



中华人民共和国国家标准

GB/T 20191-202X

代替GB/T 20191-2006

饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验

Microbiological examination of *Lactobacillus acidophilus* in feeds

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

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。

本文件代替 GB/T 20191—2006《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验》，与 GB/T 20191—2006 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围（见第1章，2006年版的第1章）；
- b) 更改了规范性引用文件（见第2章，2006年版的第2章）；
- c) 更改了嗜酸乳杆菌培养基种类及制备方法（见附录A，2006年版的附录A）；
- d) 增加了嗜酸乳杆菌分子生物学鉴定方法（见7.5.4）。

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。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：湖北景瑞天恒生物科技有限公司、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、湖北凯能生物科技有限公司、北京市农林科学院、湖北省饲料监察所、国家食品安全风险评估中心、北京大北农科技集团股份有限公司、北京新科开源基因科技有限公司。

本文件主要起草人：陈晓峰、饶正华、徐朋、张董燕、文静静、韩小敏、刘雪连、王建华、王峻、林燕、刘滢、别君艳、梁洺源、刘娜。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2006年首次发布为 GB/T 20191—2006；
- 本次为第一次修订。

饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验

1 范围

本文件描述了饲料中嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 活菌总数的测定方法。

本文件适用于含有嗜酸乳杆菌的配合饲料(含宠物饲料)、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和饲料添加剂中嗜酸乳杆菌活菌总数计数及其鉴定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 42959 饲料微生物检验 采样

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂和培养基

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水: GB/T 6682, 3级。

4.2 0.85%灭菌生理盐水: 称取 8.5 g 氯化钠加入水中, 搅拌至完全溶解后, 倒入容量瓶中定容至 1000 mL。分装后, 121℃灭菌 15 min, 备用。

4.3 MRS 琼脂培养基: 见附录 A.1。

4.4 乳酸杆菌糖发酵管: 见附录 A.2。

4.5 七叶苷培养基: 见附录 A.3。

4.6 革兰氏染色液: 见附录 A.4。

5 设备和材料

5.1 培养箱: 温度可控精度±1℃。

5.2 天平: 精度0.1g。

5.3 振荡器。

5.4 旋涡混合器。

5.5 无菌培养皿: 直径90 mm。

5.6 厌氧培养装置: 厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧袋或能提供同等厌氧效果的装置。

5.7 无菌吸管: 容量为0.1 mL、1 mL或相当规格的移液器以及配套的无菌吸头。

5.8 三角瓶:容量为500 mL。

5.9 显微镜: 1000倍。

6 样品

按照GB/T 42959执行。

7 试验步骤

7.1 样品制备、稀释和涂布

7.1.1 称取25 g样品或以无菌吸管吸取25 mL样品,置于装有225 mL 0.85%灭菌生理盐水的500 mL无菌三角瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中,在振荡器上振摇30 min,制成1:10样品稀释匀液。

注:经特殊技术(如包埋技术)处理的样品在相应技术/工艺要求下进行有效前处理。

7.1.2 取1 mL 1:10样品稀释匀液注入含有9 mL 0.85%灭菌生理盐水的试管中,在旋涡混合器上混匀,此液为1:100的样品匀液。

7.1.3 按7.1.2操作,制备10倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释一次,换用1支1 mL无菌吸管或吸头。

7.1.4 选择2个~3个适宜稀释度的样品稀释匀液,吸取0.1 mL该样品稀释匀液于已提前灭菌并充分干燥的MRS琼脂平板上,使用无菌涂布棒快速地涂布均匀。每个稀释度涂布2个平板。同时吸取0.1 mL 0.85%灭菌生理盐水进行同样涂布,作为空白对照。从样品稀释到平板涂布要在15 min内完成。

7.2 培养

涂布结束后水平放置10 min,将平板倒置放入厌氧罐里,36°C±1°C培养。一般选择培养48 h±2 h,若菌落无生长或生长较小可选择培养至72 h。

7.3 观察菌落形态

典型的嗜酸乳杆菌菌落呈圆形,中等大小,凸起,微白色,湿润,边缘整齐,菌落背面为黄色。

7.4 菌落计数

选取嗜酸乳杆菌疑似菌落数在30个~300个之间的平板计数。

7.5 确证

7.5.1 菌种纯化

在同一稀释度内,挑取5个嗜酸乳杆菌疑似菌落,分别划线转接至MRS琼脂培养基平板上,36°C±1°C培养24 h~48 h,获得单菌落培养物。

7.5.2 菌体镜检观察

挑取可疑菌落进行革兰氏染色镜检,嗜酸乳杆菌为革兰氏阳性、无芽孢杆菌。

7.5.3 碳水化合物发酵试验

将挑选纯化的菌落进行碳水化合物发酵试验,见附录B.1。

7.5.4 分子生物学鉴定

如有必要按附录B.2进行分子生物学鉴定。

8 试验数据处理

根据菌落计数结果和证实为嗜酸乳杆菌的菌落数,计算出平板内的菌数,然后乘其稀释倍数即得每克(或每毫升)样品中嗜酸乳杆菌活菌总数 N (CFU/g或CFU/mL),按公式(1)计算。

$$N = A \times \frac{B}{5} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N ——每克或每毫升样品中活菌数的数值，单位为菌落形成单位每克 (CFU/g) 或每毫升 (CFU/mL)；

A ——嗜酸乳杆菌疑似菌落数的数值，单位为菌落形成单位 (CFU)；

B ——5 个鉴定的菌落中确认为嗜酸乳杆菌菌落数的数值，单位为菌落形成单位 (CFU)；

f ——稀释倍数的数值，单位为每克 (g^{-1}) 或每毫升 (mL^{-1})；

5——选出的嗜酸乳杆菌疑似菌落的数值，单位为菌落形成单位 (CFU)。

附录A
(规范性)
培养基及试剂

A.1 MRS琼脂培养基

A.1.1 组成

蛋白胨	10.0 g	牛肉膏	10.0 g
酵母膏	5.0 g	柠檬酸氢二铵	2.0 g
葡萄糖	20.0 g	吐温 80	1.0 mL
乙酸钠 (CH ₃ COONa · 3H ₂ O)	5.0 g	磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O)	2.0 g
硫酸镁 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.58 g	硫酸锰 (MnSO ₄ · H ₂ O)	0.25 g
琼脂	12g~18g ^a	蒸馏水	1000 mL

^a: 取决于琼脂的凝胶强度。

A.1.2 制法

按比例称取各组分放入瓶中,加入蒸馏水,加热,玻璃棒搅拌溶解,调整 pH 值至 6.8。在 121℃ 灭菌 15 min。制备的 MRS 琼脂可以在黑暗处于 1℃~5℃ 下储存 6 个月。

A.2 糖发酵管

A.2.1 基础成分

牛肉膏	5 g	蛋白胨	5 g
酵母浸膏	5 g	吐温 80	0.5 mL
琼脂	1.5 g	1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	1000 mL		

A.2.2 按 0.5% 加入所需糖类,分装于有倒置小管的小试管内。121℃ 灭菌 15 min。

A.3 七叶苷培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	5 g	磷酸氢二钾	1 g
七叶苷	3 g	枸橼酸铁	0.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL	蒸馏水	100 mL

其中,1.6%溴甲酚紫酒精溶液的制法为:称取 1.6g 溴甲酚紫于烧杯中,量取适量的 95% 乙醇,缓慢加入烧杯中,边加边搅拌,使溴甲酚紫粉末充分溶解在乙醇中,最后用蒸馏水定容至 100 mL,使最终溶液的浓度达到 1.6%。

A.3.2 称取各组分放入瓶中,加入蒸馏水,加热,玻璃棒搅拌溶解,调整 pH 值至 7.2,分装小试管。121℃ 灭菌 15 min。

A.4 革兰氏染色液

A.4.1 草酸铵结晶紫染液

A 液：结晶紫 2 g，95%乙醇 20 mL。

B 液：草酸铵 0.8 g，蒸馏水 80 mL。

混合 A 液和 B 液，静置 48 h 后使用。

A.4.2 番红染色液

番红 2.5 g，95%乙醇 100 mL。

取上述配好的番红酒精溶液 10 mL 与 80mL 蒸馏水混匀即可。

A.4.3 碘液

碘片 1 g，碘化钾 2 g，蒸馏水 300 mL。

先将碘化钾溶解在少量水中，再将碘片溶解在碘化钾溶液中，待碘完全溶解后加足水分即可。

附录B
(规范性)
菌种鉴定

B.1 生理生化特征

嗜酸乳杆菌的生理生化特征见表 B.1。

表 B.1 嗜酸乳杆菌碳水化合物发酵试验结果

试验	结果	特征	结果
七叶苷	+	水杨苷	+
纤维二糖	+	山梨醇	-
麦芽糖	+	棉籽糖	<i>d</i>
甘露醇	-	蔗糖	+

注：“+”表示90%以上菌株阳性；“-”表示90%以上菌株阴性；“d”表示11%~89%菌株阳性。

B.2 分子生物学鉴定**B.2.1 16S rDNA的鉴定****B.2.1.1 仪器**

冰箱：含4℃和-20℃

微波炉

PCR仪：可设定反应程序

商业化细菌基因组DNA提取试剂盒（离心柱法或磁珠法）或核酸自动提取仪

离心机：最大转速应不低于12000RPM（15000g）

千分天平

移液器和配套枪头：应无菌无酶

恒温水浴锅：RT-100℃±1℃，温度波动≤0.5℃

涡旋震荡仪：可调速

电泳仪及配套电泳槽、制胶设备

超微量分光光度计

紫外凝胶成像仪或蓝光切胶仪

B.2.1.2 试剂

琼脂糖：纯度>99.5%

商业化琼脂糖凝胶电泳缓冲液TAE，按说明书使用

商业化上样缓冲液

核酸凝胶染色剂：溴化乙锭或吖啶橙

DNA Marker：DL2000

B.2.1.3 方法**B.2.1.3.1 DNA模板制备**

取纯化培养24h~48h后的平板，刮取1~2接种环菌苔加入200μL ddH₂O，涡旋震荡充分混匀。推荐使用商业化细菌基因组DNA提取试剂盒或核酸自动提取仪，按配套说明书进行细菌基因组DNA提取。将

提取后的基因组DNA使用超微量分光光度计进行浓度和OD₂₆₀/OD₂₈₀值测定，放于-20℃条件下保存备用。

B.2.1.3.2 PCR扩增

使用细菌16S核糖体通用引物扩增，序列和条件如下：

引物名称	序列 (5'→3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

PCR扩增反应体系如下：

PCR试剂	实验体系	阴性对照体系	阳性对照体系
基因组DNA(100 ng/μL)	1.0 μL	-	1.0 μL
10×Buffer(含2.5 mM Mg ²⁺)	5.0 μL	5.0 μL	5.0 μL
Taq酶 (5U/μL)	0.25 μL	0.25 μL	0.25 μL
dNTP(10 mM)	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL
27F引物(10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL
1492R引物(10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL
ddH ₂ O	39.75 μL	40.75 μL	39.75 μL
总体积	50.0 μL	50.0 μL	50.0 μL

注：该表反应体系也可使用商业化的PCR预混液，按配套说明书操作。表中阳性对照体系中基因组DNA，使用已成功验证过的嗜酸乳杆菌基因组DNA。

向离心管内依次加入各组分，涡旋震荡后瞬时离心，以收集管壁上的液滴至管底，在PCR扩增仪上进行PCR反应。反应流程为：95℃预变性30 s，之后95℃变性10 s——55℃退火30 s——72℃延伸1.5 min，以上共30个循环，72℃延伸5 min。

B.2.1.3.3 PCR产物观察

抽取 PCR产物2 μL、上样缓冲液1 μL，混匀后上样。之后在90V~150V电压下，使用1.0%~1.5%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳，当溴酚蓝染料带跑至胶板超过1/2处结束电泳，紫外凝胶成像或蓝光切角板下观察，待测样本和阳性对照样本的目的片段均应出现在约1480 bp处，同时阴性对照应无条带。对符合要求的阳性PCR产物，进行Sanger法一代测序。

B.2.1.3.4 序列分析

拼接后的16S rDNA序列，应满足峰图清晰，无重叠峰区域碱基数应不低于1200 bp，使用在线或离线BLASTn程序进行序列相似度比对。

其中NCBI网站提供的在线BLAST程序，链接为：

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>;

离线版NCBI 16S数据库文件链接为：

https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/16S_ribosomal_RNA.tar.gz

比对结果应与*Lactobacillus acidophilus* 16S rDNA序列一致性(identity)值>99%。否则为存疑菌种，需要补充基于二代高通量测序技术的rMLST方法，进一步进行基因组水平鉴定。

B.2.2 基于二代高通量测序技术的rMLST方法鉴定

提取细菌对数期或平台期的基因组总DNA(提取方法使用离心柱法、磁珠法或酚氯仿手提法均可)，进行二代高通量测序(商业化测序仪均可)，建议测序碱基总数数据量 > 1G base，测序碱基Q20>80%。

原始数据经质控和组装后(软件和算法只要采用公开发表的方法均可以使用)，得到基因组草图。

要求组装结果平均基因组测序深度>100x，测序覆盖度>95%，污染率<10%。

将获得的基因组草图，提交至PubMLST网站，与其公布的rMLST等位基因在线数据库做检索。其参考链接为：

https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_rmlst_seqdef_kiosk

核糖体蛋白编码基因，主要包括编码核糖体大亚基50S的家族（主要约34种不同蛋白L1~L34，即rplA~rplL和rpmA~rpmG），以及编码核糖体蛋白小亚基的家族（主要为S1-S21，即rpsA~rpsU）。

从比对结果中找出上述相关rpl、rpm、rps 3个家族中核糖体编码基因（建议基因总数应不低于30种），最佳匹配结果物种应显示为*Lactobacillus acidophilus*。
