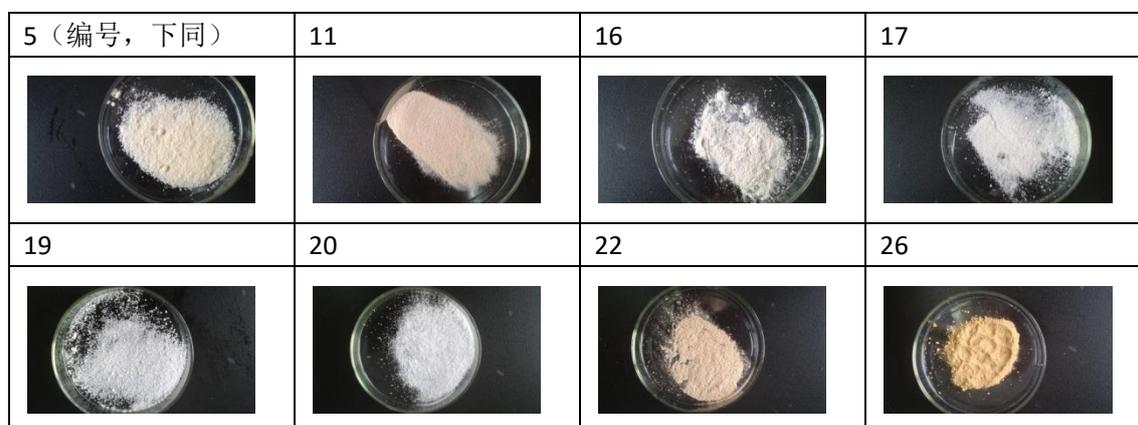
目前，市场在售的乳酸菌类饲料添加剂大多为固态产品，在我们收集的样品中，只有 2 个为液态产品。从溶解性分析，水溶性产品居多，不乏肠溶性产品。

从形态分析，存在冻干菌粉、湿法造粒、载体吸附菌粉等，且粒度在 20-100 目范围，颜色都很均一。在标准草案中的表述为：“产品性状应符合包装上标明的产品固有的形状、色泽、气味、均匀程度、杂质等，无异臭味。”

表8 跟踪检测样品的感官特征

编号	粒度 (目/微米)	形状	色泽	均匀程度	有无刺激 气味	有无杂质
5	50/297	粉末	亮黄	均匀	无	无
11	80/178	粉末	淡黄	均匀	无	无
12	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
16	80/178	粉末	灰白	均匀	无	无
17	50/297	粉末	淡黄+白	均匀	无	无
19	50/297	颗粒	白	均匀	无	无
20	60/250	粉末	白	均匀	无	无
22	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
26	60/250	颗粒+粉末	颗粒：白 粉末：黄	均匀	无	无
29	45/355	粉末	白	均匀	无	无
32	45/355	粉末	淡黄	均匀	无	无
33	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
34	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
35	50/297	粉末	白	均匀	无	无

图5 跟踪检测样品的感官图示



4.5 饲料添加剂 植物乳杆菌-水分的编制依据

对收集的所有完整包装的固态样品的水分含量的测定：称取 2.00~10.0g 切碎或磨细的样品，精密称量后放入置 95~105℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥 2~4h 后，盖好取出，放入干燥器内冷却 0.5h 后称量。然后再放入 95~105℃干燥箱中干燥 1h 左右，取出，放干燥器内冷却 0.5h 后再称量。至前后两次质量差不超过 2mg，即为恒量。结果表明：所收集的完整包装的固态样品的水分含量在 4.8%-7.5% 区间内。另外，随机挑选 1 个样品，调节不同水分（6% 和 12%），贮存不同时间（3、6、12 月），结果发现高水分样品中，随水分提高和时间延长，霉菌总量也显著增加。考虑到商品加工、流通、储藏、使用过程中可能带来的误差和水分增加，标准草案中的表述为：“不高于 8.0%。”

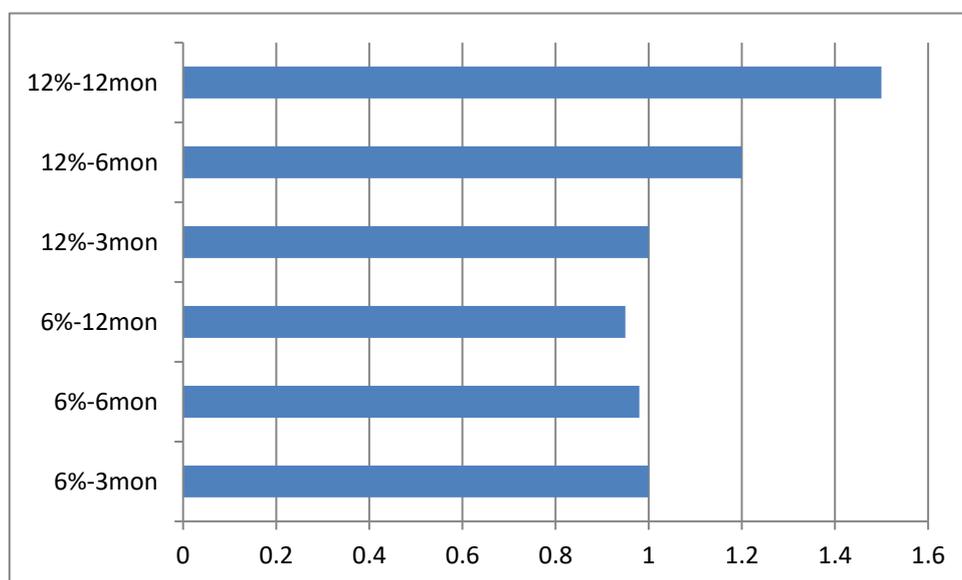


图 6 随机样品调节不同水分—霉菌生长情况（纵坐标：水分%+月数；横坐标：霉菌增长倍数，以 $1.0 \times 10^4 \text{CFU/g}$ 设为 1）

表9 跟踪检测样品水分检测结果

编号	样品 1/%	样品 2/%	样品 3/%	平均值/%	标准差
5	6.13	6.18	6.14	6.15	0.03
11	5.81	5.82	5.82	5.82	0.01
16	4.89	4.84	4.86	4.86	0.03
17	5.55	5.53	5.58	5.55	0.03
19	6.12	6.11	6.11	6.11	0.01
20	7.14	7.17	7.14	7.15	0.02

22	4.04	4.07	4.05	4.05	0.02
26	6.06	6.05	6.05	6.05	0.01
29	7.56	7.57	7.54	7.56	0.02
34	7.04	7.01	7.03	7.03	0.02

4.6 饲料添加剂 植物乳杆菌-活菌数的编制依据

活菌数，是益生菌在最重要的功能性指标之一；在 FAO/WHO 和欧盟对益生菌的定义中，均强调“足够数量”的必要性。所以说，活菌数的高低关系到产品的质量。目前，针对植物乳杆菌的活菌数在 ISO 标准、国标、行标中尚无强制规定，但乳酸菌在食品、保健食品中相关规定、及微生物饲料添加剂产品的文献中数据都值得借鉴。在国标《发酵乳》（GB19302-2010）、《乳酸菌饮料卫生标准》（16321-2003）、《婴儿配方食品》（GB10765 - 2010）、《较大婴儿和幼儿配方食品》（GB10767 - 2010）、《婴幼儿谷类辅助食品》（GB10769 - 2012）等均明确：产品中活性益生菌的活菌数应 $\geq 10^6$ CFU/g(ml)。而在大量代表性杂志文献中（包括《Animal Science》、《动物学报》、《动物学杂志》、《动物营养学报》等），微生物饲料添加剂的有效活菌浓度大多在 10^7 - 10^{10} 范围内。从植物乳杆菌的菌种特征、发酵规律、工业成熟度分析，饲料添加剂从业者自微生物发酵、离心收集、冻干处理或加载体复配、干燥等步骤后，得到大于 1.0×10^{10} CFU/g 的菌粉是完全可以达到的。同时，从收集样品的标识和实际检验来看，85%的（乳酸菌）样品的初始活菌数大于 1.0×10^9 CFU/g，且使用浓度均要求或建议在 1.0×10^6 CFU/g（饲料）以上。所以，考虑到行业平均加工水平、有效使用浓度、市场实际情况，并本着促进行业发展、对从业者提高“适当门槛”的原则，标准草案提出：植物乳杆菌活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/g。

表10 跟踪检测样品的标识活菌数

编号	标识活菌数，CFU/g	初检活菌数*，CFU/g
5	$\geq 1 \times 10^9$ （复合菌组成）	1.0×10^8
11	$\geq 1.51 \times 10^{13}$ （复合菌组成）	1.0×10^{10}
16	$\geq 2.0 \times 10^8$ （复合菌组成）	1.0×10^6
17	2.0×10^{10}	2.28×10^{10}

19	2.0×10^{10}	5.9×10^9
20	---	1.09×10^{10}
22		3.0×10^9
26		2.62×10^9
29	2.0×10^{10}	$\geq 2.0 \times 10^{10}$
32	$\geq 1.5 \times 10^9$ (复合菌)	$\geq 5.0 \times 10^9$
33	$\geq 1.0 \times 10^9$ (复合菌)	2.5×10^9
34	$\geq 1.0 \times 10^{11}$	2.28×10^{10}
35	1.0×10^{11}	1.5×10^9

*: 初检活菌数为采样即检测的结果。样品初检均在产品标识保质期的前2月内。

4.7 饲料添加剂 植物乳杆菌-卫生标准的编制依据

主要参考《微生物饲料添加剂技术通则》(NY/T1444-2007)、《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》(NY/T1461-2007)、《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》(2131-2012)中关于卫生标准的相关规定。其中,考虑到霉菌及其产生的毒素可能对人和动物的健康危害,我们认为在标准中应有更严格的上限控制;结合样品检测结果,标准草案规定霉菌和酵母总数的允许量为 1.0×10^4 个/kg。标准草案表述如表 11。

在植物乳杆菌类产品中混有杂菌是不可避免的。杂菌可能来自环境、用水、配料、载体及包装等,同时杂菌的种类又具有不可预知性,这给杂菌的鉴别及其定量带来了极大的难度。按照通常检测杂菌的办法:将样品稀释到合适浓度,倾注平板培养,根据菌落的差异辨别杂菌,并同时定量。由于常用 9cm 平板空间有限,勉强分辨菌落形态、须平板至多长 100-300 个菌落,所以依靠平板培养方法的分辨率仅为 1%。我们尝试过 3 个方案进行这部分试验:a.选择 12cm 或 18cm 平板培养菌,提供更大生长空间、利于分辨杂菌;b.分子生物学方法定量植物乳杆菌,与平板培养法得出的总菌数相减,得到杂菌数量;c.将常见杂菌分类,利用与植物乳杆菌生理生化特征的差异来计算杂菌数量。经过实验,a 方案观察菌

落形态差异仍存局限，无法将杂菌分辨率提高至 0.1%；b 方案中分子生物学方法定量植物乳杆菌的精确度与精密度差、对实验人员操作水平要求高，不适用作标准方法（试验结果见附件）；c 方案只能确定几类菌群，但准确度和实用性很强（试验结果见附件）。这种情况下，将杂菌率的允许量仍设为为 1.0%。

表 11 植物乳杆菌饲料添加剂卫生指标

项目	指标
杂菌率，%	≤ 1.0
黄曲霉素 B1，g/kg	≤ 10.0
砷的允许量，mg/kg	≤ 2.0
铅的允许量，mg/kg	≤ 5.0
汞的允许量，mg/kg	≤ 0.1
镉的允许量，mg/kg	≤ 0.5
大肠菌群的允许量，CFU/100g	≤ 400
霉菌总数的允许量，CFU/g	< 1.0×10 ⁴
致病菌（志贺氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌）	不得检出

如表 12 和表 13 所示，所选样品进行霉菌、大肠菌群、致病菌和重金属的检测，结果表明分别有 72%和 82%的样品在标准草案规定范围内。

表12 跟踪检测样品的霉菌、致病菌的检测结果

编号	霉菌总数， CFU/g	沙门氏菌， CFU/g	大肠菌群， CFU/100g	金黄色葡萄球 菌，CFU/g	志贺氏菌， CFU/g
5	1.3×10 ²	-	380	-	-
11	8.3×10 ³	-	450	-	-
16	1.2×10 ⁴	-	407	-	-
17	9.1×10 ³	-	397	-	-
19	2.13×10 ⁴	-	157	-	-
20	5.6×10 ³	-	211	-	-
22	7.0×10 ³	-	356	-	-
26	3.8×10 ³	-	309	-	-
29	1.32×10 ²	-	107	-	-

32	9.7×10 ²	-	401	-	-
33	>1.0×10 ⁴	-	206	-	-

表13 部分样品的重金属含量分析

编号	砷, mg/kg	铅, mg/kg	镉, mg/kg	汞, mg/kg	黄曲霉毒素, µg/kg
5	0.12	未检出 (<1)	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)
17	0.012	未检出 (<1)	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)
19	0.074	未检出 (<1)	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)
20	未检出 (<0.01)	未检出 (<1)	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)
22	0.76	3.85	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)
29	未检出 (<0.01)	未检出 (<1)	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)
32	0.72	22.08	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)
33	未检出 (<0.01)	未检出 (<1)	未检出 (<0.01)	未检出 (<0.005)	未检出 (<0.5)

4.8 饲料添加剂 植物乳杆菌-试验方法的编制依据

4.8.1 抽样、感官检验、水分的编制依据

抽样、感官检验、水分均有专项国标及其它国标中方法作为依据。

4.8.2 活菌计数试验方法的编制依据

如图7所示植物乳杆菌检验结果流程图。

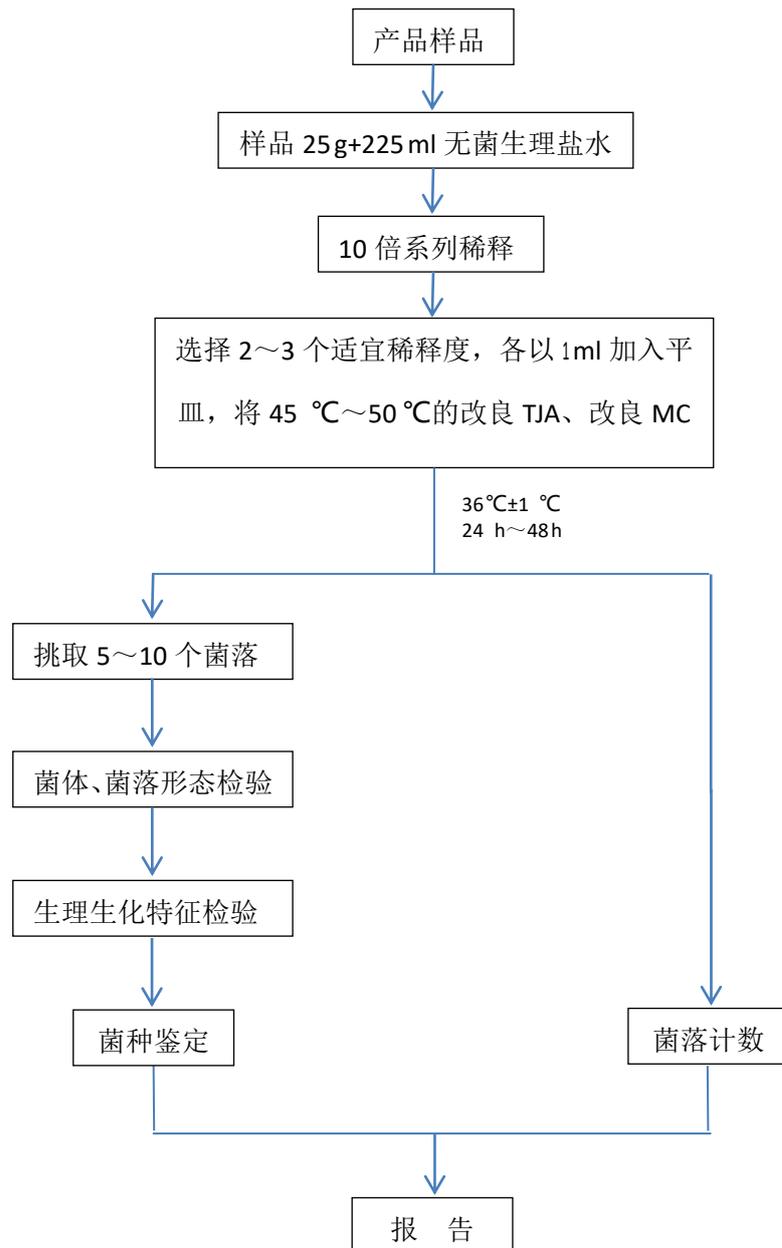


图7 所示植物乳杆菌检验结果流程图

主要参考《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB4789.35）、《食品微生物学检验 双歧杆菌检验》（GB4789.34）、《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》（NY/T1461-2007）、《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》（2131-2012）等标准级方法，通过定性和定量两部分完成植物乳杆菌的检测。所以标准草案表述为：

“5.4.2 菌种鉴定

5.4.2.1 样品制备

在按照 GB/T 14699.1 进行采样基础上，称取 25.0g±0.01g 样品，加入 225ml 无菌生理盐水中均质，待均匀后，再将样品用无菌生理盐水按十倍稀释法制成不同浓度稀释液。取 1.0ml 合适浓度稀释液，注入无菌平板，每个稀释度做 3 次重复。将融化并冷却至 45 °C ~ 50 °C 的

改良 TJA、改良 MC 或 MRS 培养基，向每个培养皿中倒入约 15 ml~20 ml，摇匀并凝固，制成相应培养基的琼脂平板。36℃±1℃倒置培养 24h~48h。

5.4.2.2 菌落选择：用接种针或接种环随机挑取 5~10 个菌落。

5.4.2.3 菌体形态检验：涂片染色，用光学显微镜观察菌体形态。

5.4.2.4 菌落形态检验：观察菌落颜色、形态。

5.4.2.5 生理生化特征检验：接种并进行 4.1.3 表 2 中各项试验。

5.4.3 菌落计数

5.4.3.1 植物乳杆菌计数

5.4.2.1 项中菌落总数减去杂菌数之差，即得植物乳杆菌计数结果。

5.4.3.2 稀释度

选取适宜的稀释度，菌落在 30~300 之间的平板进行计数。

5.4.3.3 计算方法

计算方法见公式（1）。

$$N = \sum C / [V(n_1 + 0.1n_2)d] \dots\dots\dots (1)$$

式中：N——样品中菌落总数

∑C——两个连续稀释度全部平板上菌落数总和

V——每个平板上接种的体积，ml

n₁——第 1 个稀释度（低稀释倍数）平板个数

n₂——第 2 个稀释度（高稀释倍数）平板个数

d——相对第 1 稀释度的稀释因数

结果为每克产品微生物菌落数，以科学计数法表示结果。

具体结果输出实例应参考 GB/T 4789.2-2010。

5.4.3.4 允许差

两次平行测定结果的相对偏差不大于 2%。”

4.8.3 杂菌允许量试验方法的编制依据

因为杂菌来源多样性和不可预知性，本标准草案重点关注了几类菌群：**a.**致病菌、霉菌和酵母；草案中均设定了明确限量，在卫生指标中单独列出；有相应的国标方法检测。**b.**形态明显差别菌；通过菌落观察排除。标准草案表述为：

“5.5.1 杂菌率检测

$$\text{杂菌率} = \text{杂菌数} / (\text{植物乳杆菌活菌数} + \text{杂菌数}) \times 100\% \quad (2)$$

4.8.4 其它试验方法的编制依据

检测项目所采用的检测方法如表14。

表14 检测项目及检测方法一览表

检测项目	检测方法
抽样	GB/T14699.1
水分	GB6435
黄曲霉毒素 B1	GB/T17480
砷含量	GB/T13079
汞含量	GB/T13081
铅含量	GB/T13080
镉含量	GB/T13082
霉菌总数	GB/T4789.15
大肠菌群	GB/T4789.3
致病菌	GB/T4789.5 、 GB/T4789.10 、 GB/T13091

4.9 饲料添加剂 植物乳杆菌-检验规则的编制依据

4.9.1 出厂检验的编制依据

感官指标、水分、微生物含量（包括活菌数和杂菌）是出厂最必要的3组数据，因为3项指标是产品外观区分和质量标准的直接体现。所以标准草案表述为：“感官指标、水分、微生物含量（包括活菌数和杂菌）为出厂检验项目，由生产厂家或公司的质检部门进行检验，检验合格并签发质量合格证的产品方可出厂。”

4.9.2 型式检验的编制依据

参考《微生物饲料添加剂通用要求》（GB/T23181-2008）中功能菌的菌种要求 and 安全性要求、组织专家讨论会中专家意见、及企业调研，草案强调了菌株的唯一性、稳定性和安全性，对目标菌的分子生物学特征、形态特征、培养特征和生理生化特征、生产情况调整作出年检或半年检验。另外，在标准草案附录中增加了模式菌株ATCC14917的16SrRNA 基因的全序列。

16SrRNA 基因的全序列的检测，作为目前常用的、成熟的鉴定细菌手段之一，

不存在技术难度，但没有放在“菌种鉴定”部分的原因：考虑到不同用户的检测可操作程度，多数企业和部分检测机构尚不能独立完成从 DNA 提取、PCR、目的基因转入质粒、到测序的全部过程。同时，我们认为，鉴定菌种对于微生物类饲料添加剂产品的检测工作非常必要，16SrRNA 基因的检测作为简单、准确的鉴定手段之一，在型式检验中最易实现。

标准表述为：

“a. 菌种遗传特征检验：与《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》（《伯杰氏系统细菌学手册》）Vol. II 所列模式菌株 ATCC14917 的 16SrRNA genes (16S 核糖体核糖核酸) 全序列进行比对，相似度在 99%以上。

b. 国家质量监督机构要求的其它型式检验。”

“但有下列情况之一时，企业半年进行一次型式检验，下列检验项应包括：a. 更改主要原辅材料和关键生产工序；

b. 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月以上（或半年），重新恢复生产时；

c. 国家质量监督机构提出要求进行型式检验。”

4.9.3 判定规则的编制依据

标准草案中涉及检测指标或参数，都为强制性要求，所以要求每一项指标合格才可以形成商品、进入流通环节。同时如有某项或某几项指标检测不合格，需要复检确认。标准草案表述为：“检验中有一项指标不符合本标准时，应重新抽样，进行复检，复检结果仍有一项指标不符合本标准时，则判定该批产品为不合格。”

4.9.4 标签、包装、运输、储存和保质期的编制依据

4.9.4.1 标签、包装、运输的编制依据

参考同类饲料添加剂的国家标准和行业标准中相关规定。值得说明的是：本标准草案尤其对标签中应标明产品包含功能性微生物的学名和数量作出要求，这是针对市场上一些产品标签上使用“乳酸菌”或“微生物数量为××”，严重模糊了种属区分，同时增加了检测难度。标准草案表述为：

“8.1.1 采用鲜明的标签贴于外包装显著位置；

8.1.2 标签内容应符合 GB10648 的要求；

8.1.3 标签应标明所有添加微生物的学名和数量。”

4.9.4.2 储存和保质期的编制依据

根据我们对植物乳杆菌类产品为期一年（或其标明保质期）的跟踪检测、温度梯度储存试验，又考虑到乳酸菌自身特性、饲料企业实际应用情况，我们发现：

a.所有收集产品中植物乳杆菌的活菌数随时间延长而降低，冷藏储存效果显著好于常温储存，在6月周期内常温储存的植物乳杆菌活菌数呈数量级降低（约81%的产品）；b.饲料生产和应用企业及消费者几乎不能满足长周期冷藏储存大量饲料添加剂的条件，且饲料添加剂往往和其它大宗饲料原料混合好销售，全部冷藏几乎不可能。

虽然可能由于菌种与保护工艺限制的原因，多数采集的乳酸菌类样品在其货架期内均出现不同程度的活菌数减少；但从保证产品的有效性与合理稀释角度出发，产品保质期的严肃性应该被加以重视，标准草案提出的活菌数是指，在其保质期内不得低于 $1.0 \times 10^9 \text{CFU/g}$ 。所以，（在保证标准草案规定的植物乳杆菌活菌数前提下）标准草案表述为“保质期为6个月。”但同时，在对储存的要求中，标准草案仍提出：“建议使用 10°C 以下的冷藏条件。”

表15 跟踪检测样品储存期内活菌变化

样品	接样检测活菌数*	3 月后活菌数 /存活率	6 月后活菌数 /存活率	9 月后活菌数 /存活率	12 月后活菌数存活率
5	1.0×10^8	5.6×10^7	1.12×10^7	4.7×10^6	2.7×10^6
11	1.0×10^{10}	3.9×10^9	1.0×10^7	5.4×10^6	1.07×10^6
16	1.0×10^6	2.74×10^5	1.0×10^5	6.7×10^4	1.31×10^4
17	2.28×10^{10}	1.5×10^{10}	1.0×10^{10}	6.3×10^9	1.2×10^9
19	5.9×10^9	5.0×10^9	2.2×10^9	7.4×10^8	4.1×10^8
20	1.09×10^{10}	9.7×10^9	4.9×10^9	2.8×10^9	7.9×10^8
22	3.0×10^9	2.03×10^9	1.21×10^9	1.0×10^9	7.2×10^8
26	2.62×10^9	2.23×10^9	8.5×10^8	6.3×10^8	9.4×10^7
29	$\geq 2.0 \times 10^{10}$	1.89×10^{10}	1.0×10^{10}	5.9×10^9	1.32×10^9

32	$\geq 5.0 \times 10^9$	4.3×10^9	3.11×10^9	6.3×10^8	9.5×10^7
33	2.5×10^9	1.7×10^9	1.0×10^9	5.6×10^8	2.15×10^8
34	2.28×10^{10}	2.2×10^{10}	5.95×10^9	8.1×10^8	1.0×10^8
35	1.5×10^9	1.38×10^9	1.04×10^9	6.2×10^8	1.45×10^8

*:单位: Log(CFU)/g:

4.10 饲料添加剂 植物乳杆菌-资料性附录的编制依据

资料性附录参考如下:

表16 资料性附录的参考源

资料性附录名称	参考源
改良番茄琼脂培养基	SN/T1941.1-2007
改良MC培养基	SN/T1941.1-2007
MRS培养基	SN/T1941.3-2007
生理盐水	GB/T4789.35-2010
革兰氏染液	《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》
发酵管	
精氨酸产氨溶液	
模式菌株 ATCC 14917 的 16 S rRNA 基因序列	NCBI数据库资源

5. 与现行法律法规和强制性国家标准的关系

本标准的制订可为饲料添加剂 植物乳杆菌质量安全的评价、相关质量标准指标的制订和贯彻执行提供直观的指导。

与有关的现行法律、法规和强制性国家标准没有冲突、矛盾和重复。

附件

附件1 植物乳杆菌—分子生物学方法计数活菌 结果报告

附件2 其它乳酸菌计数方法的结果报告

附件1 植物乳杆菌--分子生物学方法计数活菌 结果报告

一、实验方法

1 RNA 定量

1.1 RNA 的提取及纯化

- 1) 称取饲料品约 5 克悬浮于 15 ml PBS 中, 振荡使之充分混匀后静置 1 min, 而后 400 rpm 4°C 离心 1 min, 取上浊约 7 ml 于离心管中, 8000 rpm 4°C 离心 10 min, 弃上清; 加入 5 ml PBS, 振荡使之充分混匀, 8000 rpm 4°C 离心 10 min, 弃上清;
- 2) 加入 200ul 水和 400ul 酸酚, 并加入适量酸洗玻璃珠, 悬浮沉淀。置于组织研磨仪上, 1800Hz 下研磨 30min。
- 3) 14000×g, 4°C 离心 10min, 将水相(约 400uL) 转移到一个新的 2ml 离心, 加入 1ml TRIZOL, 剧烈混匀 15 秒, 在室温中放置 5min。
- 4) 加入预冷的 200ul 氯仿, 剧烈混匀 15 秒, 在室温中放置 3min, 12000×g, 4°C 离心 15min, 将水相转移到一个新的 1.5ml 离心管。
- 5) 重复 6-7 步骤两次。
- 6) 12000×g, 4°C 离心 15min, 将水相转移到两个新的 1.5ml 离心管(每个离心管约 400ul), 每管加入 500ul 预冷异丙醇, 轻轻上下颠倒 5、6 下, 在室温中放置 10min, 15000×g, 4°C 离心 10min, 弃去上清。
- 7) 加入 1ml 预冷 75% 乙醇, 轻摇 2 下, 在 7500×g, 4°C 离心 5min, 弃去上清, 让沉淀在空气中吹干, 用 100ul 去离子(DEPC)水溶解沉淀(在 60°C 中水浴 10min, 每 2-3min 拍打一次, 拍打后稍微离心后继续水浴), 获得 RNA 溶液, 测其浓度后于 -80°C 保存。

1.2 跑胶

用 1% 琼脂糖凝胶, 一个孔只放蓝作为参照, 1ug RNA 样品用水补足至 5ul, 加 1ul 6X loading buffer 跑胶。120V, 15-20min。所有缓冲液用 DEPC 水配制。

1.3 DNase 处理

- 1) 取 10 ug RNA 用于 Dnase 处理。
- 2) 10 ug RNA, 0.5uL Rnase Inhibitor, 5uL 10X Dnase Buffer, 1uL Turbo Dnase

(Ambion),加水补足到 50uL。

3) 在 37 度温育 45min 后加入 0.5 uL Turbo Dnase (Ambion), 继续 37 度温育 45 min, 冷却至室温。

1.4 Dnase 失活

1) 加 50uL 水补到 100uL。

2) 加入 100uL 酚/氯仿/异戊醇 25: 24: 1, 剧烈震荡 15s,室温静置 2min, 室温 12000 rpm 5min, 吸取水相至新 ep 管 (约 100 uL), 不要碰中间及下层。

3) 加入 100uL 氯仿/异戊醇 24: 1, 剧烈震荡 15s,室温静置 2min。

4) 室温 12000 rpm 5min, 吸取水相至新 ep 管 (约 70-100 uL), 不要碰中间及下层。

5) 加入 1/10 体积的醋酸钠和 2.5 倍体积的预冷无水乙醇, 轻轻颠倒 5 次, -20 度静置 30min。

6) 4 度 12000 rpm 离心 10min, 去掉上清, 倒掉之后用枪头吸出, 不要碰到沉淀。

7)加入 1 mL 70%乙醇, 稍剧烈摇 10 秒, 4 度 12000 rpm 离心 10min, 去掉上清, 倒掉之后用枪头吸出, 不要碰到沉淀。

8) 室温干燥, 一般 10 分钟左右, 用 RNase-free 水 (15uL 左右)。60 度水浴悬浮 RNA 10min。每 3 分钟轻轻敲打管壁益于悬浮。溶解后冷却至室温后置于冰上, 测浓度。

1.5 RNA 验证

取 0.5 ug RNA 用于 PCR 验证, PCR 扩增 *epi* 基因 (40 个循环), 若无条带则无 DNA 残留。gDNA 作为阳性参照, DEPC 水为阴性对照。

1.6 反转录

取 2ugRNA 进行 cDNA 合成。具体步骤参照反转录酶 SuperScript III Reverse Transcriptase 试剂盒说明书进行。设置 DEPC 水阴性对照组。

1.7 RT-PCR

将反转录后的 cDNA 做 10 倍和 100 倍的稀释, 而后和外标品一起进行定量 PCR 检测。选择 10 倍和 100 倍稀释 cDNA 中线性关系较好的结果为最终定量结果。而后依据 RNA 的浓度推算回去。

反应体系如下：

2X Power SYBR green PCR master mix	10ul
Primer1	0.5ul
Primer2	0.5ul
cDNA	9ul

程序为：预变性 95℃ 10min，变性 95℃ 15sec，退火延伸 60℃ 1min，40 个循环。

2、DNA 定量

2.1 宏基因组 DNA 的提取

(1)称取样品约 5 克悬浮于 15 ml PBS 中，振荡使之充分混匀后静置 1 min，而后 400 rpm 4℃ 离心 1 min，取上清约 7 ml 于离心管中，8000 rpm 4℃ 离心 10 min，弃上清；

(2)加入 5 ml PBS，振荡使之充分混匀，8000 rpm 4℃ 离心 10 min，弃上清；

(3)依菌体量多少不同加入 TE 缓冲液，振荡使之充分混匀；

(4)取约 800 μL 加入装有 0.5 g 直径为 0.1 mm 玻璃珠的离心管中，置于组织研磨仪上，1800Hz 下研磨 30min。

(5)于离心管中加入 100μL SDS (10 %)，混匀后冰浴 10 min，13000 rpm 4℃ 离心 10 min，取上清于另一离心管中；

(6)加入 100 μL NaCl (5 mol/L) 和 65 °C 预热好的 80 μL CTAB/NaCl 溶液 (10 %CTAB, 0.7 mol/LNaCl) 混匀后 65 °C 水浴 20 min，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1)，颠倒混匀，13000 rpm 4℃ 离心 10 min，取上清；

(7)加入等体积的氯仿/异戊醇，颠倒混匀，13000 rpm 4℃ 离心 10 min，取上清，加入 50 μL 醋酸钠(3 mol/L)和 500 μL 预冷的异丙醇，混匀后冰浴 30min，13000 rpm 4℃ 离心 10 min，弃上清；

(8)沉淀用 70 % 乙醇洗涤，自然干燥后依 DNA 多少不同溶于 50-100μl TE 缓冲液；

(9)取 2 μL DNA 在 ND-1000 型微量紫外分光光度计下测定其浓度及 OD260/280 值，将 DNA 样品-20℃ 保存备用。

2.2RT- PCR 检测

将外标准品进行 10 倍梯度稀释 (一般稀释 6-8 个梯度)，而后将外标准品和样品(样品的 DNA 原液和稀释液需要一起上样)一起进行荧光定量 PCR 扩增(标

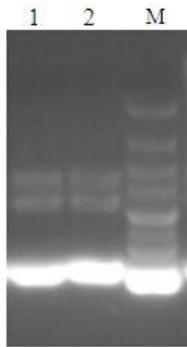
品和未知样品分别作 3 个重复), 扩增程序和扩增体系如下所示:

2X Power SYBR green PCR master mix	10ul
Primer1	0.5ul
Primer2	0.5ul
cDNA	9ul

程序为: 预变性 95°C 10min, 变性 95°C 15sec, 退火延伸 60°C 1min, 40 个循环。

二、实验结果

提取样品 1 和 2 的 RNA 经过跑胶以后如下图所示:



泳道 1: 样品 1 所提取的 RNA; 泳道 2: 样品 2 所提取的 RNA; M: Marker。

1、第一次 RT-PCR 结果

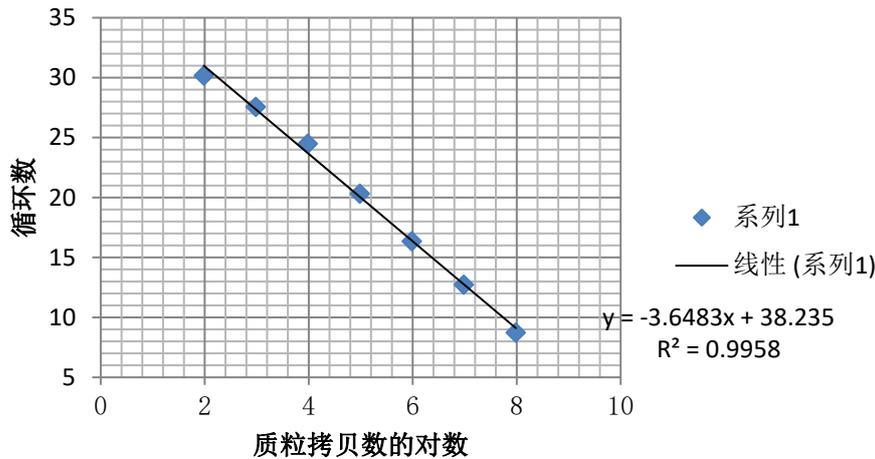
外标质粒浓度为 156ng/μl, 对应的拷贝数为 $156 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / (144 + 2692) \times 345 = 9.6 \times 10^{10}$, 将外标准品进行 10^2 - 10^9 倍稀释上样, 样品 1 和样品 2 的 cDNA 经过 10 倍、100 倍和 1000 倍稀释后上样, 样品 1 和样品 2 的 DNA 经过 10^4 - 10^8 倍稀释后上样, 每个稀释度 3 个重复。

1.1 外标曲线的制作

以外标质粒稀释后拷贝数的对数为横坐标, 相应的达到检测阈值的循环数 (CT 值) 为纵坐标绘制外标曲线, 对应的稀释度与横坐标如下表, 标准曲线如下图所示:

质粒稀释倍数	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
对应拷贝数	9.6×10^7	9.6×10^6	9.6×10^5	9.6×10^4	9.6×10^3	9.6×10^2	9.6×10^1
横坐标	8	7	6	5	4	3	2

外标曲线:



1.1 样品菌数的计算

1) 4g 样品 1 中提取总 DNA 48.45 μ g, 取其中 2 μ g DNA 做 RT-PCR

样品 1 的 DNA 稀释是 10^5 时, CT= 21.4084339141845 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.6, 则对应拷贝数为 $10^{4.6} \times 10^5 = 10^{9.6}$, 对应 1g 样品中含有的拷贝数为 $48.45/2 \times 10^{9.6}/4 = 6 \times 10^{9.6}$

样品 1 的 DNA 稀释是 10^6 时, CT= 25.8528900146484 对应线性关系中拷贝数的对数为 3.4, 则对应拷贝数为 $10^{3.4} \times 10^6 = 10^{9.4}$ 对应 1g 样品中含有的拷贝数为 $48.45/2 \times 10^{9.4}/4 = 6 \times 10^{9.4}$ 而实际 1g 样品中活菌数为 2.1×10^{11}

2) 4g 样品 2 中提取总 DNA 17.85 μ g, 取其中 2 μ g DNA 做 RT-PCR

样品 2 的 DNA 稀释是 10^5 时, CT= 23.5404567718505 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.0, 则对应拷贝数为 $10^4 \times 10^5 = 10^9$, 对应 1g 样品中含有的拷贝数为 $17.85/2 \times 10^9/4 = 2.2 \times 10^9$

样品 2 的 DNA 稀释是 10^6 时, CT= 27.0955142974853 对应线性关系中拷贝数的对数为 3.0, 则对应拷贝数为 $10^3 \times 10^6 = 10^9$ 1g 样品中含有的拷贝数为 $17.85/2 \times 10^9/4 = 2.2 \times 10^9$ 而实际活菌数为 2.1×10^{10}

3) 15g 样品 1 中提取总 RNA 767 μ g, 取其中 40 μ g 纯化后为 21.6 μ g, 反转录后取其中 2 μ g cDNA 做 RT-PCR。

样品 1 中 cDNA 没有稀释时, CT= 22.9668025970458 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.2, 则对应拷贝数为 $10^{4.2}$ 。由此可知 1g 样品中含有的拷贝数为

$$(767*21.6/40*10^{4.2}/2) /15=1.4\times 10^{5.2}$$

样品 1 中 cDNA 稀释 10^3 倍, CT= 22.4812622070312 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.3, 则对应拷贝数为 $10^{4.3}\times 10^3=10^{7.3}$, 1g 样品中含有的拷贝数为 $(767*21.6/40*10^{7.3}/2) /15=1.4\times 10^{8.3}$, 而实际活菌数为 2.1×10^{11}

4) 15g 样品 2 中提取总 RNA 1025 μ g, 取其中 40 μ g 纯化后为 15.45 μ g, 反转录后取其中 2 μ g cDNA 做 RT-PCR。

样品 2 中 cDNA 没有稀释时, CT= 19.7815170288085 对应线性关系中拷贝数的对数为 5.0, 则对应拷贝数为 10^5 , 由此可知 1g 样品中含有的拷贝数为 $(1025*15.45/40*10^5/2) /15=1.3\times 10^6$

样品 2 中 cDNA 稀释 10^3 倍, CT= 22.4812622070312 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.3, 则对应拷贝数为 $10^{4.3}\times 10^3=10^{7.3}$, 1g 样品中含有的拷贝数为 $(1025*15.45/40*10^{7.3}/2) /15=1.3\times 10^{8.3}$, 而实际活菌数为 2.1×10^{10}

小结: 由于提取 DNA、RNA 的样品和活菌计数所用的样品不是来自于同一个混合样品中, 同时, 提取时样品为溶解在液体中的, 单纯还原到 1g 样品中也会造成结果的误差。因此, 对实验进行了改进, 同时对比了溶解样品后离心取上清液提取 DNA、RNA、活菌计数和溶解样品后混合均匀取浑浊液提取 DNA、RNA 和活菌计数的区别。

2、第二次 RT-PCR 结果

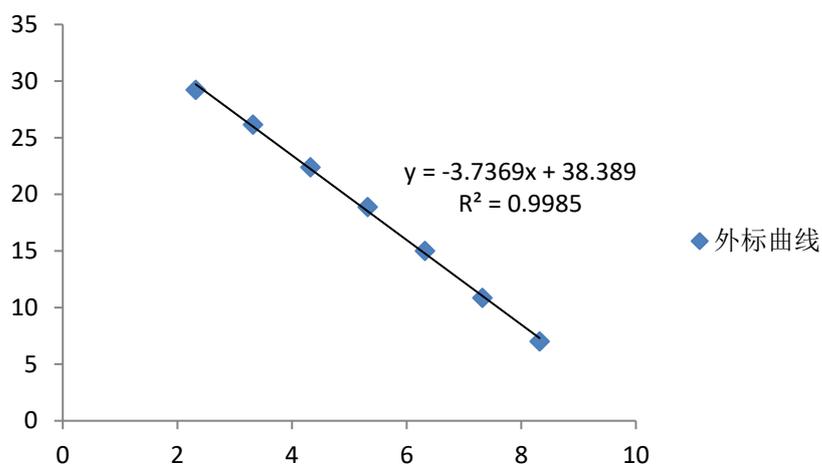
实验方法改进: 称取 7.5g 样品溶解在 22.5ml 灭菌水中, 摇匀充分溶解后离心, 取 12ml 上清液, 其中 8ml 提取 RNA, 2ml 提取 DNA, 1ml 活菌计数。RT-PCR 结果见附件 2。

2.1 外标曲线的制作

外标质粒浓度 340ng/ μ l, 对应拷贝数为 $340\times 10^{-9}\times 6.02\times 10^{23}/[(144+2692)\times 345]=2.09\times 10^{11}$

质粒稀释倍数	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
对应拷贝数	2.1×10^8	2.1×10^7	2.1×10^6	2.1×10^5	2.1×10^4	2.1×10^3	2.1×10^2
横坐标	8.32	7.32	6.32	5.32	4.32	3.32	2.32

外标曲线



2.2 样品菌数的计算

1) 8ml 离心样品 1 提取总 RNA 是 534 μ g, 取 40 μ g 进行纯化, 纯化后的总量是 11.025 μ g, 反转录后取其中 0.9 μ g cDNA 做 RT-PCR

样品 1 中 cDNA 稀释 10^2 倍, CT= 21.7654266357421 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.4, 则对应拷贝数为 $10^{4.4} \times 10^2 = 10^{6.4}$, 1ml 离心上清液中含有的拷贝数是 $(534 \times 11.025 / 40 \times 10^{6.4} / 0.9) / 8 = 2 \times 10^{7.4}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 1×10^9

样品 1 中 cDNA 稀释 10^3 倍, CT=26.2081508636474 对应线性关系中拷贝数的对数为 3.3, 则对应拷贝数为 $10^{3.3} \times 10^3 = 10^{6.3}$, 1ml 离心上清液中含有的拷贝数是 $(534 \times 11.025 / 40 \times 10^{6.3} / 0.9) / 8 = 2 \times 10^{7.3}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 1×10^9

2) 2ml 离心样品 1 提取总 DNA 是 700 μ g, 取其中 41.94 μ g DNA 做 RT-PCR

样品 1 的 DNA 稀释是 10^5 时, CT= 20.1129512786865 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.9, 则对应拷贝数为 $10^{4.9} \times 10^5 = 10^{9.9}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $700 / 41.94 \times 10^{9.9} / 2 = 8.3 \times 10^{9.9}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 1×10^9

样品 1 的 DNA 稀释是 10^6 时, CT= 24.5317325592041 对应线性关系中拷贝数的对数为 3.7, 则对应拷贝数为 $10^{3.7} \times 10^6 = 10^{9.7}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $700 / 41.94 \times 10^{9.7} / 2 = 8.3 \times 10^{9.7}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 1×10^9

3) 样品 2 提取总 RNA 是 862 μ g, 取 40 μ g 进行纯化, 纯化后的总量是 14.85 μ g, 反转录后取其中 0.9 μ g cDNA 做 RT-PCR

样品 2 中 cDNA 稀释 10^2 倍, CT= 19.9114685058593 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.9, 则对应拷贝数为 $10^{4.9} \times 10^2 = 10^{6.9}$, 1ml 离心上清液中含有的拷贝数是 $(862 \times 14.85 / 40 \times 10^{6.9} / 0.9) / 8 = 4.4 \times 10^{7.9}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 3×10^8

样品 2 中 cDNA 稀释 10^3 倍, CT= 24.5048999786376 对应线性关系中拷贝数的对数为 3.7, 则对应拷贝数为 $10^{3.7} \times 10^3 = 10^{6.7}$, 1ml 离心上清液中含有的拷贝数是 $(862 \times 14.85 / 40 \times 10^{6.7} / 0.9) / 8 = 4.4 \times 10^{7.7}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 3×10^8

4) 2ml 离心样品 2 提取总 DNA 是 333 μ g, 取其中 29.97 μ g DNA 做 RT-PCR

样品 2 的 DNA 稀释是 10^5 时, CT= 18.6066036224365 对应线性关系中拷贝数的对数为 5.3, 则对应拷贝数为 $10^{5.3} \times 10^5 = 10^{10.3}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $333 / 29.97 \times 10^{10.3} / 2 = 5.6 \times 10^{10.3}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 3×10^8

样品 2 的 DNA 稀释是 10^6 时, CT=23.5918350219726 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.0, 则对应拷贝数为 $10^{4.0} \times 10^6 = 10^{10}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $333 / 29.97 \times 10^{10} / 2 = 5.6 \times 10^{10}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 3×10^8

3、第三次 RT-PCR 结果

实验方法改进: 称取 7.5g 样品溶解在 22.5ml 灭菌水中, 溶解后充分摇匀, 取 12ml 液体, 其中 8ml 提取 RNA, 2ml 提取 DNA, 1ml 活菌计数。RT-PCR 结果见附件 3。

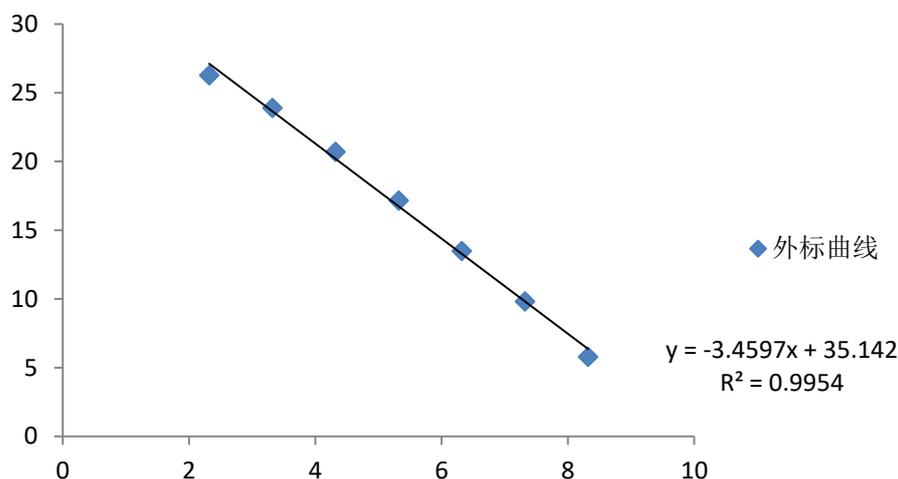
3.1 外标曲线的制作

外标质粒浓度 340ng/ μ l, 对应拷贝数为 $340 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / [(144 + 2692) \times 345] = 2.09 \times 10^{11}$

质粒稀释倍数	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
对应拷贝	2.1×10^8	2.1×10^7	2.1×10^6	2.1×10^5	2.1×10^4	2.1×10^3	2.1×10^2

贝数							
横坐标	8.32	7.32	6.32	5.32	4.32	3.32	2.32

外标曲线



3.2 样品菌数的计算

1) 8ml 样品 1 提取总 RNA 是 901.5 μ g, 取 40 μ g 进行纯化, 纯化后的总量是 13.95 μ g, 反转录后取其中 0.9 μ g cDNA 做 RT-PCR

样品 1 中 cDNA 稀释 10^2 倍, CT=20.234619140625 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.3, 则对应拷贝数为 $10^{4.3} \times 10^2 = 10^{6.3}$, 1ml 菌液中含有的拷贝数是 $(901.5 \times 13.95 / 40 \times 10^{6.3} / 0.9) / 8 = 3.49 \times 10^{8.3}$, 而经过菌落计数测的 1ml 菌液中含有的活菌数是 1.6×10^9

样品 1 中 cDNA 稀释 10^3 倍, CT=24.6784973144531 对应线性关系中拷贝数的对数为 3., 则对应拷贝数为 $10^3 \times 10^3 = 10^6$, 1ml 菌液中含有的拷贝数是 $(901.5 \times 13.95 / 40 \times 10^6 / 0.9) / 8 = 3.49 \times 10^8$, 而经过菌落计数测的 1ml 菌液中含有的活菌数是 1.6×10^9

2) 2ml 样品 1 提取总 DNA 是 444 μ g, 取其中 23.4 μ g DNA 做 RT-PCR

样品 1 的 DNA 稀释是 10^5 时, CT= 17.2678394317626 对应线性关系中拷贝数的对数为 5.2, 则对应拷贝数为 $10^{5.2} \times 10^5 = 10^{10.2}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $444 / 23.4 \times 10^{10.2} / 2 = 9.5 \times 10^{10.2}$, 而经过菌落计数测的 1ml 菌液中含有的活菌数是 1.6×10^9

样品 1 的 DNA 稀释是 10^6 时, CT= 21.8793087005615 对应线性关系中拷贝

数的对数为 3.8, 则对应拷贝数为 $10^{3.8} \times 10^6 = 10^{9.8}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $444/23.4 \times 10^{9.8}/2 = 9.5 \times 10^{9.8}$, 而经过菌落计数测的 1ml 菌液中含有的活菌数是 1.6×10^9

3) 样品 2 提取总 RNA 是 1194 μ g, 取 40 μ g 进行纯化, 纯化后的总量是 15 μ g, 反转录后取其中 0.9 μ g cDNA 做 RT-PCR

样品 2 中 cDNA 稀释 10^2 倍, CT=20.6233825683593 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.2, 则对应拷贝数为 $10^{4.2} \times 10^2 = 10^{6.2}$, 1ml 菌液中含有的拷贝数是 $(1194 \times 15/40 \times 10^{6.2}/0.9) / 8 = 3.3 \times 10^{7.2}$, 而经过菌落计数测的 1ml 菌液中含有的活菌数是 5×10^8

样品 2 中 cDNA 稀释 10^3 倍, CT=24.7630672454833 对应线性关系中拷贝数的对数为 3, 则对应拷贝数为 $10^3 \times 10^3 = 10^6$, 1ml 菌液中含有的拷贝数是 $(1194 \times 15/40 \times 10^6/0.9) / 8 = 3.3 \times 10^7$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 5×10^8

4) 2ml 离心样品 2 提取总 DNA 是 1205 μ g, 取其中 43.83 μ g DNA 做 RT-PCR

样品 2 的 DNA 稀释是 10^5 时, CT=16.4806880950927 对应线性关系中拷贝数的对数为 5.4, 则对应拷贝数为 $10^{5.4} \times 10^5 = 10^{10.4}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $1205/43.83 \times 10^{10.4}/2 = 1.4 \times 10^{11.4}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 5×10^8

样品 2 的 DNA 稀释是 10^6 时, CT=20.4862918853759 对应线性关系中拷贝数的对数为 4.2, 则对应拷贝数为 $10^{4.2} \times 10^6 = 10^{10.2}$, 对应 1ml 样品中含有的拷贝数为 $1205/43.83 \times 10^{10.2}/2 = 1.4 \times 10^{11.2}$, 而经过菌落计数测的 1ml 离心上清液中含有的活菌数是 5×10^8

总结: 1、外标曲线的相关系数均在 0.995 以上, 表明所建立的植物乳杆菌标准曲线符合 RT-PCR 定量的要求, 而样品中十倍稀释关系也可以通过 RT-PCR 结果表现出来;

2、利用 DNA 为模版通过 RT-PCR 计算得到的菌数结果比实际活菌数数量级大, 与 DNA 无法区分死菌与活菌有关, 而利用 RNA 为模版通过 RT-PCR 计算得到的菌数结果比实际活菌数数量级小, 则可能是因为 RNA 不稳定易降解, 同时提取过程和操作过程 RNA 有无法避免的损失。

附件6 其它乳酸菌计数方法的结果报告

一、实验方法

依据不同乳酸菌利用碳源的差异来计数混合样品中植物乳杆菌的活菌数，所用到的唯一碳源为山梨醇或棉籽糖，思路为：

$$n=S1+S2-N$$

式中：n——植物乳杆菌总数

S1——山梨醇为唯一碳源的基础培养基计数结果

S2——棉籽糖为唯一碳源的基础培养基计数结果

N——乳酸菌总数

实验菌株信息如下表所示：

保藏编号	中文菌名	拉丁学名	利用山梨醇	利用棉籽糖
CGMCC1.2437	植物乳杆菌植物亚种	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>	否	是
CGMCC1.6970	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	否	是
CGMCC1.1878	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	否	是
CGMCC1.2696	乳酸片球菌	<i>Pediococcus acidilactici</i>	否	是
CGMCC1.2695	戊糖片球菌	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	否	是
CGMCC1.1880	发酵乳杆菌	<i>Lactobacillus fermentum</i>	否	是
CGMCC1.1855	嗜热链球菌	<i>Streptococcus thermophilus</i>	否	是
CGMCC1.2435	干酪乳杆菌	<i>Lactobacillus casei</i>	是	否
CGMCC1.2466	鼠李糖乳杆菌	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	是	否
CGMCC1.3114	布氏乳杆菌	<i>Lactobacillus buchneri</i>	是	否
CGMCC1.0130	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	是	否
CGMCC1.2025	屎肠球菌	<i>Enterococcus faecium</i>	是	否
CGMCC1.2030	乳酸乳球菌	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	是	否
*CICC 6132	罗伊氏乳杆菌	<i>Lactobacillus reuteri</i>	否	是

*为中国工业微生物菌种保藏管理中心（cicc）菌株编号

然而，在实验验证阶段发现，利用棉籽糖的乳酸菌生长偏缓，（确定活菌数）盲样在 96h 内计得活菌数与 MRS 培养基计得活菌数差异显著 ($t < 0.05$)。经过多次试验，放弃了棉籽糖为唯一碳源的培养基在标准草案中的应用。

故以山梨醇为唯一碳源的培养基的活菌计数思路为：

$$N1=S1 \quad (2)$$

式中：N1——植物乳杆菌总数

S1——山梨醇为唯一碳源的培养基计数结果

适用乳酸菌包括植物不能利用山梨醇的上表中的菌种。

1 以山梨醇为唯一碳源的培养基的优化

计数过程中用到的培养基以 MRS 培养基为基础，去掉或者减少其碳源、氮源的影响，使得实验菌株在没有山梨醇为碳源时在该培养基上无法生长，如果该菌种能够利用山梨醇，而在添加山梨醇后可以生长。

1) MRS 培养基除去葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏（所有碳、氮源）

将保存于-80℃的所有实验菌株划 MRS 平板，于 37℃倒置培养 24-48h，挑取单菌落于 5ml MRS 肉汤培养基中 37℃静置培养 24-48h，同样转接一次，用竹签蘸取菌液在除去蛋白胨、牛肉膏、酵母膏的 MRS 培养基平板上划线，37℃倒置培养 24-48h，观察菌落生长情况，所用培养基如下：

吐温-80	1.0g
柠檬酸铵	2.0g
乙酸钠	5.0g
硫酸镁	0.1g
硫酸锰	0.05g
磷酸氢二钾	2.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水加至	1000ml

pH7.3±0.2

2) MRS 培养基除去葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、加入 2%的山梨醇

将实验菌株活化两次后划线（加入唯一碳源），培养基如下：

山梨醇	20.0 g
吐温-80	1.0g

柠檬酸铵	2.0g
乙酸钠	5.0g
硫酸镁	0.1g
硫酸锰	0.05g
磷酸氢二钾	2.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水加至 1000ml	

pH7.3±0.2

3) MRS 培养基蛋白胨、牛肉膏、酵母膏含量分别为 0.1% (少量给予氮源)

将实验菌株活化两次后划线，培养基如下：

蛋白胨	1.0g
牛肉浸膏	1.0g
酵母浸膏	1.0g
吐温-80	1.0g
柠檬酸铵	2.0g
乙酸钠	5.0g
硫酸镁	0.1g
硫酸锰	0.05g
磷酸氢二钾	2.0g
琼脂	18.0g

蒸馏水加至 1000ml

pH7.3±0.2

4) MRS 培养基除去牛肉膏、酵母膏，蛋白胨含量为 0.1% (进一步减少氮源量)

培养基配方如下：

蛋白胨	1.0g
吐温-80	1.0g
柠檬酸铵	2.0g
乙酸钠	5.0g
硫酸镁	0.1g

硫酸锰	0.05g
磷酸氢二钾	2.0g
琼脂	18.0g

蒸馏水加至 1000ml

pH7.3±0.2

5) MRS 培养基除去牛肉膏、酵母膏，蛋白胨含量为 0.1%，山梨醇含量为 2% 培养基配方如下：

蛋白胨	1.0g
山梨醇	20.0g
吐温-80	1.0g
柠檬酸铵	2.0g
乙酸钠	5.0g
硫酸镁	0.1g
硫酸锰	0.05g
磷酸氢二钾	2.0g
琼脂	18.0g

蒸馏水加至 1000ml

pH7.3±0.2

2 模拟样品中有包括植物乳杆菌在内的两种乳酸菌的计数方法

1) 将保存于-80℃的植物乳杆菌和另外的实验菌株划 MRS 平板，于 37℃倒置培养 24-48h，挑取单菌落于 5ml MRS 肉汤培养基中 37℃静置培养 24-48h，同样转接一次；

2) 取培养好的植物乳杆菌和另外的实验菌株的菌液各 1ml，加入 8ml 灭菌的生理盐水中震荡，混合均匀后进行梯度稀释，取 10^{-7} 和 10^{-8} 的稀释度各 1.0ml 注入无菌平板，每个稀释度做 5 次重复，将融化并冷却至 45℃~50℃的山梨醇基础培养基，向每个培养皿中倒入约 15~20ml，摇匀并凝固，制成山梨醇培养基的琼脂平板，36℃±1℃倒置培养 72h~96h 后进行计数。

3) 同时，取培养好的植物乳杆菌菌液 1ml，加入 9ml 灭菌的生理盐水中震荡，混合均匀后进行梯度稀释，取 10^{-7} 和 10^{-8} 的稀释度各 1.0ml 注入无菌平板，每个

稀释度做 5 次重复，将融化并冷却至 45℃~50℃的 MRS 培养基，向每个培养皿中倒入约 15~20ml，摇匀并凝固，制成 MRS 培养基的琼脂平板，36℃±1℃倒置培养 72h~96h，进行计数。

4) 对比山梨醇基础培养基和 MRS 培养基的菌数有无显著性差异。

3 模拟样品中有包括植物乳杆菌在内的三种乳酸菌的计数方法

1) 将保存于-80℃的植物乳杆菌和另外两株实验菌株划 MRS 平板，于 37℃倒置培养 24-48h，挑取单菌落于 5ml MRS 肉汤培养基中 37℃静置培养 24-48h，同样转接一次；

2) 取培养好的植物乳杆菌和另外两株实验菌株的菌液各 1ml，加入 7ml 灭菌的生理盐水中震荡，混合均匀后进行梯度稀释，取 10⁻⁷ 和 10⁻⁸ 的稀释度各 1.0ml 注入无菌平板，每个稀释度做 5 次重复，将融化并冷却至 45℃~50℃的山梨醇基础培养基，向每个培养皿中倒入约 15~20ml，摇匀并凝固，制成山梨醇培养基的琼脂平板，36℃±1℃倒置培养 72h~96h 后进行计数。

3) 同时，取培养好的植物乳杆菌菌液 1ml，加入 9ml 灭菌的生理盐水中震荡，混合均匀后进行梯度稀释，取 10⁻⁷ 和 10⁻⁸ 的稀释度各 1.0ml 注入无菌平板，每个稀释度做 5 次重复，将融化并冷却至 45℃~50℃的 MRS 培养基，向每个培养皿中倒入约 15~20ml，摇匀并凝固，制成 MRS 培养基的琼脂平板，36℃±1℃倒置培养 72h~96h，进行计数。

4) 对比山梨醇基础培养基和 MRS 培养基的菌数有无显著性差异。

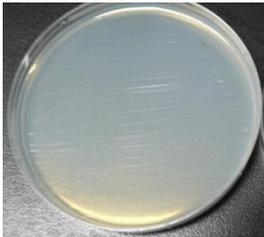
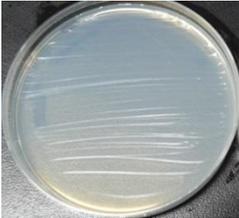
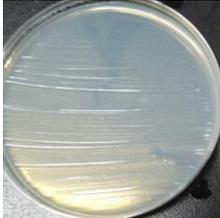
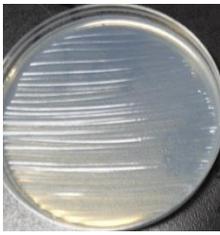
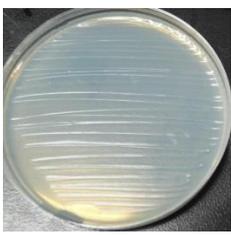
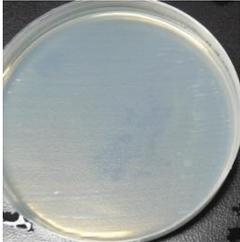
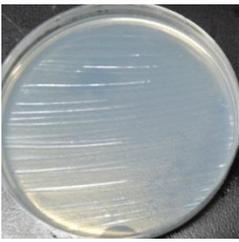
二、实验结果

1 以山梨醇为唯一碳源的培养基的优化

1) MRS 培养基除去葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏

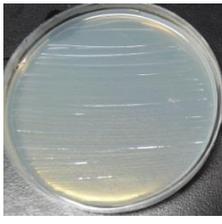
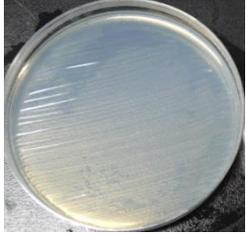
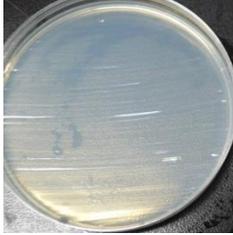
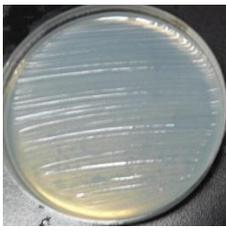
由于该培养基除去了所有的碳源和氮源，实验菌株并不能在该培养基上生长，实验菌株的照片如下图：

1.2696	1.0130	6132
--------	--------	------

		
1.6970	1.2695	1.2435
		
1.2437	1.2466	1.2030
		
1.1880	1.1855	1.3114
		
1.1878	1.2025	
		

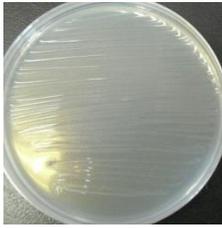
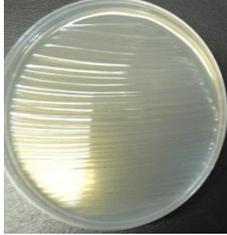
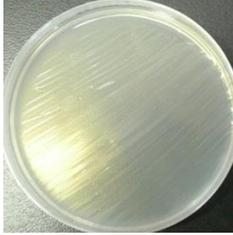
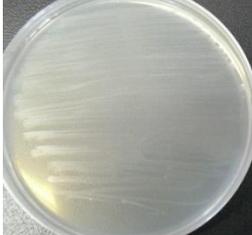
2) MRS 培养基除去葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、加入 2% 的山梨醇
 针对 1) 中结果，在除去葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏的同时加入 2% 的山梨醇作为唯一碳源，实验菌株并未出现生长的情况，该培养基不能利用，部分实验菌株如下：

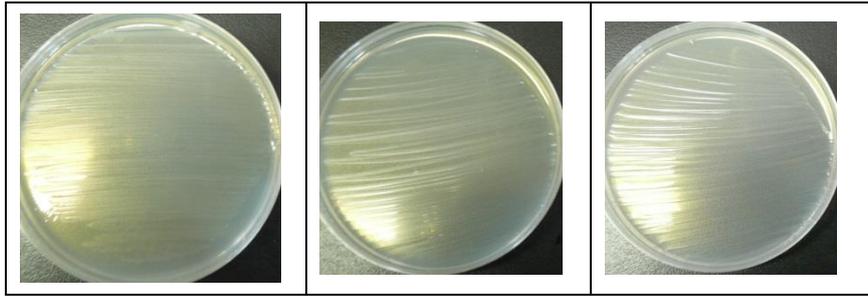
1.2437	1.0130	1.2025
--------	--------	--------

		
1.3114	1.2030	1.2435
		
1.2466		
		

3) MRS 培养基蛋白胨、牛肉膏、酵母膏含量分别为 0.1%

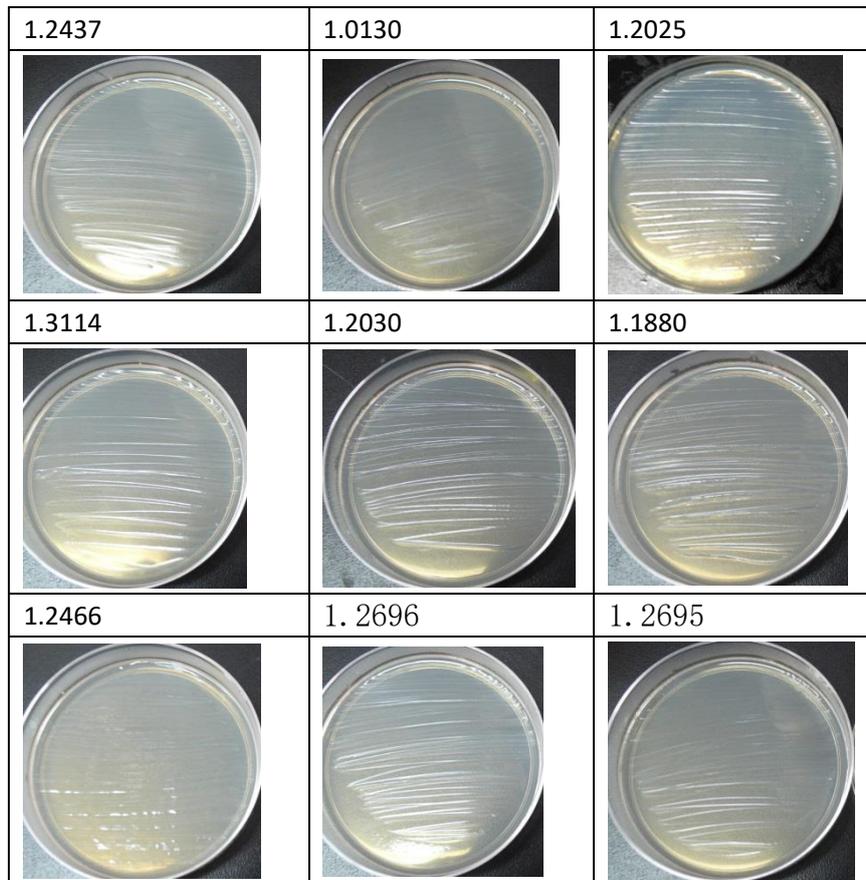
针对 2) 中结果说明除去全部的碳氮源，培养基中只添加山梨醇并不能提供菌株基本的营养，需要添加少量另外其他的碳氮源以供生长，将 MRS 培养基中蛋白胨、牛肉膏、酵母膏含量分别减少至 0.1%，结果全部实验菌株（包括不能利用山梨醇的菌株）都呈现生长趋势，表明营养物质太丰富，需减少，部分菌株结果如下图：

		
1.2437	1.0130	1.2025
		
1.3114	6132	1.2695
1.2696	1.1878	1.1855

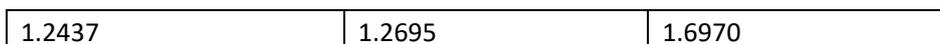


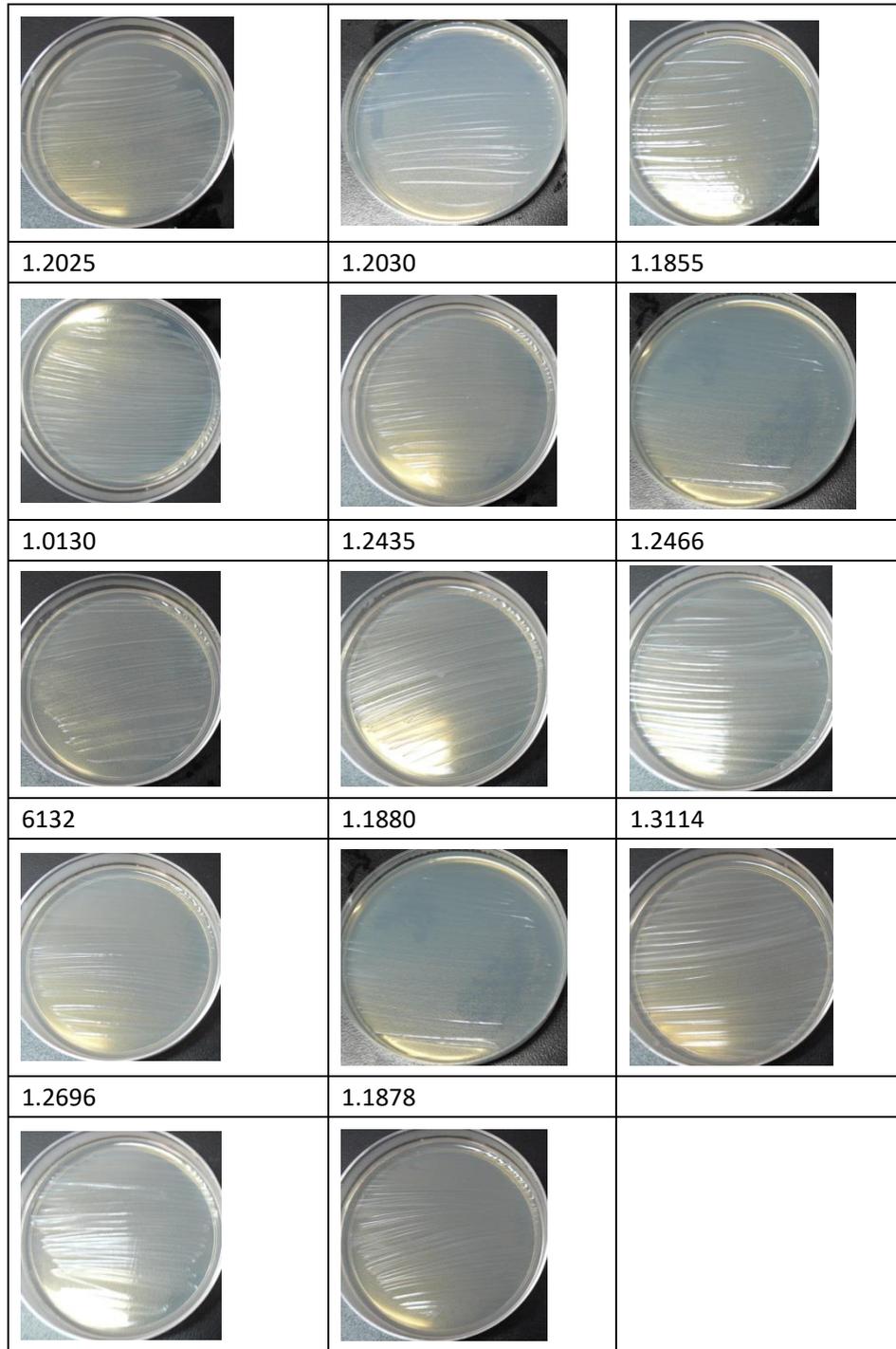
4) MRS 培养基除去牛肉膏、酵母膏，蛋白胨含量为 0.1%

相对于 3) 中培养基，除去牛肉膏、酵母膏，只添加蛋白胨含量为 0.1%，实验菌株没有生长迹象，部分结果如图：



5) MRS 培养基除去牛肉膏、酵母膏，蛋白胨含量为 0.1%，山梨醇含量为 2%
在 4) 的基础上添加山梨醇作为碳源，看能够利用山梨醇的菌株能否在该培养基上生长，结果显示可以生长，而不能利用山梨醇的菌株则没有生长趋势，结果如图：





2 模拟样品中有包括植物乳杆菌在内的两种乳酸菌的计数方法

植物乳杆菌分别和德氏乳杆菌保加利亚种、嗜酸乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、发酵乳杆菌、嗜热链球菌混合稀释后在山梨醇基础培养基上培养，选择合适的稀释度计数，植物乳杆菌稀释后在 MRS 培养基上培养，选择合适的稀释度计数，分别比较单纯植物乳杆菌和植物乳杆菌与其他菌混合培养后的计数结果有无显著性差异。当 $T < 0.05$ 时，表示两者之间有显著性差异，混合

培养的菌株对植物乳杆菌的计数有影响；当 $T > 0.05$ 时，表示两者之间没有显著性差异，混合培养的菌株对植物乳杆菌的计数没有影响，计数结果准确可用，该方法可用，结果如下：

样品	菌落数					平均数	显著性
植物乳杆菌	9.3×10^8	9.0×10^8	8.8×10^8	1.1×10^9	9.0×10^8	9.42×10^8	--
植物乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚种	8.8×10^8	6.8×10^8	7.4×10^8	7.9×10^8	6.4×10^8	7.46×10^8	$T > 0.05$
植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌	8.9×10^8	6.1×10^8	7.7×10^8	6.9×10^8	7.4×10^8	7.4×10^8	$T > 0.05$
植物乳杆菌和罗伊氏乳杆菌	9.8×10^8	8.2×10^8	8.7×10^8	8.9×10^8	9.7×10^8	9.06×10^8	$T > 0.05$
植物乳杆菌和乳酸片球菌	9.9×10^8	1.0×10^9	9.4×10^8	8.4×10^8	1.1×10^9	9.74×10^8	$T > 0.05$
植物乳杆菌和戊糖片球菌	9.6×10^8	8.5×10^8	9.9×10^8	8.3×10^8	9.2×10^8	9.1×10^8	$T > 0.05$
植物乳杆菌和发酵乳杆菌	1.2×10^9	1.2×10^9	1.2×10^9	1.1×10^9	1.0×10^9	1.14×10^9	$T > 0.05$
植物乳杆菌和嗜热链球菌	4.4×10^8	6.5×10^8	5.5×10^8	5.6×10^8	4.8×10^8	5.36×10^8	$T > 0.05$

样品	菌落数					平均数	显著性
植物乳杆菌	1.4×10^9	1.4×10^9	1.5×10^9	1.6×10^9	1.5×10^9	1.48×10^9	
植物乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚种	1.9×10^9	1.8×10^9	1.9×10^9	2.0×10^9	2.0×10^9	1.92×10^9	$T > 0.05$
植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌	1.6×10^9	1.7×10^9	2.0×10^9	1.4×10^9	1.8×10^9	1.7×10^9	$T > 0.05$
植物乳杆菌和罗伊氏乳杆菌	2.0×10^9	1.6×10^9	1.7×10^9	1.7×10^9	1.8×10^9	1.76×10^9	$T > 0.05$

植物乳杆菌和乳酸片球菌	1.6×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.3×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.2×10 ⁹	1.14×10 ⁹	T>0.05
植物乳杆菌和戊糖片球菌	1.5×10 ⁹	1.3×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.8×10 ⁹	1.8×10 ⁹	1.58×10 ⁹	T>0.05
植物乳杆菌和发酵乳杆菌	1.6×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.64×10 ⁹	T>0.05
植物乳杆菌和嗜热链球菌	1.7×10 ⁹	1.8×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.6×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.66×10 ⁹	T>0.05

以上结果中全部 T>0.05，该方法可以准确计数含有以上任意一种乳酸菌的混合样品中植物乳杆菌的活菌数，结果准确可用。

3 模拟样品中有包括植物乳杆菌在内的三种乳酸菌的计数方法

植物乳杆菌分别随机和德氏乳杆菌保加利亚种、发酵乳杆菌；嗜酸乳杆菌、乳酸片球菌；罗伊氏乳杆菌、嗜热链球菌；德氏乳杆菌保加利亚种、戊糖片球菌等比例混合，模拟含有植物乳杆菌在内的三种乳酸菌的混合样品，分别稀释后在山梨醇基础培养基上培养，选择合适的稀释度计数，植物乳杆菌稀释后在 MRS 培养基上培养，选择合适的稀释度计数，分别比较单纯植物乳杆菌和植物乳杆菌与其他菌混合培养后的计数结果有无显著性差异。当 T<0.05 时，表示两者之间有显著性差异，混合培养的菌株对植物乳杆菌的计数有影响；当 T>0.05 时，表示两者之间没有显著性差异，混合培养的菌株对植物乳杆菌的计数没有影响，计数结果准确可用，该方法可用，结果如下：

样品	菌落数					平均数	显著性
植物乳杆菌	1.4×10 ⁹	1.4×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.6×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.48×10 ⁹	
植物乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚种和发酵乳杆菌	1.5×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.8×10 ⁹	1.8×10 ⁹	1.7×10 ⁹	T>0.05
植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和乳酸片球菌	1.3×10 ⁹	1.3×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.2×10 ⁹	1.4×10 ⁹	T>0.05
植物乳杆菌、罗伊	1.5×10 ⁹	1.6×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.7×10 ⁹	1.5×10 ⁹	1.6×10 ⁹	T>0.05

氏乳杆菌和嗜热链 球菌							
植物乳杆菌、德氏 乳杆菌保加利亚种 和戊糖片球菌	1.4×10^9	1.3×10^9	1.1×10^9	1.1×10^9	1.4×10^9	1.26×10^9	$T > 0.05$

以上结果中全部 $T > 0.05$ ，该方法可以准确计数含有以上任意两种乳酸菌的混合样品中植物乳杆菌的活菌数，结果准确可用。